



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



**NIVELES DE ADN CIRCULANTE UTILIZANDO
ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN MUESTRAS DE SANGRE DE
PACIENTES ONCOLÓGICOS.**

Trabajo de Grado Presentado Como Requisito Parcial para Optar al Título de

Licenciado en Bioanálisis.

Autor:

Oneimar Adriana Ortiz Chacón

C.I. V-27.327.845

Tutor:

Dr. Pedro Rafael Matheus Romero.

Co-Tutora:

Dra. Andrea Avendaño

Mérida, Julio de 2024

Dedicatoria

Primeramente a la Virgen María y a Dios fuente de sabiduría, fortaleza, paciencia, constancia y guía en este camino académico. Su gracia ha sido mi sustento en los momentos de dificultad y mi inspiración en los momentos de logro. Sin su Amor incondicional, este logro no habría sido posible. "A Dios sea toda la Gloria".

A mis Abuelos por llenar mi vida de Amor por siempre creer en mi potencial y enseñarme tanto de la vida, Aunque ya no estén físicamente conmigo, su legado perdura en mi corazón. Gracias por inspirarme, por guiarme y por ser mi luz en el camino. Este logro es también de ustedes, en su memoria y con todo mi Amor.

A mis padres, Oneida Chacón y Víctor Ortiz cuyo amor incondicional, sacrificio y constante apoyo han sido la base de mi educación y crecimiento por apoyarme en este sueño que en algún momento era lejano y que hoy está más cerca, gracias porque a pesar de la distancia siempre han estado conmigo en mis logros y derrotas. Por criarme con los valores y principios que hoy me hacen ser quien soy. Mi mayor deseo es ser su Orgullo. Los Amo.

A mis hermanos Hender y Víctor Manuel compañeros de vida y apoyo incondicional. Su aliento, comprensión y ánimo han sido mi roca en este camino. Gracias por estar siempre presentes por creer en mí y por ser mi fuente de motivación. A mis cuñadas y sobrinos. Los Amo

A mis amigos Jessiree Azuaje, Daniel López y María Fernández, por ser cómplices de risas, apoyo incondicional y compañeros de aventuras. Su presencia en mi vida ha sido un regalo invaluable. Gracias por volverse mi Familia, por estar siempre ahí, por escucharme, motivarme, cuidarme y celebrar juntos cada paso en este camino.

A mis Madrinas Rima Bahsas y Sarai Dugarte, guías sabias y ejemplos a seguir en este camino académico. Su orientación experta, paciencia y aliento han sido fundamentales en mi crecimiento y desarrollo como profesional. Gracias por compartir su conocimiento, por creer en mí y por inspirarme a alcanzar nuevas metas. Este logro lleva impreso su invaluable influencia, con todo mi respeto y agradecimiento por su dedicación.

-Oneimar Ortiz.

Agradecimientos

A Dios y a la Virgen María, fuentes de fortaleza, sabiduría y protección en mi camino académico. En momentos de dificultad encontré consuelo en su amor infinito y en su guía divina.

A mi amada familia, pilar fundamental en mi vida y en mi formación académica. Han sido la fuerza que me ha impulsado a alcanzar mis metas. Gracias por estar siempre presentes, por comprender mis ausencias y por celebrar cada logro conmigo. Este trabajo es también fruto de su dedicación y ejemplo, con todo mi cariño y gratitud por ser mi mayor inspiración."

A mí querida Universidad de Los Andes, cuna de conocimiento, aprendizaje y crecimiento personal. Quiero expresar mi profundo agradecimiento a esta institución por brindarme las herramientas, el apoyo académico y las oportunidades que han sido fundamentales en mi formación. Gracias por el compromiso de sus profesores, por la calidad educativa impartida y por ser el escenario donde florecieron mis sueños y aspiraciones.

A mi tutor Profesor, Pedro Matheus, quiero agradecerle por su orientación y apoyo durante la realización de mi tesis. Su guía experta y dedicación fueron fundamentales en este proceso académico. Aprecio su tiempo, conocimientos y asesoramiento que contribuyeron significativamente a este logro académico. Este trabajo refleja su influencia y ayuda, con respeto y gratitud por su labor como tutor.

A mí estimada cotutora Dra. Andrea Avendaño, guía y apoyo incondicional en este viaje académico. Quiero expresar mi más sincero agradecimiento por su dedicación, paciencia y orientación a lo largo de este proceso. Gracias por compartir su conocimiento, por alentarme a superar desafíos y por brindarme su apoyo inquebrantable en cada etapa de esta tesis. Este logro lleva impreso su valiosa contribución.

A Lenin Valeri Jefe del Laboratorio General del IHULA por su generosa y noble colaboración en todo momento para lograr los objetivos de nuestra investigación.

Al departamento de Urología especialmente al Dr. Rafael Contreras jefe del servicio. Quiero expresar un sincero agradecimiento por su invaluable apoyo. Su colaboración fue fundamental para alcanzar este logro académico.

Al Departamento de Toxicología, especialmente al Prof. Julio Rojas por brindarnos su colaboración para poder llevar a cabo la parte experimental de esta tesis.

Quiero agradecer al Laboratorio de Genética Médica del IHULA por brindarme el espacio y las instalaciones necesarias para llevar a cabo mi proyecto de tesis. Su generosidad y apoyo fueron fundamentales para lograr este importante paso en mi formación académica. ¡Gracias por facilitarme el lugar donde materializar mis ideas y alcanzar mis metas!

Mi más sincero agradecimiento al Laboratorio de Análisis Instrumental de la Universidad de Los Andes por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo mi investigación. Su colaboración fue esencial para el desarrollo exitoso de mi proyecto. ¡Gracias por brindarme el espacio y los recursos necesarios para alcanzar mis objetivos académicos!".

Agradecer al jurado Dr. Ziomer López por su tiempo, atención y evaluación cuidadosa de mi tesis. Su contribución y comentarios han sido fundamentales en mi proceso académico. Gracias por los valiosos contactos que me han proporcionado quienes han sido de gran ayuda para el desarrollo de esta tesis.

Agradecer de corazón a mi jurada MSc. Janett Fernández por su tiempo, dedicación y valiosos aportes durante la evaluación de mi tesis. Su experiencia ha sido fundamental en mi proceso académico. ¡Gracias por su compromiso y por ser parte importante de este logro!"

A mis queridos compañeros universitarios por todo el apoyo, compañerismo y colaboración durante nuestro recorrido académico juntos, especialmente a Josemar, Dranyeli, Brenda, Angie, Antonio, Jenny y Leonymar. Cada uno de ustedes ha sido parte fundamental en mi crecimiento personal y profesional. ¡Gracias por compartir esta etapa conmigo y por ser una fuente constante de motivación y aprendizaje!"

A Todos Muchas Gracias.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
VEREDICTO.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	vi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
ÍNDICE DE TABLAS.....	xi
ÍNDICE DE GRÁFICAS.....	xii
RESUMEN.....	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	4
EL PROBLEMA.....	4
Planteamiento de Problema.....	4
Justificación e Importancia de la Investigación.....	6
Objetivos de la Investigación.....	8
Objetivo General.....	8
Objetivos Específicos.....	8
Alcances de la Investigación.....	9
Limitaciones de la Investigación.....	9
CAPÍTULO II.....	10
MARCO TEÓRICO.....	10
Trabajos Previos.....	10
Antecedentes Históricos.....	12
Bases Teóricas.....	18
1. El Ácido Desoxirribonucleico (ADN).....	18
1.1 Proporciones de las Bases Nitrogenadas: Reglas de Chargaff.....	21
1.2. Propiedades Físico - Químicas de los Ácidos Nucleicos.....	21
1.2.1. Densidad.....	21

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Pág.
1.2.2. Absorbancia a 260 nm.....	21
2. Funciones del ADN.....	22
2.1. Estructura del ADN.....	22
2.2. La Síntesis de Proteínas.....	24
2.3. ¿Dónde se encuentra el ADN?.....	25
3. Tipos de ADN.....	25
3.1 Circular vs Lineal.....	25
3.2. Tipos de ADN según la Estructura.....	26
3.3. ADN Circulante.....	26
3.3.1. ADN Circulante Normal.....	27
3.3.1.1. Aplicaciones del ADN Circulante Normal.....	27
3.3.1.1.1. Monitorización del Tratamiento del Lupus Eritematoso Sistémico.....	27
3.3.1.1.2. Pronóstico y Monitorización de Traumas.....	28
3.3.2. ADN Circulante Fetal.....	28
3.3.2.1. Aplicaciones del ADN Circulante Fetal.....	28
3.3.3. ADN Circulante Tumoral.....	29
3.3.3.1. Aplicaciones del ADN Circulante Tumoral.....	29
4. El Cáncer.....	30
4.1. Diferencias entre las Células Cancerosas y las Células Normales...	33
4.2. ¿Cómo se forma el Cáncer?.....	34
4.2.1. Cambios Genéticos que causan Cáncer	34
4.3. Cambios no Cancerosos en los Tejidos.....	35
4.3.1. Hiperplasia.....	35
4.3.2. Displasia.....	35
4.3.3. Carcinoma <i>in situ</i>	35
5. Tipos de Cáncer.....	36
5.1. Carcinoma.....	37
5.1.1. Adenocarcinoma.....	37
5.1.2. Carcinoma de Células Basales.....	37
5.1.3. Carcinoma de Células Escamosas.....	37
5.1.4. Carcinoma de Células Transicionales.....	37
5.1.5. Mieloma Múltiple.....	37
6. El ADN Circulante y el Cáncer.....	38
7. Técnicas de Detección de ADN Circulante.....	40
7.1. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	40
7.2. Electroforesis.....	41
7.3. Fluorimetría.....	41
7.4. Espectrofotometría UV-Visible.....	42
Definición Operacional de Términos.....	45

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Pág.
CAPÍTULO III.....	48
MARCO METODOLÓGICO.....	48
Tipo de Investigación.....	48
Diseño de Investigación	48
Población y Muestra.....	49
Unidad de Investigación.....	49
Selección del Tamaño de la Muestra.....	50
Sistema de Variables.....	50
Instrumento de Recolección de Datos.....	50
Procedimiento de la Investigación.....	51
Materiales y Equipos.....	51
Reactivos.....	51
Metodología Esquemática.....	52
1. Preparación de Control Positivo de ADN.....	52
2. Barrido Espectral.....	53
3. Estandarización de la Técnica de Purificación.....	53
4. Metodología General.....	54
Consentimiento Informado.....	54
Extracción de ADNcf a partir de Plasma.....	54
Toma de Muestra de Sangre.....	54
5. Determinación de Concentración de ADNcf por Espectrofotometría...	58
Control Negativo.....	58
Detección de Niveles de ADN Circulante.....	58
Determinación de Concentración de ADN según su Pureza.....	60
6. Estadística: Análisis de grupos por t student.....	60
CAPÍTULO IV.....	62
RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	62
Resultados.....	62
Discusiones.....	82
CAPÍTULO V.....	88
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	88

ÍNDICE DE CONTENIDO (CONTINUACIÓN)

	Pág.
Conclusiones	88
Recomendaciones.....	89
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	90
ANEXOS.....	99
Anexo 1. Encuesta.....	99
Anexo 2. Consentimiento Informado.....	101
Anexo 3. Espectrofotómetro UV-Visible LAMBDA 3B Perkin Elmer.....	102
Anexo 4. Celdas de Cuarzo.....	102
Anexo 5. Otros Equipos y Materiales usados.....	103
Anexo 6. Pipetas Automáticas.....	104
Anexo 7. Barrido Espectral.....	104

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura de Doble Hélice del ADN.....	19
Figura 2. Tipos de Codones y Aminoácidos.....	20
Figura 3. Serie Hipotética de Mutaciones que llevan al Cáncer.....	34
Figura 4. Espectro Electromagnético.....	43
Figura 5. Diagrama de Bloques (Espectrofotómetro).....	45
Figura 6. Toma de Muestra.....	55
Figura 7. Primera parte de Extracción de ADNcf.....	56
Figura 8. Segunda parte de Extracción de ADNcf.....	57

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Absorbancia de Ácidos Nucleicos y Proteínas.....	60
Tabla 2. Características Fenotípicas de los Individuos sin Cáncer.....	63
Tabla 3. Características Fenotípicas de los Pacientes Oncológicos.....	64
Tabla 4. Controles Poblacionales (Individuos sin Cáncer).....	66
Tabla 5. Pacientes Oncológicos.....	68
Tabla 6. Prueba t de student de Comparación entre Varones y Mujeres respecto de sus Concentraciones de ADN.....	69
Tabla 7. Prueba t de student de Comparación entre grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años. Respecto de sus concentraciones de ADN.....	71
Tabla 8. Prueba t de student de comparación entre grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años. Respecto de sus Concentraciones de ADN...	73
Tabla 9. Prueba t de student de Comparación entre grupos etarios de 36-55 años y 56 años en adelante. Respecto de sus Concentraciones de ADN.....	74
Tabla 10. Prueba t de student de Comparación entre grupo de individuos sedentarios y otro grupo de individuos que se ejercitan respecto de sus Concentraciones de ADN.....	76
Tabla 11. Prueba t de student de Comparación entre grupo de individuos con antecedentes familiares de cáncer y otro grupo de individuos sin antecedentes con respecto de sus Concentraciones de ADN...	77
Tabla 12. Prueba t de student de Comparación entre grupo de individuos Hipertensos y otro grupo de individuos sanos con respecto de sus Concentraciones de ADN.....	79
Tabla 13. Prueba t de student de Comparación entre grupo de Pacientes Oncológicos y otro grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes con respecto de sus Concentraciones de ADNcf.....	80

ÍNDICE DE GRÁFICAS.

Gráfica 1.	Concentración Real de ADN en General	65
Gráfica 2.	Concentración Real de ADN en el Control Poblacional.....	67
Gráfica 3.	Concentración Real de ADN en Pacientes Oncológicos.....	68
Gráfica 4.	Media de Concentraciones de ADN de Varones Vs Mujeres con error estándar.....	70
Gráfica 5.	Media de concentraciones de ADN 20-35 años Vs 36-55 años con error estándar.....	71
Gráfica 6.	Media de concentraciones de ADN de 20-35 años Vs 56 años en adelante con error estándar.....	73
Gráfica 7.	Media de concentraciones de ADN de 36-55 años Vs 56 años en adelante con error estándar.....	75
Gráfica 8.	Media de concentraciones de ADN de un grupo de individuos sedentarios y otro grupo de individuos que se ejercitan con error estándar.....	76
Gráfica 9.	Media de concentraciones de ADN de grupo de individuos con antecedentes familiares de cáncer y otro grupo de individuos sin antecedentes, con error estándar.....	78
Gráfica 10.	Media de concentraciones de ADN de grupo de individuos hipertensos y otro grupo de individuos sanos, con error estándar.....	80
Gráfica 11.	Media de concentraciones de ADN de grupo pacientes oncológicos y otro grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes, con error estándar.....	82



REPÚBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



NIVELES DE ADN CIRCULANTE UTILIZANDO ESPECTROFOTOMETRÍA UV-VISIBLE EN MUESTRAS DE SANGRE DE PACIENTES ONCOLÓGICOS

Autora:

Oneimar Adriana Ortiz Chacón
V- 27.327.845

Tutor: Prof. Dr. Pedro P Matheus R
Co-Tutora: Dra. Andrea Avendaño

RESUMEN

El ADNcf se precisa como un conjunto de moléculas de cadena sencilla o doble, cuya longitud abarca desde menos de 500 hasta 21 mil pares de bases. El mismo se encuentra circulando en los distintos líquidos corporales siendo de mayor alcance la sangre. El objetivo de esta investigación es analizar la correspondencia de los niveles de ADNcf utilizando Espectrofotometría UV-Visible en muestras de sangre de pacientes oncológicos e individuos que no presentan esta patología. El tipo de investigación es analítica y el diseño de: Campo, laboratorio, experimental, transeccional y univariable. En este estudio se utilizan muestras de sangre de pacientes oncológicos e individuos aparentemente sanos (que no sufren de cáncer). La muestra está representada por 8 pacientes oncológicos y 54 individuos aparentemente sanos que no presentan dicha patología, pero que pueden presentar otras alteraciones patológicas tales como dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, diabetes, entre otras. La obtención de la sangre se realizó por medio de venopunción y posteriormente fue extraído y purificado el ADNcf a partir de plasma por el método propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 (Lahiri y cols., 1991). La determinación de los niveles de ADNcf se realizó mediante el uso de Espectrofotometría Uv-Visible. La encuesta fue el instrumento de recolección de datos, los cuales fueron registrados en una hoja de cálculo Excel para la realización de la prueba estadística t de student. En la mayoría de los casos no se presentan diferencias significativas en la media de los grupos estudiados, excepto en la comparación de los grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años. En cuanto a las concentraciones de ADNcf en individuos aparentemente sanos, los resultados obtenidos difieren de los reportados por otros autores. Igualmente los resultados se obtienen en los pacientes oncológicos, donde las concentraciones de ADN tienden a disminuir.

Palabras clave: ADNcf, Espectrofotometría UV-Visible, pacientes oncológicos, sangre, extracción.

INTRODUCCIÓN

El cáncer es una enfermedad genética, aunque en la mayoría de los casos no es hereditaria. En estas últimas, el defecto se transmite a través de las células sexuales al cigoto. En contraste, los trastornos que originan la mayor parte de los tumores malignos afectan el ADN de las células somáticas. Esto provoca la proliferación celular incontrolable, con invasión del tejido adyacente sano y metástasis, diferencia principal entre el cáncer y los tumores benignos. Su elevada incidencia y mortalidad, unida al sufrimiento que provoca en los pacientes, convierten al cáncer en un serio problema de salud mundial y un reto para los servicios sanitarios. Todavía los tratamientos actuales como la quimioterapia y la radioterapia, presentan serios efectos indeseables, por lo que la comprensión de la genética molecular de esta enfermedad podría tener un favorable impacto sobre su diagnóstico, tratamiento y pronóstico, (Karp., 2009).

Al mismo tiempo el uso de biomarcadores en el cáncer ha revolucionado la medicina oncológica al permitir una detección temprana más precisa, una selección de tratamientos más efectiva y un seguimiento más detallado de la respuesta al tratamiento. Algunos biomarcadores también pueden ayudar a identificar subtipos específicos de cáncer, lo que es fundamental para ofrecer terapias personalizadas y mejorar los resultados clínicos. Es resumen, los biomarcadores desempeñan un papel crucial en la lucha contra el cáncer al proporcionar información valiosa que guía a los profesionales de la salud en la toma de decisiones clínicas (López., 2021).

De ahí que el estudio del ADNcf (ADN Circulante) como biomarcador en el cáncer ha revolucionado la forma en que se diagnostica, trata y monitorea esta enfermedad. El ADN liberado por las células tumorales en la sangre (necrosis) puede proporcionar información crucial sobre la presencia de cáncer, su evolución y la respuesta al tratamiento. Al analizar este material genético, los investigadores pueden identificar mutaciones específicas relacionadas con el cáncer, lo que permite una detección temprana más precisa y un seguimiento más efectivo de la enfermedad,

gracias a estas innovaciones, el uso del ADNcf como biomarcador se ha convertido en una herramienta prometedora en la lucha contra el cáncer (López., 2021).

Por lo antes mencionado es conveniente aclarar que el ADNct constituye una pequeña proporción del ADNcf libre total, menor al 1%. Y gracias a la mejora de la sensibilidad de las técnicas analíticas utilizadas, está siendo rápidamente aceptado como una herramienta de confianza en Oncología, ofreciendo un método más sensible para la detección de malignidad en comparación con las técnicas de imagen u otras aproximaciones convencionales en algunos tipos tumorales (Dasari., y cols., 2020).

Por lo que respecta a las bases moleculares del cáncer consiste en la acumulación de mutaciones (cambios) en el genoma de una única célula que causa su transformación neoplásica. Estas mutaciones confieren una ventaja proliferativa a la célula, se rompe el equilibrio de las señales celulares y se produce una división celular incontrolada de las células genéticamente dañadas. Las mutaciones afectan fundamentalmente a tres tipos de genes: Protooncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación de ADN y, para entender esta nueva era de investigación en el cáncer y el desarrollo de las nuevas terapias, es preciso conocer a fondo la estructura, organización y función del material hereditario el ADN (Calasanz., 2006).

Con este mayor conocimiento del genoma humano, así como el desarrollo de importantes avances técnicos, se abre una nueva era que incluye el desarrollo de nuevos biomarcadores que no sean invasivos y sobre todo que permitan evaluar el estado del paciente en tiempo real, en este orden de ideas sin duda el ADNcf se encuentra entre los nuevos posibles biomarcadores con alto potencial clínico, sin embargo es necesario estudiarlo más a profundidad, es por ello que en este proyecto los autores buscan analizar el comportamiento de la concentración de ADNcf en pacientes oncológicos e individuos que no presentan esta patología, puesto que en la actualidad no existen estudios que abarquen los valores normales de ADNcf en poblaciones mestizas si bien se han realizado reportes en otros países existen diferencias poblacionales así como estilos de vida diferentes que pueden conllevar a

la variación de los valores de la concentración entre poblaciones sanas como oncológicas. Razones por las cuales es necesario realizar más estudios sobre estos valores así como las técnicas empleadas para extracción y purificación de dicha molécula. En definitiva, las nuevas estrategias de investigación biomédica suponen un mayor conocimiento de la patogénesis, de la terapia de numerosas enfermedades oncológicas además tienen un gran impacto tanto en la investigación básica en cáncer, y cada vez con mayor frecuencia, en la práctica clínica, (Calasanz., 2006).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA.

Planteamiento del Problema.

El ADN, o ácido desoxirribonucleico, es una molécula fundamental en la genética y la biología. Contiene la información genética que determina las características hereditarias de los seres vivos. Además permite la síntesis de proteínas y el funcionamiento adecuado de las células. El estudio del ADN no solo ha revolucionado campos como la medicina y la biotecnología, sino que también ha permitido comprender mejor la evolución y diversidad de los organismos en nuestro planeta. A su vez el ADNcf se refiere al ADN liberado por células en el torrente sanguíneo, y su estudio ha ganado importancia en la investigación biomédica, este se puede encontrar en el torrente sanguíneo y en otros fluidos corporales, como la saliva o la orina. Se ha descubierto que el ADNcf puede provenir de diferentes fuentes en el organismo, como células tumorales, sanguíneas y normales que liberan fragmentos de su ADN. En el contexto clínico, se distinguen dos tipos principales de ADN circulante: el ADN tumoral circulante (ADNct) y el ADN derivado de células normales. El ctDNA se libera de células tumorales y lleva consigo mutaciones genéticas específicas que pueden ser utilizadas para detectar y monitorear la progresión del cáncer. Por otro lado, el ADN derivado de células normales puede proporcionar información sobre procesos fisiológicos o patológicos en el organismo, abriendo nuevas posibilidades en el campo de la medicina personalizada y la investigación biomédica, (Alberg., y cols., 2003).

El ADN y el ADN circulante (ADNcf) están estrechamente relacionados en el campo de la biología y la medicina. El ADN, como molécula portadora de la información genética en las células, desempeña un papel crucial en la determinación de las características hereditarias y el funcionamiento celular. Por otro lado, el

ADNcf, liberado al torrente sanguíneo y otros fluidos corporales, ofrece una ventana única para el estudio no invasivo de procesos fisiológicos y patológicos en el organismo, (Mouliere., y cols., 2018).

Por otro lado el cáncer es una enfermedad caracterizada por el crecimiento descontrolado de células anormales que pueden invadir tejidos circundantes y propagarse a otras partes del cuerpo. Esta condición puede tener múltiples causas, que van desde factores genéticos y ambientales hasta el estilo de vida de una persona. El cáncer se ha convertido en un desafío global para la salud, con diferentes tipos de cáncer que afectan a millones de personas en todo el mundo, (Diaz., y cols., 2014).

En relación con el ADN circulante, se ha descubierto que el análisis de fragmentos de ADN liberados por células tumorales en la sangre, conocido como ADN tumoral circulante (ctDNA), puede proporcionar información valiosa para la detección temprana, el seguimiento y la personalización del tratamiento del cáncer. La presencia y características del ctDNA en el ADN circulante pueden revelar mutaciones genéticas específicas asociadas con el cáncer, lo que abre nuevas posibilidades para la medicina de precisión y la mejora de los resultados clínicos en pacientes oncológicos, (Bettegowda., y cols., 2014).

A pesar de los numerosos estudios que se han realizado acerca del cáncer, pocos han sido enfocados con respecto a la asociación que tiene el ADN circulante con esta enfermedad. Con la realización de este proyecto se pretende conocer y proporcionar información sobre la relación que podría tener esta molécula con el estadio de la enfermedad y la variación de los niveles de ADN circulante en pacientes ya diagnosticados si los comparamos con los niveles en personas sanas.

Para la determinación del ADN circulante no existen técnicas estandarizadas de laboratorio que permitan una fácil determinación y cuantificación de él, ya que las técnicas que se han desarrollado son de alto costo, indirectas y poco sensibles; en este proyecto se pretende desarrollar una técnica espectrofotométrica para determinar los niveles de ADN circulante en pacientes oncológicos y en personas sanas.

En el mismo orden de ideas con respecto al problema de investigación algunos autores han realizado la investigación con otros procedimientos tales como citometría

de flujo, análisis molecular (técnicas moleculares) aunque esta se encuentra en desarrollo, así como la espectrofotometría uv-visible obteniendo a su vez resultados similares lo que ha llevado a estos autores a estudiar la presencia de ADN circulante en los diferentes tipos de enfermedades intensificando el estudio en pacientes que padecen de cáncer como otros tipos de enfermedades, (Chávez., y cols., 2016).

Por consiguiente la cuantificación de las células tumorales ha demostrado su utilidad como valor pronostico. Según Rodríguez el análisis con radiación ultravioleta presento muy buena sensibilidad en la medida de ADN comercial, el instrumento de medida utilizado presenta una buena resolución y sensibilidad en un amplio rango de longitudes de onda. De esta forma se puede concluir que el uso de técnicas espectrofotométricas como uv- visible para la obtención de ADN circulante relacionada con patologías complejas del ser humano será automático y de mayor eficiencia, (Rodríguez., 2006).

Justificación e Importancia de la Investigación

La justificación debe responder a los por qués o razones de la investigación. Específicamente, estas razones pueden ser categorizadas como necesidades, curiosidades y preocupaciones, motivaciones, intereses. También, valores, potencialidades, oportunidades, tendencias, contradicciones (Hurtado., 2010).

La autora de esta investigación identificó necesidades tales como: Las personas con cáncer presentan variaciones de la enfermedad entre individuos esto implica que cada tratamiento debe ser específico para cada tumor por ello es necesario encontrar métodos de diagnóstico con alta sensibilidad para lograr la detección temprana de dicha enfermedad y poder hacer más eficiente el tratamiento (American Cancer Society, 2020). Además, (Moss., y cols., 2020) detectaron ADNct de mama, antes del tratamiento en pacientes con enfermedad localizada con una sensibilidad del 80 % y una especificidad del 97 %. Lo que despertó el interés de la autora por la alta sensibilidad y especificidad antes indicada implicando un aspecto importante para la

vida y el desempeño profesional. Las razones anteriores justificaron porque se escogió al objeto de estudio.

La investigadora de este estudio identificó razones que le interesaron y mostraron tendencias. Entre ellas la prevalencia del aumento de los niveles de ADNct según el estadio de la enfermedad, en el cáncer de pulmón la cantidad total de ADNct fue mayor en los que tenían metástasis a distancia que en los que no. En particular, la cantidad de ADNct de fragmentos largos fue significativamente mayor en esos pacientes. (Jaraba., y cols., 2021).

La investigadora decidió focalizar su interés sobre el evento de estudio niveles de ADN circulante utilizando espectrofotometría Uv-visible por varias razones. Primero los conocimientos teóricos sobre los niveles de ADN circulante en muestras de sangre de pacientes oncológico y personas sanas deben ser mostrados a profundidad con la intención de permitirnos distinguir con claridad la potencialidad para el diagnóstico, pronóstico y monitoreo de distintas condiciones clínicas en particular enfocado principalmente en pacientes con cáncer, esto debido al aumento en los valores de ADN circulante presentes en pacientes con dicha enfermedad. Segundo es importante revisar las aproximaciones teóricas ya que el mismo puede implicar un cambio en la vida del ser humano principalmente en personas con esta enfermedad debido a su tasa de mortalidad. Tercero esto constituye una opción para el personal del área de salud.

Al considerar los por qués anteriores, la autora también encontró razones con categoría de potencialidad. Por eso, los niveles de ADNcf representaron una potencialidad que motivó la realización de esta investigación. Específicamente, que las concentraciones de ADNcf son mayores en personas con cáncer que en personas sanas. (Rodríguez., y cols., 2021), además, La detección de los diferentes niveles de ADNcf pueden llevarse a cabo a través de la técnica de espectrofotometría Uv-visible, la cual es una práctica analítica que permite establecer la concentración de un compuesto en solución (Abril., y cols., 2010).

Mediante esta técnica se puede obtener una cuantificación precisa del ADN, ARN y proteínas utilizando pequeñas cantidades de muestra lo que refiere un gran avance en el diagnóstico del cáncer tanto por lo antes mencionado como por su fácil

obtención debido a que dicho ADN se puede obtener de una muestra de Sangre. La misma tiene la particularidad de poder absorber luz ultravioleta, teniendo su máximo de absorción en 260nm en estado puro logrando calcular la concentración del ADN (Maldonado., y cols., 2018).

Objetivos de la Investigación.

Objetivo General.

Determinar los niveles de ADN circulante en muestras de sangre de pacientes oncológicos y una muestra poblacional de individuos que no presentan esta patología, utilizando espectrofotometría UV-Visible.

Objetivos Específicos.

- Preparación de control positivo de ADN nuclear a partir de Leucocitos
- Establecer la longitud de onda a la cual el ADN circulante presenta mayor absorbancia (Barrido Espectral) (ver Anexo 7 pag 116).
- Optimización de condiciones de trabajo para la determinación de ADNcf en sangre.
- Comparar los valores de ADNcf de pacientes oncológicos con personas que no presenten esta patología.
- Evaluar si se presentan cambios en la concentración de ADNcf en los individuos controles, considerando grupos etarios, sexo, algún tipo de patología cardiovascular y estilo de vida.

Alcances y Limitaciones de la Investigación

Alcances de la Investigación.

El alcance de una investigación está representado por la amplitud y profundidad del conocimiento que se quiere aprender (Hurtado, 2010). Por tal motivo, el verbo del objetivo general es la cúspide del conocimiento que se va a adquirir durante la realización de la investigación, ya que el mismo se refiere a la profundidad del estudio a realizar. Al respecto, el alcance de esta investigación estuvo representado por la detección de los niveles de ADN circulante en muestras de sangre de pacientes oncológicos e individuos sanos, mediante espectrofotometría UV-Visible

Limitaciones de la Investigación.

En cuanto a las limitaciones de la investigación, es importante considerar los aspectos relacionados con las teorías y los trabajos previos que la sustentan. También, existen limitaciones sobre cómo hacer los procedimientos y el presupuesto disponible para realizar la investigación. Estas limitaciones corresponden con las mencionadas por Hernández, Fernández y Batista, 2014. Tales como: teóricas, técnicas y de presupuesto. Específicamente, en esta fase de proyecto, existen limitaciones en cuanto a la disponibilidad de trabajos previos, pues se han encontrado pocos artículos actualizados. Otra limitación es de tipo técnica, ya que los instrumentos utilizados en ocasiones han presentado fallas. También, limitaciones en cuanto a los Pacientes encontrados dispuesto a participar del estudio, por ultimo limitaciones de presupuesto secundaria a la crisis económica.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

La situación actual del problema de estudio ha sido divulgada por varios autores en los últimos 5 años. Al respecto Moss y cols. En su trabajo titulado El ADN circulante derivado de la mama permite la detección y el seguimiento universales del cáncer de mama localizado, en el año 2020, Describieron un ensayo basado en la metilación del ADN capaz de detectar el ADNcf de una manera específica y sensible, para ello adoptaron un enfoque alternativo, confiando en loci genómicos con un patrón de metilación exclusivo del epitelio mamario (normal y canceroso), en comparación con otros tejidos de salud. Concluyendo que los niveles de ADN circulante libre de células de mama están elevados en el cáncer de mama y reflejan la biología del tumor.

Del mismo modo, Tomonori y colaboradores en el 2020, en su trabajo sobre el Origen del ADN libre circulante en pacientes con cáncer de pulmón. Fraccionaron medios acondicionados aislados de líneas celulares de cáncer de pulmón, recolectando muestras de sangre periférica en tubos que contenían citrato de sodio al 3,2 %. Los autores demostraron que, en pacientes con cáncer de pulmón, la cantidad total de ADNcf fue mayor en los que tenían metástasis a distancia que en los que no. En particular, la cantidad de ADNcf de fragmentos largos fue significativamente mayor en esos pacientes.

Por su parte Romero y colaboradores en el 2021 realizaron un trabajo titulado: El análisis de ADNct revela diferentes patrones moleculares a medida que progresó la enfermedad en pacientes tratados con osimertinib. Para lo cual recogieron 326 muestras de plasma seriadas y las analizaron mediante PCR digital (dPCR) y secuenciación de nueva generación (NGS). Dichos autores identificaron tres patrones

moleculares a la progresión del tratamiento con osimertinib en segunda línea, en pacientes con CPCNP con mutaciones en EGFR. Estos patrones tenían valor pronóstico. Además, en estos pacientes el aclaramiento del ADNct a los 3 meses de tratamiento identificaba a pacientes con mejor supervivencia. Poniendo en evidencia la utilidad del ADNct para la detección de mecanismos de resistencia frente a las tres generaciones de EGFR-TKIs, poniendo de manifiesto la gran heterogeneidad de mecanismos moleculares que albergaban los tumores.

De igual importancia, Gil Sabater en el 2021, en su proyecto titulado: Validación de nuevos biomarcadores no invasivos para el cáncer renal (RCC): ADN libre circulante en orina. Evaluaron la integridad del ADNcf en orina como biomarcador para RCC para este propósito, utilizaron una colección de muestras de orina de 57 pacientes con RCC con los tres subtipos principales (38 de células claras, 14 papilares y 5 cromófobos) y 27 controles sanos. Después del aislamiento del ADNcf de la orina, el nivel de expresión de un fragmento corto (potencialmente resultante de la apoptosis) y uno largo (potencialmente resultante de la necrosis) de los genes ACTB, AR, BCAS1, MYC y STOX1 los cuantificaron mediante PCR cuantitativa en tiempo real (q-PCR). Llegando a la conclusión que algunos de los biomarcadores estudiados mostraron potencial diagnóstico y clasificadorio en el CCR. La integridad de ACTB y AR y los fragmentos cortos de MYC y STOX1 podrían utilizarse para diagnosticar el CCR de células claras, mientras que para el papilar y el cromófobo podrían utilizarse el cociente ACTB y el fragmento corto de MYC, respectivamente.

Así mismo, Ren y colaboradores en el 2024, estudiaron a 53 personas sanas y 71 pacientes con NSCLC (Cáncer de pulmón de células no pequeñas), incluidos los estadios I (n=23), II (n=14), III (n=14) y IV (n = 20). Con la finalidad de evaluar el valor de la detección combinada de la concentración e integridad del ADNcf en plasma en el diagnóstico temprano del NSCLC (Cáncer de pulmón de células no pequeñas). Empleando PCR cuantitativa de fluorescencia en tiempo real para determinar la concentración y la integridad del ADNcf en plasma. De ahí que la detección combinada de la concentración e integridad del ADNcf en plasma tuvo un mayor poder de diagnóstico para diferenciar a los pacientes con NSCLC (Cáncer de

pulmón de células no pequeñas) en estadio I/II de personas sanas que la detección de la concentración plasmática de ADNcf sola o de la integridad sola.

Antecedentes Históricos

A lo largo de su vida, las personas pueden atravesar por distintos escenarios clínicos, enfermedades autoinmunes, como la artritis reumatoide y el lupus eritematoso sistémico; infecciones bacterianas y virales, como la tuberculosis y la hepatitis, respectivamente; el embolismo pulmonar y otras condiciones, como el infarto y el embarazo. Todas ellas, a simple vista, parecen no compartir característica alguna. Sin embargo, quienes presentan estas condiciones sí tienen algo en común: la presencia de ácido desoxirribonucleico (ADN) fuera de sus células, que circula libremente en su sangre. Curiosamente, la existencia del ADN circulante fue reportada por primera vez por Mandel y Métais en 1948, sólo cuatro años después de la demostración de que el ADN es el material de la herencia y cinco años antes del artículo de Watson y Crick sobre la estructura en doble hélice del ADN.

Esto provocó que, a pesar de la naturaleza innovadora del trabajo de Mandel y Métais, quienes observaron la presencia de ADN extracelular en la sangre de personas sanas y con distintas enfermedades, no se le tomara en cuenta sino hasta finales de 1960, cuando el ADN extracelular se redescubrió en suero y plasma de personas con lupus eritematoso sistémico.

Desde entonces, se ha demostrado la presencia del ADN circulante en personas sanas, personas con distintas enfermedades y pacientes con cáncer, principalmente en forma de mononucleosomas u oligonucleosomas (los nucleosomas son estructuras repetitivas, formadas por ADN y proteínas, que constituyen la unidad fundamental de la cromatina, forma de organización del ADN en las células eucariontes, es decir, las que tienen un núcleo delimitado por una membrana), esta conformación probablemente contribuye a proteger al ADN de la acción de las nucleasas (enzimas que destruyen los ácidos nucleicos), esto, en primera instancia, ha hecho posible su detección en plasma y suero sanguíneo (Ezquerro., y cols., 2008).

En el año 2009 en la línea de la revista Molecular Nutrition and Food Research, Ruth Chan y colaboradores publican una revisión sobre el cáncer de próstata y el consumo de vegetales. Hay datos que sugieren que una dieta rica en verduras puede reducir su riesgo. El principal mecanismo de este efecto de defensa vegetal es la protección antioxidante contra el ADN y el daño celular.

Estos autores identificaron que los tomates y sus derivados contienen el carotenoide antioxidante licopeno. Dos estudios de cohortes informaban que este fruto disminuía el Cáncer de próstata (CaP) y 3 estudios de cohorte señalaban no haber encontrado alguna asociación significativa. Además, una investigación sugería que el beneficio potencial es mayor en el CaP avanzado, en comparación con el localizado. En general, los estudios con tomates y licopenos muestran resultados inconsistentes sobre la reducción de riesgo del CaP, si bien los alimentos a base de licopenos probablemente sean protectores para otras patologías (Chan., y cols., 2009).

Los estudios basados en la población son limitados y el beneficio de protección de determinados vegetales sobre el cáncer de próstata aún queda por dilucidar. En todo caso, a pesar de los resultados de esta revisión, deberían promoverse los beneficios generales de la alimentación en base a vegetales para la prevención del cáncer en general y de otras enfermedades relacionadas con la dieta. En los Estados Unidos, los cánceres diagnosticados con mayor frecuencia son los de próstata, pulmón/bronquios y colon/recto en los hombres y los de mama, pulmón/bronquios y colon/recto en las mujeres (Chan., y cols., 2009).

En el año 2013 Dawson y sus colegas (Universidad de Cambridge, Reino Unido) compararon radiografías de tumores con análisis de ADN libre, CA 15-3 y células tumorales circulantes en 30 mujeres con cáncer de mama metastásico que estaban recibiendo terapia sistémica. La secuenciación del genoma identificó alteraciones genómicas somáticas y ensayos personalizados cuantificaron el ADN tumoral circulante (ADNcf) en muestras de plasma recolectadas en serie.

En el 2016 Underhill y colaboradores de diversas universidades de Estados Unidos, definieron las diferencias de longitud de los fragmentos del ADN circulante tumoral (ADNct) y el ADN libre proveniente de células normales. Análisis previos

realizados con modelos animales para el estudio de glioblastoma mostraron que piezas de ADN tumoral tienen un tamaño inferior que los correspondientes a células sanas. Particularmente los primeros son entre 20 y 50 pares de bases más cortos. Este hallazgo fue posteriormente revalidado en ratas modelo de cáncer de hígado, lo que sugirió a los autores que dicha diferencia de longitud podría ser una constante para los diversos tipos de cáncer, sin embargo, aún era desconocido si esto se replicaba para los casos de seres humanos.

Para averiguarlo, los investigadores compararon el ADNct de pacientes con melanoma y el material genético de personas sanas, evidenciando que la variabilidad nucleotídica también era una característica distintiva entre ambos componentes, adicionalmente, mediante técnicas de secuenciación se observó que los fragmentos de ADN que poseen mutaciones, son más pequeños que las secuencias libres de tales anomalías (Underhill., y cols., 2016).

Posteriormente, gracias al desarrollo tecnológico, se ha logrado observar un aumento en los niveles del ADN circulante de personas con distintas condiciones patológicas, incluyendo inflamación, infección, insuficiencia cardiaca, insuficiencia respiratoria severa, embolismo pulmonar, enfermedades autoinmunes y cáncer, en comparación con los niveles que presentan las personas sanas. (Gil., y cols., 2017).

En cuanto a los métodos posteriores se evidencia que intentan eliminar artefactos durante la secuenciación para aumentar la sensibilidad analítica bioinformática de la detección de alelos mutantes, las técnicas anteriores explotan las aparentes diferencias de tamaño entre el ADNct y el ADNcf, en particular, estudios previos basados en amplicones demostraron que el ADNct está muy fragmentado y ocurre con mayor frecuencia en tamaños de 400 pb (Husain., y cols., 2017).

Durante la muerte celular, el ADN que no está contenido dentro de una membrana (es decir, ADN libre de células) ingresa a la circulación. La detección de ADN libre de células procedente de tumores sólidos (es decir, ADN tumoral circulante, ADNct), particularmente tumores sólidos que no han metastatizado, ha demostrado ser un desafío debido al fondo relativamente abundante de ADN libre de células que se produce normalmente y se deriva de células sanas (Husain., y cols., 2017).

En el 2017 Jillian Phallen y especialistas del Centro de Cáncer Kimmel de la Universidad Johns Hopkins, desarrollaron una aproximación llamada secuenciación dirigida de corrección de errores (TEC-Seq) que permite la evaluación directa ultrasensible de los cambios de secuencia en el ADN circulante libre de células usando secuenciamiento masivo paralelo, mediante la evaluación de pacientes con cáncer colorrectal, de mama, pulmonar, o de ovario, se detectaron mutaciones somáticas en más del 58% de los individuos quienes se encontraban en estadio I o II.

Los análisis de las mutaciones del ADN circulante revelaron una alta concordancia con alteraciones en los tumores de estos pacientes. En los afectados con cáncer colorrectal resecable, elevadas cantidades de ADN tumoral circulante preoperatorio se asociaron con la recurrencia de la enfermedad y disminuyeron globalmente la supervivencia (Phallen., y cols., 2017).

En conclusión, estos resultados proporcionan evidencia convincente respecto a que el aislamiento y caracterización experimental de un subconjunto específico de fragmentos de ADN en estado libre proveniente de células anómalas puede mejorar la detección sanguínea del material genético tumoral para otorgar un diagnóstico temprano del cáncer. Además la Organización de Naciones Unidas pronosticó durante el último cambio de siglo que la población mundial llegaría a 8,3 millones en 2030. Esta información ha permitido prever que para el 2040 el número de casos incidentes de cáncer alcanzaría los 29,5 millones, y las muertes relacionadas alcanzarían los 16,4 millones cada año. El desarrollo del cáncer sigue la senda de la humanidad (Phallen., y cols., 2017).

El pasado, como el futuro, es indefinido y existe sólo como un espectro de posibilidades, dentro de ellas, la oncología ha abierto las puertas para la formulación de vacunas terapéuticas hechas a la medida, capacitadas para reformular mutaciones aleatorias propias de cada individuo. Comparando las secuencias de ADN tumoral con las de células sanas, se pueden seleccionar aquellas alteraciones que tienen una mayor probabilidad de provocar fuertes reacciones inmunológicas en el hospedero. La mayoría de estas vacunas son partículas de ARN mensajero capaces de forjar instrucciones para crear proteínas específicas, en este caso un antígeno tumoral que

prepara al sistema inmune adaptativo contra el tumor (Global Oncology Trends 2019).

En el año 2020, 1,8 millones de personas murieron de cáncer de pulmón en todo el mundo. En América del Sur la situación es alarmante por el incremento en la incidencia de la enfermedad y la mortalidad exagerada de la cual no se vislumbra un descenso, a diferencia de lo que sucede en algunos países como Estados Unidos y Canadá donde la enfermedad ha alcanzado una fase de meseta (Organización de Naciones Unidas., 2021).

El cáncer y la diabetes se diagnostican en el mismo individuo con más frecuencia de lo que se esperaría por casualidad, incluso después de tomar en cuenta la edad de los pacientes. Ambas enfermedades son complejas, con múltiples subtipos. La diabetes generalmente se divide en dos subtipos principales, tipo 1 y tipo 2, junto con tipos menos comunes, mientras que el cáncer generalmente se clasifica según su origen anatómico (de los cuales hay más de 50, linfoma, leucemia, cáncer de pulmón y de mama), dentro de los cuales puede haber múltiples subtipos (p. ejm, leucemia). Además, las fisiopatologías subyacentes tanto al cáncer como a la diabetes no se comprenden completamente (con raras excepciones), (Instituto Nacional del Cáncer., 2021).

Cabe resaltar que una mayor cantidad de ADN libre de células en la circulación se ha asociado con tumores sólidos malignos, estudios longitudinales han informado reducciones en la cantidad de ADN libre de células en respuesta a la terapia y elevaciones asociadas con la recaída, lo que sugiere que la cuantificación del ADN libre de células puede ser útil para monitorear el estado de la enfermedad. (Jaraba., y cols., 2021).

Sin embargo, la cuantificación del ADN libre de células como marcador de enfermedad y su extensión ha sido limitada. La cantidad de ADN libre de células no se ha correlacionado bien con el estadio y el subtipo histológico. Además, se han descrito grandes variaciones entre sujetos en la cuantificación del ADN libre, lo que lleva a una superposición entre enfermedades malignas, tumores benignos y controles sanos, además una mayor cantidad de ADN libre de células no es específica del

cáncer y se ha asociado con otras afecciones, como enfermedades autoinmunes y exposiciones ambientales (Jaraba., y cols., 2021).

Es de destacar que excepto en pacientes con enfermedad metastásica avanzada, el ADN libre de células derivado de tumores (es decir, ADN tumoral circulante, ADNct) forma sólo una pequeña minoría del ADN libre de células en circulación en un contexto de fragmentos derivados en su mayoría de células normales. Por lo tanto, la cuantificación del ADN libre por sí sola tiene poco valor pronóstico. Los enfoques emergentes para mejorar la detección de ADNct incluyen estrategias basadas en amplicones (Fragmento de ADN amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) o cualquier otro proceso que dé lugar a la producción de diferentes copias de ese fragmento), (Jaraba., y cols., 2021).

Por otro lado, estudios epidemiológicos observacionales demuestran que niveles más altos de actividad física se asocian con un menor riesgo de cáncer de colon, mama posmenopáusico y endometrio. La actividad física también puede ayudar a prevenir otros cánceres, incluido el de pulmón y el de próstata agresivo, pero hasta la fecha no se ha establecido un vínculo claro. Alguna evidencia también sugiere que la actividad física después del diagnóstico puede mejorar la supervivencia de algunos cánceres, incluidos los de mama y colorrectal. Actualmente se están llevando a cabo investigaciones para proporcionar una comprensión más clara de estos posibles vínculos, y esta información puede ser relevante para la prevención y el manejo óptimo del paciente (Parra., y cols., 2021).

Estos avances han sido el resultado de extraordinarios adelantos en la investigación clínica básica. La medicina traslacional ha llevado el conocimiento del laboratorio a la práctica clínica y requiere una estrecha interacción entre investigadores y médicos. La descripción de los genes, proteínas y microambiente que caracterizan a los tumores proporciona información específica para facilitar el diagnóstico y proporcionar el tratamiento más eficaz, implementando la medicina personalizada (Parra., y cols., 2021).

Al concluir que el Cáncer es curable cuando se diagnostica a tiempo y se trata en etapas tempranas, entonces es lógico y deseable realizar un programa de

detección precoz o tamizaje al contar con la tecnología, prestar un servicio de salud gratuito, así como tener identificada la población de riesgo a través de los programas que existen en la atención primaria como primer eslabón de atención en el sistema nacional de salud.

Bases Teóricas

1. El Ácido Desoxirribonucleico (ADN)

El ADN, o ácido desoxirribonucleico, es el material que contiene la información hereditaria. Casi todas las células del cuerpo de una persona tienen el mismo ADN. La mayor parte del ADN se encuentra en el núcleo celular (o ADN nuclear), pero también se encuentra una pequeña cantidad de ADN en las mitocondrias (ADN mitocondrial o ADNm), estas son estructuras dentro de las células que convierten la energía de los alimentos para que las células la puedan utilizar (Rodríguez., y col., 2021).

La información en el ADN se almacena como un código compuesto por cuatro bases químicas, adenina (A), guanina (G), citosina (C) y timina (T). El ADN humano consta de unos 3 mil millones de bases, y más del 99 por ciento de esas bases son iguales en todas las personas. El orden o secuencia de estas bases determina la información disponible para construir y mantener un organismo, similar a la forma en que las letras del alfabeto aparecen en un cierto orden para formar palabras y oraciones (Martínez., 2010).

Una propiedad importante del ADN es que puede replicarse o hacer copias de sí mismo, cada hebra de ADN en la doble hélice puede servir como patrón para duplicar la secuencia de bases. Esto es fundamental cuando las células se dividen, porque cada nueva célula necesita tener una copia exacta del ADN presente en la célula antigua (Maston., y cols., 2006).

El ADN codifica la información genética mediante combinaciones de las bases, de forma que cada secuencia correlativa de 3 bases (triplete), que se denomina codón, que codifica un aminoácido. Así, el codón AUG corresponde a la metionina, y también es el que marca el sitio donde se inicia la lectura para el ARN mensajero (ARNm), copiará el mensaje de los genes para trasladarlo al citoplasma, donde se formará la proteína que codifica cada gen. También hay 3 grupos de tripletes (UAA, UGA, UAG) que constituyen codones de parada. Como las bases son 4, se pueden producir $4^3=64$ combinaciones diferentes. Sin embargo, como los aminoácidos son 20, el código genético es redundante porque varias combinaciones de tripletes codifican un mismo aminoácido (Martínez., 2010).

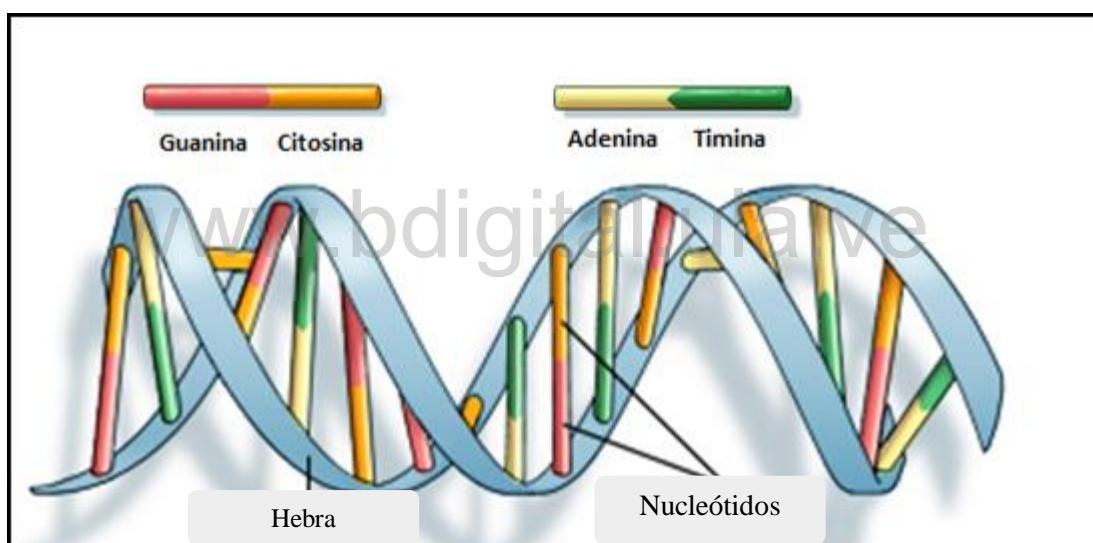


Figura 1: Estructura de doble hélice del ADN.

Fuente: U.S National Library of Medicine.

El código genético posee una serie de características básicas, que son:

- Universalidad: Los organismos vivientes comparten el código genético, desde virus y bacterias hasta las personas, plantas y animales. Esto significa que un codón específico está asociado a un mismo aminoácido, sin importar de qué organismo se trate. Se conocen 22 códigos genéticos diferentes, que son variantes del código genético estándar en apenas uno o dos codones, (Martínez., 2010).

- Especificidad: Es sumamente específico, es decir, ningún codón codifica más de un aminoácido, sin que se produzcan solapamientos, aunque en algunos casos puede haber distintos codones de inicio, que permiten sintetizar proteínas diferentes a partir de un mismo código, (Martínez., 2010).
- Continuidad: Es continuo y no posee interrupciones de ningún tipo, siendo una larga cadena de codones que siempre se transcribe en el mismo sentido y dirección, desde el codón de inicio al de parada, (Martínez., 2010).
- Degeneración: Posee redundancias, pero nunca ambigüedades, es decir, dos codones pueden corresponder a un mismo aminoácido, pero nunca un mismo codón a dos aminoácidos distintos. Así, hay más codones distintos de lo mínimamente necesario para almacenar la información genética, (Martínez., 2010).

El codón de inicio determina el marco de lectura, es decir la manera en que la secuencia del ARNm se divide en grupos de tres nucleótidos dentro del ribosoma, asegurando que se produzca el polipéptido correcto. Las proteínas se componen a veces de cientos de aminoácidos. Así que el código de una proteína podría contener cientos, a veces incluso miles, de tripletes. Los 64 codones que codifican 20 aminoácidos incluyendo el codón de inicio y los codones de parada se observan en la figura 2, (Illana., 2014).

Segunda letra				Tercera letra		
U	C	A	G			
Primera letra	U	UUU } Phe UUC } UUA } Leu UUG }	UCU } Ser UCC } UCA } UCG }	UAU } Tyr UAC } UAA } Alto UAG }	UGC } Cys UGC } UGA } Alto UGG }	UC } CA } A }
	C	CUU } Leu CUC } CUA } CUG }	CCU } Pro CCC } CCA } CCG }	CAU } His CAC } CAA } Gln CAG }	CGU } CGC } CGA } Arg CGG }	UC } CA } A }
	A	AUU } Ile AUC } AUA } AUG }	ACU } Thr ACC } ACA } ACG }	AAU } Asn AAC } AAA } Lys AAG }	AGU } Ser AGC } AGA } Arg AGG }	UC } CA } A }
	G	GUU } Val GUC } GUA } GUG }	GCU } Ala GCC } GCA } GCG }	GAU } Asp GAC } GAA } Glu GAG }	GGU } Gly GGC } GGA } GGG }	UC } CA } A }

Figura 2: Tipos de Codones y Aminoácidos

Fuente: "The genetic code", de OpenStax College, Biología (CC BY 3.0).

1.1 Proporciones de las Bases Nitrogenadas: Reglas de Chargaff

Al principio se pensaba que los ácidos nucleicos eran la repetición monótona de un tetranucleótido, de forma que no tenían variabilidad suficiente para ser la molécula biológica que almacenara la información. Sin embargo, Chargaff demostró que las proporciones de las bases nitrogenadas eran diferentes en los distintos organismos, aunque seguían algunas reglas. Estas reglas de Chargaff se cumplen en los organismos cuyo material hereditario es ADN de doble hélice y son las siguientes, (Chargaff., y cols., 1950):

- La proporción de Adenina (A) es igual a la de Timina (T). $A = T$, por lo tanto la relación entre ambas es igual a la unidad ($A/T = 1$).
- La proporción de Guanina (G) es igual a la de Citosina (C). $G = C$, por lo tanto la relación entre ambas es igual a la unidad ($G/C = 1$).
- La proporción de bases púricas ($A+G$) es igual a la de las bases pirimidínicas ($T+C$), por lo tanto, $(A+G) = (T + C)$. Esto indica que la relación entre $(A+G)$ y $(T+C)$ es igual a la unidad $(A+G) / (T+C) = 1$.
- Además, la proporción entre $(A+T)$ y $(G+C)$ es característica de cada organismo, pudiendo tomar por tanto, diferentes valores según la especie estudiada. Este resultado indica que los ácidos nucleicos no son la repetición monótona de un tetranucleótido. Si no que existe variabilidad en la composición de bases nitrogenadas.

1.2. Propiedades Fisicoquímicas De los Ácidos Nucleicos

Entre las propiedades fisicoquímicas del ADN encontramos la densidad, y la Absorbancia.

1.2.1. Densidad: Existe una relación lineal entre el contenido en G+C y la densidad del ADN determinada en un gradiente de densidad. A mayor contenido en G+C mayor densidad posee el ADN, (Smith., 1951).

1.2.2. Absorbancia a 260 nm: El estado físico de los ácidos nucleicos está relacionado con su capacidad de absorción de la luz ultravioleta (UV) a 260 nm.

El menor grado de absorción se produce en estado de doble hélice, la absorción aumenta cuando se produce la desnaturalización pasando a estado de hélice sencilla (efecto hipocrómico, aumento de la absorbancia) y, por último, si degradamos este ADN de hélice sencilla a nivel de nucleótidos libres, de nuevo aumenta la absorbancia, (Smith., y cols., 1951).

Por tanto, la absorbancia a 260 nm se puede utilizar como una medida del estado físico de la molécula de ADN. Las curvas de fusión tienen forma de S observándose un aumento brusco de la absorbancia al llegar a una temperatura determinada llamada temperatura de fusión en la cual el 50% del ADN tiene sus hebras separadas conllevando a la desnaturalización, la proporción A+T/C+G está relacionada en primer lugar con la estabilidad de la molécula de ADN de doble hélice. Cuanto mayor es el contenido en G+C de una molécula, mayor cantidad de pares G-C presentará, como consecuencia tendrá una mayor cantidad de triples enlaces y, por consiguiente, será necesario suministrar una mayor cantidad de energía a esa doble hélice para separar sus dos hebras (desnaturalización o fusión del ADN), (Smith., y cols., 1951).

Lo anterior indica que cuanto mayor es el contenido en G+C, mayor es la cantidad de calor que hay que suministrar a un ADN de doble hélice para desnaturalizarlo. La temperatura de fusión necesaria para desnaturalizar la mitad del ADN de una mezcla (punto medio de la reacción ADN doble hélice ® ADN hélice sencilla) está directamente relacionada con el contenido en G+C, a mayor contenido en G+C mayor temperatura de fusión (Smith., y cols., 1951).

2. Funciones del ADN.

Entre las principales funciones que presenta el ADN encontramos: Almacenar información (genes y genoma completo), producir proteínas (transcripción y traducción) y duplicarse para garantizar que la información se transmita a las células hijas durante la división celular (Illana., 2014).

2.1. Estructura del ADN.

El ADN está organizado en cromosomas. En las células eucariotas los cromosomas son lineales, mientras que los organismos procariotas, como las

bacterias, presentan cromosomas circulares. Para cada especie, el número de cromosomas es fijo. Por ejemplo, los seres humanos tienen 46 cromosomas en cada célula somática (no sexual), agrupados en 23 pares, de los cuales 22 son autosomas y un par es sexual. Una mujer tendrá un par de cromosomas sexuales XX y un varón tendrá un par XY, (Illana., 2014).

Cada cromosoma tiene dos brazos, ubicados por arriba y por debajo del centrómero. Cuando los cromosomas se duplican, previo a la división celular, cada cromosoma está formado por dos moléculas de ADN unidas por el centrómero, conocidas como cromátidas hermanas, (Illana., 2014).

El ADN se compone de dos cadenas, cada una formada por nucleótidos. Cada nucleótido, a su vez, está compuesto por un azúcar (desoxirribosa), un grupo fosfato y una base nitrogenada. Las bases nitrogenadas son cuatro: adenina (A), timina (T), citosina (C), y guanina (G), y siempre una A se enfrenta a una T y una C se enfrenta a una G en la doble cadena. Las bases enfrentadas se dice que son complementarias. El ADN adopta una forma de doble hélice, como una escalera caracol donde los lados son cadenas de azúcares y fosfatos conectadas por “escalones”, que son las bases nitrogenadas. La molécula de ADN se asocia a proteínas, llamadas histonas, y se encuentra muy enrollada y compactada para formar el cromosoma, (Illana., 2014).

La doble hélice de ADN con las bases nitrogenadas complementarias que se ubican hacia dentro y establecen uniones no covalentes (o fuerzas de atracción) entre sí que mantienen la estructura de la molécula. Las desoxirribosas (azúcares) y los grupos fosfato constituyen las columnas de la molécula, (Illana., 2014).

Cuando la célula se divide, cada nueva célula que se forma debe portar toda la información genética, que determine sus características y funciones. Para eso, antes de dividirse, el ADN debe replicarse, es decir generar una copia de sí mismo. Durante la replicación, la molécula de ADN se desenrolla, separando sus cadenas. Cada una de estas servirá como molde para la síntesis de nuevas hebras de ADN. Para eso, la enzima ADN-polimerasa coloca nucleótidos siguiendo la regla de apareamiento A-T y C-G. El proceso de replicación del ADN es semiconservativo, ya que al finalizar la duplicación, cada nueva molécula de ADN estará conformada por una hebra “vieja”

(original) y una nueva. ¿Cómo se interpretan las instrucciones escritas en el ADN?, (Illana., 2014).

La información está guardada en el ADN en el código de secuencia de bases A, T, C y G que se combinan para originar “palabras” denominadas genes. Los genes son fragmentos de ADN cuya secuencia nucleotídica codifica para una proteína, es decir que a partir de la información “escrita” en ese fragmento de ADN se fabrica (sintetiza) un tipo particular de proteína. Aunque, en realidad, los genes también llevan la información necesaria para fabricar moléculas de ARN (ribosomal y de transferencia) que intervienen en el proceso de síntesis de proteínas, el ARN (ácido ribonucleico) es una molécula con una estructura similar al ADN, (Illana., 2014).

Un gen no es una estructura que se vea sino que se define a nivel funcional, es una secuencia que va a empezar en algún lugar del cromosoma y va a terminar en otro, para conocer un gen, se determina la cantidad de los nucleótidos que lo forman y el orden en que se ubican, (Illana., 2014).

Todas las células de un organismo tienen el mismo genoma, o conjunto de genes. Pero, en cada célula se expresan los genes que se usan, por ejemplo, aunque una célula de la piel tiene toda la información genética al igual que la célula del hígado, en la piel solo se expresarán aquellos genes que den características de piel, mientras que los genes que dan características de hígado, estarán allí “apagados”. Por el contrario, los genes que dan rasgos de “hígado” estarán activos en el hígado e inactivos en la piel, lo que no se usa se encuentra mayormente compactado, este empaquetamiento puede ser temporal o definitivo, (Illana., 2014).

2.2. La síntesis de proteínas.

Las proteínas son macromoléculas que cumplen funciones variadas, hay proteínas estructurales, otras son enzimas, otras transportan oxígeno como la hemoglobina, hay proteínas involucradas en la defensa inmunitaria, como los anticuerpos y otras que cumplen funciones de hormonas como la insulina, (Pérez., 2003).

Así como el ADN está compuesto a partir de nucleótidos, las proteínas están compuestas a partir de aminoácidos. Hay 20 aminoácidos diferentes, y cada proteína tiene una secuencia de aminoácidos particular, (Pérez, y cols., 2003).

El proceso de síntesis de proteínas consta básicamente de dos etapas: la transcripción y la traducción, en la primera etapa, las “palabras” (genes) escritas en el ADN en el lenguaje de los nucleótidos se copian o transcriben a otra molécula, el ARN mensajero (ARNm). Luego, en la etapa siguiente, el ARNm se traduce al idioma de las proteínas, el de los aminoácidos, este flujo de información se conoce como el “dogma central de la biología” (Pérez., y cols., 2003).

2.3. ¿Dónde se encuentra el ADN?

El ADN se encuentra en dos lugares dentro de cada célula: en mayor medida, en el núcleo de la célula (concretamente, en los cromosomas) y en una menor medida, en las mitocondrias. De ahí los términos ADN nuclear y ADN mitocondrial, respectivamente, (Piro., 2014).

3. Tipos de ADN.

3.1. Lineal Vs Circular:

Por la forma que puede presentar se podría encontrar en forma circular como en las bacterias o lineal en algunos tipos de virus, en cada una de nuestras células se encuentran estos dos tipos de ADN, en el núcleo tenemos ADN lineal y en las mitocondrias el ADN es circular. Encontrar ADN circular en el núcleo o extracelularmente puede tener serias implicaciones relacionadas a la homeostasis celular. En tal sentido en recientes estudios, se ha comprobado que el ADN circular en células tumorales promueve de una manera más rápida la expresión de oncogenes, siendo más resistentes ante diferentes tratamientos. (Instituto Nacional del Cáncer., 2021).

Esta inestabilidad ocurre en muchos tipos de cáncer, la causa de la inestabilidad genómica son defectos en determinados procesos que controlan la forma en que la

célula se divide. Ejemplos de estos defectos son las mutaciones en determinados genes que participan en la reparación del daño al ADN, o los errores que no se corrigen cuando el ADN se copia en la célula. Otros defectos son cromosomas rotos, faltantes, cromosomas en anillo, reordenados o adicionales (Instituto Nacional del Cáncer., 2021).

3.2. Los tipos de ADN según la estructura:

Por la estructura que presenta el ADN, también se podría obtener una clasificación ya sea monocatenario (formado por una sola hebra) o bicatenario (formado por dos hebras). De acuerdo a su estructura, también se pueden encontrar diferentes categorías, según su conformación se logra distinguir 3 tipos de ADN por tener determinadas secuencias que se enrollan algo diferente o fuera de lo normal. Es decir, que en zonas en las que hay muchos pares de bases repetidos, y estas abultan más unas que otras, pueden afectar la armonía del giro teórico perfecto (Piro., 2014).

ADN-B: Es el más común entre los seres vivos. Sigue una estructura regular con la forma de doble hélice mencionada anteriormente.

ADN-A: es propio de condiciones secas, carentes de humedad y con bajas temperaturas. Las proporciones de los surcos varían, presentando una estructura más abierta.

ADN-Z: se trata de una doble hélice más fina y larga que las otras dos.

Hasta ahora se ha mencionado los Tipos de ADN más comunes y abundantes en la célula. Sin embargo, en los últimos años se han publicado un conjunto de evidencias que demostraron la presencia de un tipo de ADN con características particulares en líquidos extracelulares y se denominó ADN circulante.

3.3. ADN Circulante

El ADN circulante se precisa como un conjunto de moléculas de cadena sencilla o doble, cuya longitud abarca desde menos de 500 hasta 21 mil pares de bases. Se encuentra circulando fuera de las células en distintos líquidos corporales. El amniótico (que rodea a un feto en el útero), el pleural (que lubrica la pleura,

membrana que recubre la cavidad torácica y rodea los pulmones), el sinovial (que reduce la fricción entre las articulaciones) y la orina, aunque la mayoría de los estudios al respecto se han enfocado en su detección en el plasma y suero sanguíneos. El análisis del ADN circulante es una técnica poco invasiva por lo que numerosos estudios se centran en sus aplicaciones clínicas. (Torres., Pérez, 2018).

3.3.1 ADN circulante normal: Formado por fragmentos de ADN degradados que provienen del proceso de apoptosis o necrosis de las células nucleadas normales del organismo, principalmente las células hematopoyéticas (Ezquerro., 2008)

3.3.1.1 Aplicaciones del ADN circulante normal

El ADN circulante normal puede ser utilizado para hacer un seguimiento de la evolución de un órgano tras su implantación en el paciente. Para ello se parte de la base de que un rechazo provocará una reacción inmune del receptor contra el órgano implantado, que llevará a una alta tasa de muerte en las células del órgano implantado. Como consecuencia de esta muerte celular se libera ADN al torrente sanguíneo. Para realizar el seguimiento se hace una cuantificación del ADN libre del injerto, permitiendo detectar episodios de rechazo en estadios tempranos, cuando otras técnicas de diagnóstico no son efectivas. Se trata de un método no invasivo que permite la monitorización a intervalos deseados para detectar rechazos en los primeros pasos y evitar un rechazo posterior total. Por ende este biomarcador podría ser particularmente valioso para minimizar la inmunosupresión. En la actualidad se están llevando a cabo estudios en hígado, corazón y riñón para establecer este seguimiento en las clínicas (Beck., y cols, 2015).

3.3.1.1.1 Monitorización del tratamiento del Lupus

Eritematoso Sistémico (LES).

El lupus eritematoso sistémico es una enfermedad autoinmune crónica. Al igual que en otras enfermedades autoinmunes, estudios recientes han demostrado porcentajes elevados de ADN circulante en los pacientes con LES. También se ha observado una disminución del nivel de ADN circulante después de la terapia en aquellos pacientes que respondieron al tratamiento, esto abre la posibilidad de que

este ADN sea utilizado como marcador del seguimiento del tratamiento (Hendy y col., 2016).

3.3.1.1.2. Pronóstico y monitorización de traumas

El ADN circulante es un posible marcador de muerte celular por lo que existe la posibilidad de usar las altas concentraciones de ADN libre que teóricamente resulten de las lesiones y muerte celular ocasionadas por algún trauma. Por ejemplo, se han estudiado concentraciones de ADN en la sangre de personas a las que se les diagnosticó infarto de miocardio, condición que se inicia con una falta de oxígeno y que si se prolonga resulta en necrosis. En ellos se observaron niveles más altos de ADN circulante que los encontrados en personas sanas, además, las concentraciones elevadas de ADN circulante pudieron relacionarse con la severidad de la lesión y el desarrollo de complicaciones post-traumáticas. Por tanto, el ADN circulante tiene el potencial clínico para ser utilizado en el pronóstico y supervisión de personas que han padecido algún tipo de lesión física (Bronkhorst., y cols., 2015).

3.3.2. ADN circulante fetal: Es el ADN proveniente del feto y que circula libremente en el torrente sanguíneo de la madre. Este ADN es de origen mayoritariamente placentario y se ha demostrado su presencia en etapas tempranas del desarrollo (a las 6 semanas de gestación) cuando aún no existe unión de la circulación feto-materna (Ezquerro., y cols, 2008).

3.3.2.1. Aplicaciones del ADNcf fetal

El ADNcf fetal permite diagnosticar y estudiar diferentes mutaciones puntuales, sin la necesidad de realizar procedimientos invasivos que pongan en riesgo la salud de la madre o del niño. Este ADN comienza a estar presente en la sangre materna a partir de la sexta semana de embarazo. A pesar del alto grado de fragmentación, todo el genoma fetal se encuentra representado en el plasma materno, esto implica que, a priori, cualquier defecto genético puede ser estudiado en el ADN libre fetal presente en la sangre materna.

En la actualidad a través del análisis del ADN circulante fetal se determina por ejemplo el sexo del feto, el factor RhD fetal cuando la madre es Rh- con el fin de descartar la enfermedad hemolítica del recién nacido, enfermedades monogénicas, enfermedades de herencia dominante, enfermedades de herencia recesiva y estudio de aneuploidías fetales (Rodríguez., y col., 2012).

3.3.3. ADN circulante tumoral: Se origina directamente desde el tumor o las células tumorales circulantes. El ADN tumoral circulante aumenta en cantidad conforme avanzan los estadios del cáncer y sus alteraciones moleculares permiten diferenciarlo del ADN circulante normal (Ezquerro., y cols, 2008).

3.3.3.1. Aplicaciones del ADN circulante tumoral.

La biopsia líquida se basa en el análisis del ADN circulante tumoral en sangre. Respecto a la biopsia de tejido, presenta grandes ventajas como la fácil obtención de la muestra, la reducción de costos, menor tiempo de procesamiento, posibilidad de estudios seriados a lo largo del proceso, posibilidad de mantener las muestras durante largos períodos de tiempo, posibilidad de estudiar la heterogeneidad tumoral, facilidad para la evaluación de la respuesta al tratamiento, entre otros (Crowley., y cols., 2013).

Sus aplicaciones más relevantes son la detección temprana de cáncer, la detección de recurrencia en cáncer localizado, la predicción de la respuesta al tratamiento en cáncer metastásico, la identificación de mecanismos de resistencia en cánceres refractarios y la monitorización de la respuesta en cáncer metastásico. A lo largo del último año, numerosos estudios han evaluado la utilización del ADN tumoral circulante en el diagnóstico y pronóstico del cáncer, bajo las conocidas biopsias líquidas. Un nuevo estudio, dirigido por investigadores de la Universidad de Washington y el Howard Hughes Institute, podría abrir el camino hacia su utilización en otros tipos de condiciones clínicas, al identificar marcas en el ADN libre asociadas a su origen celular y tisular (Husain., y cols, 2017).

4 El Cáncer

El cáncer es un término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo, cuya característica definitoria es la multiplicación rápida de células anormales de forma coordinada y autónoma, que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo propagarse a otros órganos, o diseminarse por todo el organismo. Es una enfermedad heterogénea que no se limita a variaciones entre individuos, sino, presenta diferencias dentro de una misma persona, dentro de un mismo tumor (Organización Mundial de la Salud, 2022). En condiciones normales, las células humanas se forman y se multiplican (mediante un proceso denominado división celular) para formar células nuevas a medida que el cuerpo las necesita, cuando las células envejecen o se dañan, mueren y las células nuevas las reemplazan, (American Cancer Society., 2020).

A veces el proceso no sigue este orden y las células anormales o células dañadas se forman y se multiplican cuando no deberían, estas células tal vez formen tumores, que son bultos de tejido, los tumores son cancerosos (malignos) o no cancerosos (benignos).

Los tumores cancerosos se diseminan por los tejidos cercanos, también podrían viajar más lejos a otras partes del cuerpo y formar tumores, proceso denominado metástasis. Hay muchos tipos de cáncer que forman tumores sólidos, pero los cánceres de la sangre, como la leucemia, en general no forman tumores sólidos.

Los tumores benignos no se diseminan a los tejidos cercanos, cuando se extirpan, no suelen volver, mientras que los tumores cancerosos a veces vuelven. Los tumores benignos en ocasiones son bastante grandes. Algunos podrían causar síntomas graves o poner en peligro la vida de las persona, como los tumores benignos en el cerebro o el encéfalo (Instituto Nacional del Cáncer., 2021).

El cáncer es esencialmente una enfermedad de división celular incontrolada. Su desarrollo y progresión suelen estar vinculados a una serie de cambios en la actividad de los reguladores del ciclo celular. Por ejemplo, los inhibidores del ciclo celular evitan que las células se dividan cuando las condiciones no son las adecuadas, por lo

que la reducción de la actividad de estos inhibidores puede promover el cáncer. Del mismo modo, los reguladores positivos de la división celular, pueden conducir al cáncer si son demasiado activos. En la mayoría de los casos, estos cambios en la actividad se deben a mutaciones en los genes que codifican proteínas reguladoras del ciclo celular. Los cambios genéticos llevan al cáncer si alteran la forma en que las células se multiplican y diseminan (Cheng., y cols., 2012).

La mayoría de los cambios en el ADN ocurren en los genes, que son secciones de ADN que contienen las instrucciones para crear proteínas o ácido ribonucleico (ARN), como el microARN. En concreto, algunos cambios en el ADN suben las concentraciones de las proteínas que avisan a las células que se sigan multiplicando, otros cambios en el ADN bajan las concentraciones de las proteínas que avisan a las células que dejen de multiplicarse. Y algunos cambios en el ADN frenan las proteínas que avisan a las células que se autodestruyan cuando están dañadas (Leary., y cols., 2012).

Los científicos piensan que, para que una célula sana se vuelva cancerosa, se necesita más de un cambio en el ADN, en las personas que heredan un cambio genético relacionado con el cáncer, se necesitan menos cambios adicionales para que se forme el cáncer. Pero quizás nunca tengan estos cambios o nunca tengan cáncer. A medida que las células cancerosas se multiplican, adquieren más cambios de ADN con el tiempo. Dos células cancerosas en el mismo tumor podrían presentar diferentes cambios de ADN. Además, cada persona con cáncer posee una combinación única de ADN en el cáncer (Trujillo., 2020).

Hay muchos tipos de cambios genéticos que conducen al cáncer, un cambio genético, que se llama mutación o variante genética en el ADN, es un cambio en el código del ADN, como si fuera una falta ortográfica en la secuencia de letras del ADN. Algunas variantes solo afectan a una letra del ADN, que se llama nucleótido. A veces falta un nucleótido o lo reemplaza otro nucleótido. Estas se conocen como mutaciones puntuales, por ejemplo, alrededor del 5 % de las personas con cáncer tienen una mutación puntual en el gen KRAS que reemplaza la letra G por la A en el ADNnotificación de salida. Este cambio de una sola letra crea una proteína KRAS

anormal que ordena a las proteínas que se multipliquen todo el tiempo (Muñoz., 1997).

Los cambios genéticos que causan cáncer también ocurren cuando los segmentos de ADN (que a veces son muy grandes) se reordenan, eliminan o copian. Estos se llaman reordenamientos cromosómicos. Por ejemplo, la mayoría de las leucemias mielógenas crónicas son por un reordenamiento cromosómico que coloca parte del gen BCR al lado del gen ABL. Este reordenamiento produce una proteína anormal, llamada BCR-ABL, que lleva a las células de la leucemia a multiplicarse sin control (Martínez., y cols., 2001).

Algunos cambios en el ADN que causan cáncer ocurren fuera de los genes, en secciones de ADN que actúan como interruptores de "encendido" y "apagado" (que activan o desactivan) los genes cercanos. En el caso de, las células cancerosas de encéfalo algunas poseen numerosas copias de los interruptores de encendido al lado de los genes que estimulan el crecimiento celular. Otros cambios en el ADN son los cambios epigenéticos, que también causan cáncer. A diferencia de las variantes genéticas, los cambios epigenéticos (epimutaciones) no afectan el código del ADN y quizás sean reversibles. Estos cambios epigenéticos afectan la forma en que el ADN se empaqueta o pliega dentro del núcleo. Al cambiar el empaquetamiento del ADN, los cambios epigenéticos alteran la cantidad de proteína que produce un gen (Juvenal., 2014).

Algunos cambios y sustancias químicas en el ambiente que generan cambios genéticos también causan cambios epigenéticos, estas sustancias incluyen el humo del tabaco, metales pesados como el cadmio y el virus de Epstein-Barr. El ADN cambia por un error aleatorio o por un carcinógeno. Estos cambios aparecen en cualquier momento de la vida, incluso estando en el vientre de la madre. Aunque la mayoría de los cambios genéticos no son dañinos por sí solos, la acumulación de cambios genéticos a lo largo de los años podría hacer que las células sanas se vuelvan cancerosas, la gran mayoría de los cánceres surgen así, por casualidad, como resultado de este proceso a lo largo del tiempo (Huanca., 2013).

4.1. Diferencias entre las células cancerosas y las células normales.

Las células cancerosas son muy distintas de las células normales. Las células cancerosas se caracterizan por:

- ✓ Se originan sin recibir señales de que se deben formar. Las células normales solo se forman cuando reciben estas señales.
- ✓ No hacen caso a las señales que indican a las células que dejen de multiplicarse o que deben destruirse. Este proceso se llama muerte celular programada o apoptosis.
- ✓ Invaden áreas cercanas y se diseminan a otras áreas del cuerpo. Las células normales dejan de multiplicarse cuando se encuentran con otras células, y la mayoría de las células normales no se mueven a otras partes del cuerpo.
- ✓ Hacen que los vasos sanguíneos crezcan en dirección a los tumores. Estos vasos sanguíneos llevan oxígeno y nutrientes a los tumores y quitan los productos de desecho de los tumores.
- ✓ Se esconden del sistema inmunitario. El sistema inmunitario suele destruir las células dañadas o anormales.
- ✓ Engañan al sistema inmunitario para seguir vivas y multiplicarse. Algunas células cancerosas logran que las células inmunitarias protejan el tumor en vez de atacarlo.
- ✓ Se ha descrito el fenómeno conocido como Inestabilidad Genómica donde las células cancerosas incorporan numerosos cambios en los cromosomas como partes del cromosoma que se repiten o faltan. Algunas células cancerosas tienen el doble de cromosomas normales.
- ✓ dependen de nutrientes que son distintos a los que necesitan las células normales. Además, algunas células cancerosas crean energía de los nutrientes de formas diferentes a las que usan la mayoría de las células normales, lo que permite que se multipliquen mucho más rápido.

Muchas veces, las células cancerosas adquieren comportamientos anormales y no pueden sobrevivir sin estos, por eso los investigadores aprovechan para idear terapias

que apuntan a las características anormales de las células cancerosas. De esta forma algunas terapias de cáncer evitan que los vasos sanguíneos crezcan en dirección a los tumores, y esto evita que el tumor consiga los nutrientes que necesita (Alberg., y cols., 2003).

En la figura 3 se observan algunos cambios en los genes, que son la unidad física básica de la herencia, causantes del cáncer. Estos cambios en los genes controlan el funcionamiento de las células, en especial, cómo se forman y multiplican

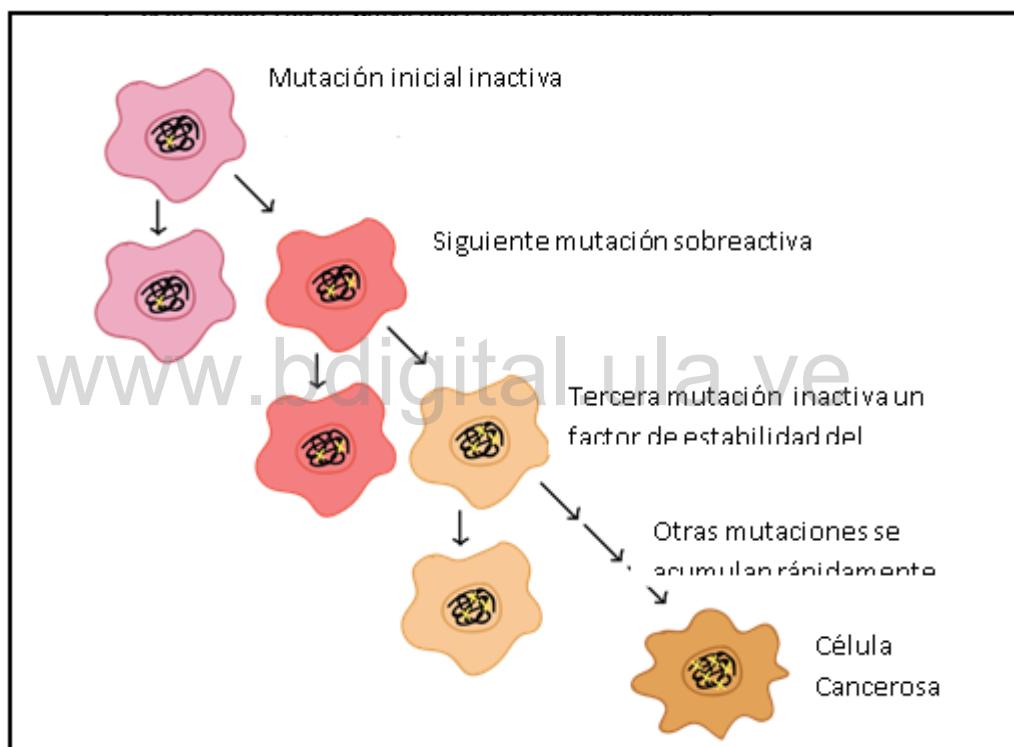


Figura 3: Serie hipotética de mutaciones que llevan al cáncer.

Fuente: Cancer Research UK, 2017.

4.2 ¿Cómo se forma el cáncer?

4.2.1 Entre los cambios genéticos que causan cáncer se encuentran:

- Errores que ocurren cuando las células se multiplican.
- Daños en el ADN por sustancias perjudiciales en el medio ambiente, como las sustancias químicas en el humo del tabaco y los rayos ultravioleta del sol.

- Alteraciones hereditarias de genes que van de generación en generación.

En general, el cuerpo elimina células con daños en el ADN antes de que se vuelvan cancerosas. Pero la capacidad del cuerpo disminuye a medida que las personas envejecen. Por eso el riesgo de cáncer aumenta con la edad (Soca., y cols., 2007)

La teoría de Knudson 1971 (Teoria Multi Hits) establece que el cáncer de cada persona es una combinación única de cambios genéticos. A medida que el cáncer sigue creciendo, ocurren otros cambios. Incluso dentro del mismo tumor, es posible que las diversas células tengan cambios genéticos distintos.

4.3 Cambios no cancerosos en los tejidos.

No todos los cambios en los tejidos del cuerpo son cancerosos, pero sin tratamiento, algunos cambios en los tejidos se podrían volver cancerosos. A continuación se incluyen ejemplos de cambios no cancerosos en los tejidos, que se vigilan porque podrían convertirse en cáncer.

4.3.1 Hiperplasia: Aumento, más rápido de lo normal, del número de células en un tejido del cuerpo que hace que se acumulen demasiadas células. Sin embargo, las células y el tejido se ven normales cuando se observan al microscopio. Hay varias causas de hiperplasia, como la irritación crónica.

4.3.2 Displasia: Afección más avanzada que la hiperplasia. En la displasia, también se acumulan demasiadas células. Las cuales se ven anormales y cambia la estructura del tejido.

En general, mientras más anormal se vean las células y el tejido, más probable es que se convierta en cáncer. Algunos tipos de displasia se deben vigilar o tratar y otros no. Un ejemplo de displasia es el nevo displásico, un tipo de lunar anormal que aparece en la piel. Aunque en la mayoría de los casos no ocurre, a veces el nevo displásico se convierte en melanoma, un tipo de cáncer de piel.

4.3.3 Carcinoma in situ: enfermedad avanzada localizada. Aunque a veces se llama cáncer en estadio 0 (cero), no es cáncer porque las células anormales

no se diseminan al tejido cercano, como ocurre con las células cancerosas. Pero por lo general se trata porque es posible que algunos carcinomas *in situ* se conviertan en cáncer (Instituto Nacional del Cáncer., 2021).

5 Tipos de cáncer.

Hay más de 100 tipos de cáncer, en general los tipos de cáncer llevan el nombre de los órganos o tejidos donde se forma el cáncer. Por ejemplo, el cáncer de pulmón se inicia en el pulmón, y el cáncer de encéfalo se inicia en el encéfalo. A veces el cáncer se describe por el tipo de células que lo formaron como las células epiteliales o las células escamosas. A continuación se describen algunos tipos de cáncer que se nombran según las células específicas en donde comienza el cáncer (Yang., 2009).

Los más comunes son osteosarcoma, leucemia, linfoma, melanoma, tumores de encéfalo y médula espinal, tumores neuroendocrinos, y tumores carcinoides. Los Sarcomas son cánceres que se forman en el hueso y tejidos blandos, como los músculos, la grasa, los vasos sanguíneos, los vasos linfáticos y el tejido fibroso. Las leucemias se encuentran en el tejido de la médula ósea roja y se transforma en células sanguíneas estas pueden ser agudas que son de crecimiento rápido, mientras que las crónicas son de crecimiento lento. Por otro lado los linfomas se inician en los linfocitos, y melanomas se inician en células especializadas que producen melanina, (Yang., 2009).

En cuanto a los tumores de encéfalo y médula espinal hay distintos tipos, estos tumores llevan el nombre de las células en que se forman y el sitio donde aparece el tumor en el sistema nervioso central. Así mismo los tumores de células germinativas se inician en las células que luego forman el esperma o los óvulos. Hay que mencionar, además que los tumores neuroendocrinos surgen de células que liberan hormonas en la sangre y causan diferentes síntomas. Por otro lado los tumores carcinoides son tumores neuroendocrinos de crecimiento lento que se encuentran en el aparato digestivo, el recto y el intestino delgado, (Yang., 2009).

5.1. Carcinoma.

Los carcinomas son el tipo más común de cáncer, consisten de células epiteliales, que son las células que recubren las partes internas y externas del cuerpo. Hay muchos tipos de células epiteliales, las cuales cuando se observan al microscopio, parecen pequeñas columnas, (Romero., y cols., 2021).

Los carcinomas tienen nombres distintos según el tipo de célula epitelial donde se inician:

5.1.1. Adenocarcinoma: Cáncer que se forma en las células epiteliales que producen líquido o moco. El tejido con este tipo de células epiteliales a veces se llama tejido glandular. La mayoría de los cánceres de seno (mama), colon y próstata son adenocarcinomas, (Romero., y cols., 2021).

5.1.2. Carcinoma de células basales: Cáncer que se forma en la capa inferior o de base de la epidermis, que es la capa de piel externa de una persona, (Romero., y cols., 2021).

5.1.3. Carcinoma de células escamosas: Es un cáncer que se forma en las células epiteliales que están justo debajo de la superficie externa de la piel. Las células escamosas también recubren muchos otros órganos, como el estómago, los intestinos, el pulmón, la vejiga y los riñones. Cuando se observan en el microscopio, las células escamosas se ven planas, como si fueran escamas de un pez. Los carcinomas de células escamosas en ocasiones se denominan carcinomas epidermoides, (Romero., y cols., 2021).

5.1.4. Carcinoma de células transicionales: Es un tipo de cáncer que se inicia en un tejido que se llama epitelio transicional o urotelio. Este tejido tiene muchas capas de células epiteliales que se agrandan y achican. Se encuentra en el revestimiento de la vejiga, los uréteres, la pelvis renal, y en otros órganos. Algunos cánceres de vejiga, uréter y riñón son carcinomas de células transicionales (Romero., y cols., 2021).

5.1.5. Mieloma múltiple: El mieloma múltiple es un cáncer que se inicia en las células plasmáticas, otro tipo de célula inmunitaria. Las células plasmáticas anormales, llamadas células de mieloma, se acumulan en la médula ósea y forman

tumores en los huesos de todo el cuerpo. El mieloma múltiple también se llama mieloma de células plasmáticas o enfermedad de Kahler (Charlot., y cols., 2012).

6 El ADN circulante y el Cáncer.

Existen varios métodos para la detección del cáncer pero los mismos son invasivos, por ello en los últimos años se ha estudiado el potencial clínico del ADN circulante, ya que su medición cuantitativa se ha planteado como un marcador que permitiría detectar tumores, a partir de que se demostró que las concentraciones de ADN circulante son mayores en personas con cáncer que en personas sanas (Martínez., 2010).

Estos rasgos, que actualmente pueden detectarse en el ADN que circula en la sangre de personas con cáncer mediante el empleo de tecnologías basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés; técnica con la que se pueden detectar, cuantificar y analizar cantidades muy pequeñas de ácidos nucleicos), pueden reflejar tanto el tamaño del tumor (a mayor masa tumoral, mayor cantidad de ADN tumoral circulante) como el llamado grado histológico (los cambios en la diferenciación celular que van de la mano con los cambios en la actividad de los genes: Activación de oncogenes, inactivación de genes supresores de tumores), la eficacia del tratamiento y el riesgo de recurrencia del cáncer (Gonzales., y cols., 2007).

A medida que crece un tumor, las células mueren y son reemplazadas por otras nuevas. Las células muertas se descomponen y su contenido, incluido el ADN, se libera al torrente sanguíneo. La cantidad de ADNct varía entre las personas y depende del tipo de tumor, su ubicación y, para los tumores cancerosos, la etapa del cáncer (Huanca., 2013).

La detección de ADNct puede ser útil para detectar y diagnosticar un tumor debido a que el ADN del tumor ha pasado por varios cambios genéticos (variantes), lo que lleva al desarrollo del tumor, el ADNct no coincide con exactitud con el ADN de la persona. Encontrar ADN con diferencias genéticas ayuda a la detección de tumores. El diagnóstico del tipo de tumor mediante el ADNct puede disminuir la

necesidad de obtener una muestra del tejido tumoral (biopsia del tumor), lo que puede ser complejo cuando un tumor es de difícil acceso, como es el caso de un tumor cerebral o pulmonar (Riva., y cols., 2017).

Dicho lo anterior, el análisis del genoma de las células tumorales mediante ADNct puede ayudar a los profesionales de la salud en la clasificación del tipo de cáncer (en condiciones ideales el tratamiento se define según las mutaciones presentes en el tumor). Habría que decir también que en el seguimiento del tratamiento una disminución en la cantidad de ADNct sugiere que el tumor se está reduciendo y el tratamiento está funcionando. Así mismo la falta de ADNct en el torrente sanguíneo indica que el cáncer no ha regresado (Riva., y cols., 2017).

En el cáncer de pulmón se conocen muchas mutaciones genéticas, y hay una serie de tratamientos dirigidos a estas mutaciones para intentar detener el crecimiento del tumor. Una biopsia o un análisis del ADNct en plasma ayudarán a los médicos a conocer la composición genética de las células de cáncer de pulmón a través de pruebas moleculares. Estas pruebas moleculares pueden detectar mutaciones genéticas reconocidas presentes en las células cancerosas para ayudar a determinar el mejor tratamiento para cada paciente (Abe., y cols., 2020).

Con respecto a la monitorización del paciente, puede ser necesario realizar pruebas diagnósticas en diversos momentos a lo largo del proceso de tratamiento más allá del diagnóstico inicial, las células de cáncer de pulmón cambian con el tiempo y pueden sufrir nuevas mutaciones que hagan que responda peor al tratamiento inicial; como consecuencia, suele ser necesario realizar más pruebas para identificar los cambios específicos y establecer un nuevo plan terapéutico (Abe., y cols., 2020).

Cuando se tienen que realizar biopsias cada vez que el cáncer evoluciona, los pacientes se someten a un proceso que suele ser incómodo y en ocasiones difícil; en algunos casos, ni siquiera se puede tomar la biopsia del tumor. La extracción de una muestra de sangre para determinar el ADNct puede proporcionar una forma más rápida y menos invasiva de detectar las mutaciones adquiridas por los tumores y determinar qué tratamiento puede ser adecuado como tratamiento futuro.

No obstante, cabe destacar que el análisis de mutaciones en el ADNct está asociado con un riesgo de producir falsos negativos. Por lo tanto, si se obtiene un resultado negativo, este deberá confirmarse analizando una muestra de tumor, la capacidad para mapear mutaciones tumorales en todos los estadios de la enfermedad no solo puede mejorar el conocimiento sobre la evolución de los tumores, sino que también puede mejorar enormemente la terapia dirigida, emparejando al paciente correcto con el tratamiento correcto. Estos recientes desarrollos en las pruebas diagnósticas junto a los nuevos tratamientos que están surgiendo, tienen el potencial de cambiar el curso del tratamiento contra el cáncer de pulmón en los próximos años (Jiménez., 2015).

7 Técnicas de Detección de ADN circulante.

Este ADN circula por el cuerpo portando los marcadores genéticos del tumor. Actualmente hay pruebas que pueden identificar y analizar este ADN para detectar mutaciones genéticas con solo una muestra de sangre. Esta nueva tecnología ofrece una alternativa importante a las biopsias, que son el método tradicional de análisis de mutaciones y que, además, requieren la extracción invasiva de tejido o células del área tumoral (Macher., y cols., 2012). Entre las técnicas de detección se pueden mencionar las siguientes:

- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Electroforesis
- Fluorimetría.
- Espectrofotometría UV-Vis

7.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de laboratorio utilizada para amplificar secuencias de ADN. El método utiliza secuencias cortas de ADN, llamadas primers o cebadores, para seleccionar una secuencia específica del genoma a amplificar. La temperatura de la muestra se aumenta y disminuye repetidamente para ayudar a la ADN polimerasa a duplicar la secuencia del ADN que

está siendo copiado. Con esta técnica se pueden producir millones de copias de la secuencia en estudio en sólo unas pocas horas, la amplificación del ADN permite estudiar la molécula del ADN en detalle a nivel de laboratorio, además es importante resaltar que la qPCR no requiere electroforesis para genotipificar o cuantificar (National Human Genome Research Institute., 2022).

7.2 Electroforesis:

Esta técnica se basa en el movimiento de las moléculas cargadas eléctricamente a través de la superficie hidratada de un gel u otra matriz. Al hacer pasar una corriente sobre el medio, las moléculas con una carga negativa, se mueven hacia el ánodo (+), mientras que las moléculas con carga positiva, se ven atraídas hacia el cátodo (-). Mayormente se usa para separar moléculas de ADN, ARN o proteínas. Los poros del gel o la matriz actúan como un tamiz, lo cual permite que las moléculas más pequeñas se muevan más rápido que las moléculas más grandes. Para determinar el tamaño de las moléculas de una muestra, se usan estándares de tamaños conocidos que se separan en el mismo gel y luego se comparan con la muestra, (Fierro., 2014).

La electroforesis es una técnica interesante en el ámbito de la Oncología, ya que durante el desarrollo del cáncer, pueden producirse fallos en la replicación del ADN, que lleven a la multiplicación de ciertos microsatélites únicamente en las células cancerosas. A este concepto se le conoce como “inestabilidad de microsatélites” y puede servir para monitorear la progresión de un tumor. En el caso del ADN, el ADN es una molécula muy larga, así que no se puede hacer un gel de una molécula entera de ADN de una célula, por ende se debe fragmentar haciendo uso de las enzimas adecuadas, sin embargo la electroforesis por sí sola no es útil, su poder resolutivo requiere amplificar por PCR las zonas de interés, (Fierro., 2014).

7.3 Fluorimetría:

También se le llama Espectroscopía de Fluorescencia. Se utiliza para identificar y determinar las concentraciones de analito en una muestra. Los mecanismos implican la excitación de un haz de luz ultravioleta en las moléculas de un analito específico y

les permiten emitir luz visible. A una longitud de onda, es la absorción molecular de energía luminosa y su reemisión casi instantánea a una longitud de onda más larga y distinta. Varias moléculas son inherentemente fluorescentes, y otras deben modificarse por fluorescencia, (Martínez., y cols., 2006).

Su fundamento es la fluorescencia que es la emisión de radiación por electrones excitados. En el fenómeno de fluorescencia, una molécula absorbe radiación electromagnética y debido a ello los electrones pasan de un estado basal a otra fase de excitación (Martínez., y cols., 2006).

7.4 Espectrofotometría UV-Vis:

Es una técnica analítica que mide las longitudes de onda discretas de luz UV o visible que son absorbidas o transmitidas a través de una muestra en comparación con una muestra de referencia o un blanco. Esta propiedad está influenciada por la composición de la muestra, proporcionando información sobre lo que hay en la muestra y en qué concentración (Matheus., y cols., 2016).

Un espectrofotómetro UV-Vis se basa en el proceso de absorción de la radiación ultravioleta-visible (radiación con longitud de onda comprendida entre los 190 y 750 nm) por una molécula. La absorción de esta radiación causa la promoción de un electrón a un estado excitado, los electrones que se excitan al absorber radiación de esta frecuencia son los electrones de enlace de las moléculas, por lo que los picos de absorción se pueden correlacionar con los distintos tipos de enlace presentes en el compuesto. Debido a ello, la espectrofotometría UV-Vis se utiliza para la identificación de los grupos funcionales presentes en una molécula. Las bandas que aparecen en un espectro UV-Vis son anchas debido a la superposición de transiciones vibracionales y electrónicas. La luz tiene una cierta cantidad de energía que es inversamente proporcional a su longitud de onda. Por lo tanto, las longitudes de onda más cortas de la luz transportan más energía y las longitudes de onda más largas transportan menos energía (Matheus., y cols., 2015).

Se necesita una cantidad específica de energía para promover los electrones de una sustancia a una energía más alta, estado que podemos detectar como absorción. Los electrones en diferentes entornos de enlace en una sustancia requieren una cantidad específica diferente de energía para promover los electrones a un estado de energía más alto, es por eso que la absorción de luz ocurre para diferentes longitudes de onda en diferentes sustancias (Abril., y cols., 2010).

El principio de la espectrofotometría UV- Visible involucra la absorción de radiación ultravioleta-visible por una molécula, causando la promoción de un electrón de un estado basal a un estado excitado, liberándose el exceso de energía en forma de calor. La longitud de onda (λ) comprende entre 190 y 750 nm la cual está dividida en diferentes tipos de radiación entre las que se encuentran: El ultravioleta extremo (< 200 nm), ultravioleta cercano (entre 200 y 400 nm), luz visible (entre 400 y 750 nm) e infrarrojo cercano (> 750 nm). En la figura 5 se observa el espectro de absorción (Abellán y Torres., 2012).

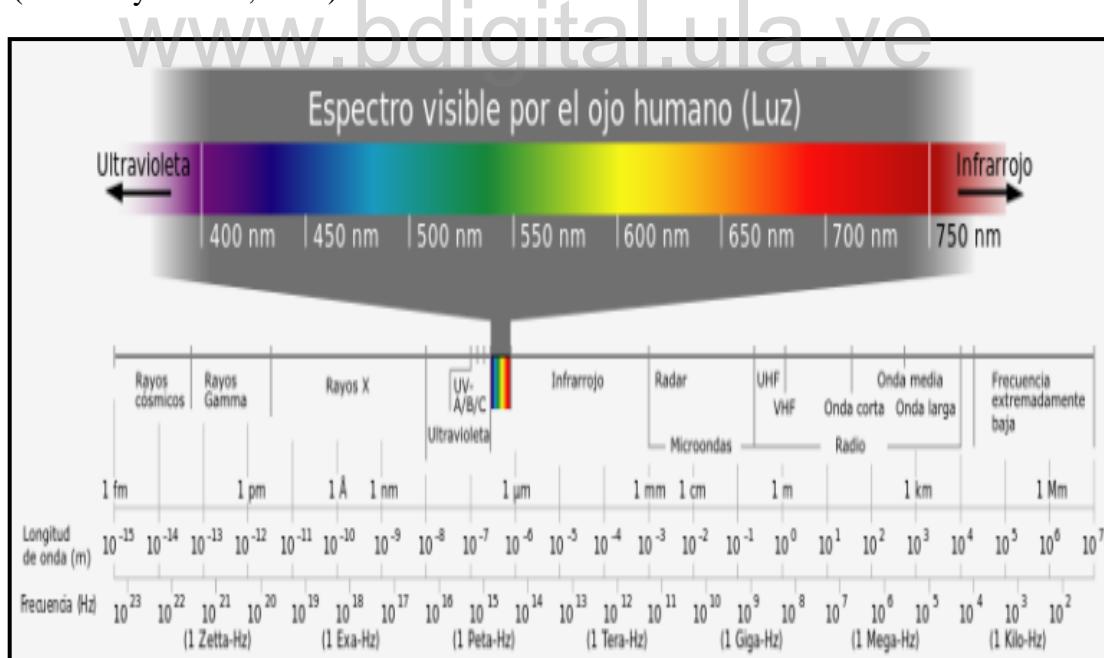


Figura 4: Espectro electromagnético.

Fuente: Abellán y Torres, 2012.

En esta técnica cada átomo es capaz de emitir o absorber radiación electromagnética, aunque solamente en algunas frecuencias que son características propias de cada uno de los diferentes elementos químicos, (Abellán y Torres., 2012).

Cuando se suministra energía calorífica, se estimula un determinado elemento en su fase gaseosa, y sus átomos emiten radiación en cierta frecuencia del visible, que constituyen su espectro de emisión. Si el mismo elemento, también en estado de gas, recibe radiación electromagnética, absorbe en cierta frecuencia del visible, precisamente las mismas en las que emite cuando se estimula mediante calor. Este será su espectro de absorción (Abellán y Torres., 2012).

Según lo anterior, se cumple, la llamada ley de Kirchoff, que indica que todo elemento absorbe radiación en las mismas longitudes de onda en las que emite. Puesto que el espectro, tanto de emisión como de absorción, es característico de cada elemento, sirve para identificar cada uno de los elementos de la tabla periódica, por simple visualización y análisis de la posición de las líneas de absorción o emisión en su espectro. Estas características se manifiestan ya sea que se trate de un elemento puro o bien combinado con otros elementos, por lo que se obtiene un procedimiento de identificación bastante fiable (Abellán y Torres., 2012).

Cuando un haz de radiación UV- Visible atraviesa una disolución conteniendo un analito absorbente, la intensidad incidente del haz I_0 es atenuada hasta I . Esta fracción de radiación que no ha logrado traspasar la muestra se denomina trasmisión (T) ($T=I/I_0$). Por aspectos prácticos se empleará la absorbancia (A) en lugar de la trasmisión ($A= -\log T$), por estar relacionada linealmente con la concentración de la especie absorbente según la ley de Beer- Lambert. Esta ley relaciona la concentración de un analito absorbente con el espesor de muestra y con su absorbancia. Es necesario considerar una serie de limitaciones químicas e instrumentales a la hora de aplicar dicha ley, se debe tener en cuenta que el valor del coeficiente de absorción α varía según los materiales absorbentes y con la longitud de onda para cada material en particular. La ley tiende a no ser válida para concentraciones muy elevadas, especialmente si el material dispersa mucho la luz. En la figura 6 se muestra el diagrama de bloques para un espectrofotómetro (Abellán y Torres., 2012).

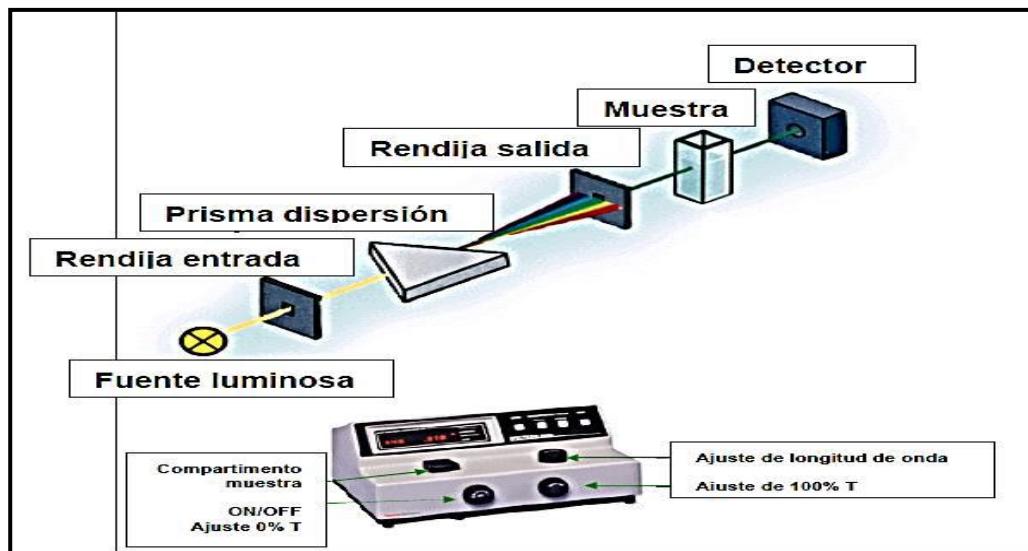


Figura 5: Diagrama de bloques (espectrofotómetro).

Fuente: Caballero y cols., 2018.

Definición Operacional de Términos.

Tumor

Masa anormal de tejido que aparece cuando las células se multiplican más de lo debido o no se mueren cuando deberían. Los tumores son benignos (no cancerosos) o malignos (cancerosos). Las masas benignas a veces crecen mucho pero no se diseminan y tampoco invaden los tejidos cercanos ni otras partes del cuerpo. Las masas malignas suelen diseminarse o invadir los tejidos cercanos, y también es posible que se diseminen a otras partes del cuerpo a través de la sangre y el sistema linfático. También se llama neoplasia y tumoración, (Instituto Nacional del Cáncer., 2024).

Biomarcador

El National Institutes Health (NIH) estableció la definición de biomarcador como aquellas características biológicas, bioquímicas, antropométricas, fisiológicas, entre otras, objetivamente mensurables, capaces de identificar procesos fisiológicos o

patológicos, o bien una respuesta farmacológica a una intervención terapéutica. Existen diferentes tipos de biomarcadores: diagnósticos, pronósticos, o terapéuticos. El biomarcador ideal debe ser específico, sensible, predictivo, rápido y económico, estable in vivo e in vitro, no invasivo, y que tenga suficiente relevancia preclínica y clínica como para modificar las decisiones relativas al proceso patológico en que se aplica, (Torres y Perez 2016).

Sangre

La sangre es un tejido líquido que recorre todo el organismo a través de los vasos sanguíneos gracias a la fuerza de bombeo del corazón. En la sangre se trasportan células y sustancias necesarias para las funciones vitales. Entre sus funciones se encuentran: Aportar oxígeno y nutrientes a todo el cuerpo, recoger los productos metabólicos, servir como sistema de defensa, detener hemorragias e integrar las funciones del cuerpo. Se compone de: Líquido plasma 55%, elementos celulares: Glóbulos rojos o eritrocitos glóbulos blancos o leucocitos, plaquetas o trombocitos 45%,(Bahsas., 2022).

Plasma

Parte líquida de la sangre, constituye aproximadamente el 55% de su volumen total. Está compuesto principalmente por agua, pero también contiene proteínas, sales, nutrientes, hormonas, gases y desechos metabólicos. El plasma es fundamental para el transporte de sustancias a través del cuerpo y para mantener el equilibrio de líquidos en el organismo, (Cortina y López., 2000).

Absorbancia

Medida de cuánta luz es absorbida por una sustancia cuando la luz pasa a través de ella. Se utiliza comúnmente en espectroscopia para cuantificar la cantidad de una sustancia presente en una muestra, ya que la cantidad de luz absorbida está

directamente relacionada con la concentración de la sustancia, (Brunatti y Martín., 2010).

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

Tipo de Investigación.

Hernández, Fernández y Baptista en el 2014 refirieron que el conocimiento generado por un proceso investigativo define el alcance y el tipo de investigación. Adicionalmente, Hurtado en el 2010 refirió que existen diferentes tipos de investigación: Exploratoria, descriptiva, analítica, comparativa, explicativa, predictiva, proyectiva, interactiva, confirmatoria y evaluativa. Específicamente, la investigación analítica tiene como fin el estudio de la estructura interna de un fenómeno, utilizando un criterio de análisis. Al respecto, esta investigación será analítica ya que se analizarán los niveles de ADN circulante en muestras de sangre en correspondencia con el siguiente criterio de análisis: Espectrofotometría Uv-Visible.

Diseño de investigación

Para la recolección de los datos se requiere un diseño de investigación representado por las estrategias pertinentes. Al respecto, Hurtado refirió que tales estrategias están representadas por el dónde, cuándo y la amplitud de la información que se quiere recolectar (Hurtado., 2010). Específicamente, el dónde en esta investigación está representado por el Laboratorio de la Unidad de Genética Médica perteneciente al Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes; por lo tanto, el diseño será de campo y de laboratorio. Respecto al cuándo, el diseño será contemporáneo y transeccional, ya que la información se recolectará en el presente y una sola vez en cada unidad de investigación. En cuanto a la amplitud de la información, el diseño será univariable, ya que el evento de estudio está constituido por el objeto y un solo sujeto de estudio.

Población y Muestra

Unidad de investigación

El grupo de estudio está representado por los pacientes oncológicos que acudieron al Laboratorio General y a la unidad de Uroología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA), Así como, los estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes. Previo consentimiento informado ingresaron al estudio los pacientes e individuos que cumplieron con los siguientes criterios:

➤ Muestras Controles.

Criterios de Inclusión:

- Estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis Sanos cuyas edades están comprendidas entre 20 y 30 años.
- Personas aparentemente sanas de diferentes grupos etarios que acudan al Laboratorio General del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes.

Criterios de Exclusión:

- Personas que padeczan de cáncer
- Estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis cuyas edades superen el rango comprendido entre 20 y 30 años.

➤ Muestras de Pacientes Oncológicos.

Criterios de Inclusión:

- Personas adultas que hayan sido diagnosticadas con cáncer.
- Personas que se encuentre en tratamiento o no.

Selección del tamaño de la muestra

La "n" muestral en esta investigación está representada por la muestra de sangre de 62 personas en las que se incluyen 54 controles negativos de cáncer y 8 pacientes oncológicos que asistieron a la Unidad de Urología y al Laboratorio General del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes (IAHULA) en Mérida Venezuela. Así como estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes.

Sistema de variables

Las variables de esta investigación están representadas por los niveles de ADN circulante y la Espectrofotometría UV- Visible. Las dimensiones son: Rango de ADN circulante (bajo, normal, elevado), longitudes de onda mediante Espectrofotometría UV- Visible (260 nm, 280nm).

Instrumento de Recolección de Datos

Sistema de Recolección de Información.

Los medios por los cuales se recolectó la información acerca de lo que confiere a la elaboración teórica y experimental de este proyecto se realizó por medio de:

- **Revisión bibliográfica:** Con la finalidad de recopilar información ya existente sobre el problema.
- **Realización de encuesta:** Se ejecutó a cada paciente la encuesta anexa a este trabajo (ver anexo 1, pag 110), la cual permitió obtener la información de ciertas variables que pueden o no influir al momento de obtener los resultados.
- **Toma y análisis de las muestras:** Luego de obtenida la información de cada paciente se procedió a la toma de la muestra sanguínea, la cual se analizó utilizando la Técnica de Espectrofotometría, mediante la cual se determinaron los niveles de ADN circulante.

Procedimiento de la Investigación

La Metodología utilizada en esta investigación obedece al Procedimiento adaptado del propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 (Lahiri y Nurnberger., 1991).

12.2. Materiales y Equipos.

- Espectrofotómetro UV-Visible LAMBDA 3B Perkin Elmer.
- Centrífuga HERMLE Z 360 K (Capacidad para 24 tubos eppendorf y 8 Falcon).
- Matraces Pyrex de 100 y 50 mL.
- Pipetas Volumétricas (100-1000 ul, 100-500 ul , 10- 100 ul).
- Puntas para pipetas volumétricas (azules y amarillas).
- Baño de Maria Precision PS scientific con termómetro de 10°C a 150°C
- Nevera
- Tubos Falcon.
- Tubos Eppendorf (1,5 ml).
- Celda de cuarzo (500 ul).
- Alcohol.
- Algodón.
- Inyectadoras de 5 cc
- Guantes
- Scalp N°23
- Tirro
- Mechero
- Agua destilada
- Cronometro

Espectrofotómetro UV-Visible.

Para la determinación de los niveles de ADN circulante en las muestras de sangre, se utilizó un espectrofotómetro LAMBDA 3B Perkin Elmer en la región UV-Visible

a una longitud de onda de 260nm, las celdas utilizadas fueron de cuarzo, de forma rectangular y transparentes, con capacidad de 500 ul de muestra (Ver Anexo 3 y 4, pag 113).

Reactivos:

Anticoagulante EDTA: es el anticoagulante de elección en los Laboratorios de Hematología para la conservación de la muestra de sangre total. Es una sustancia química que se adhiere a los iones de ciertos metales como el Calcio, Magnesio, Plomo e Hierro. Se emplea en medicina para prevenir los coágulos de sangre, para extraer el Calcio y el Plomo del cuerpo. Además se usa para evitar que las bacterias formen biopelículas (capas delgadas que se adhieren a la superficie). Actúa como un tipo de quelante (Instituto Nacional del Cáncer, 2021).

TKM2: Buffer con altas concentraciones de sales para preservar el plasma compuesto por Tris HCl 10 mM: 0,2422gr; KCl 10 mM: 0,149gr; MgCl₂ 10mM: 0,4066gr; EDTA Na₂ 10mM: 0,13448gr; NaCl 0,4 M: 4,576gr.

Solución Saturada de Cloruro de Sodio: Deshidrata y precipita las proteínas dejando el ADN en sobrenadante. Compuesto por NaCl 5.3 M: 15,4892gr

Etanol Absoluto: Deshidrata y precipita el ADN.

Metodología Esquemática

1. Preparación de Control Positivo de ADN.

Para el Control positivo de ADN se extrajo a partir de leucocitos. Para esto se siguió el protocolo modificado de extracción salina de Lahiri y Nurnberger en 1991, el cual se describe a continuación.

Para llevar a cabo la extracción del ADN se extrajo la capa de leucocitos de la muestra de sangre periférica mediante ciclos de lavados con solución salina, centrifugando a 1.800 rpm por 10 min. Los leucocitos se trasvasaron a un tubo con 5mL de TKM1 (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA). Luego se le agregó 150 µL del detergente no iónico nonidet al 15%, se agitó

fuertemente con vortex y se centrifugó a 2.200 rpm por 15 min. Se decantó el sobrenadante y se realizaron lavados con TKM1 centrifugando a 2.200 rpm por 10 min. Posteriormente se le agregó 800 µL del tampón TKM2 (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM EDTA, 0,4 M NaCl) y se resuspendió el taco obtenido en el paso anterior. Se agregó 55 µL de dodecil sulfato de sodio (SDS) al 10%, se agitó fuertemente con vórtex y se incubó a 65 °C por 15 min., se dejó enfriar y se adicionó 300 µL de NaCl 5,3 M, se homogenizó y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Para obtener la malla de ADN del sobrenadante obtenido se agregó a 2 mL de Etanol absoluto frío. La malla fue trasvasada a un tubo con 1mL de etanol al 75%.

2. Barrido Espectral

Se determinó la absorbancia del control positivo de ADN a diferentes longitudes de onda en un rango de 230 a 295 nm, para la búsqueda de una longitud optima donde el analito absorbe más luz.

3. Estandarización de la Técnica de Purificación:

Los primeros pasos del protocolo original se omitieron puesto que en estos se separan los leucocitos de la sangre. Inicialmente se realizaron diferentes modificaciones al procedimiento propuesto por Lahiri y Nurnberger 1991, el día 05/04/2024, con la finalidad de evaluar cual procedimiento proporcionaba mayor grado de pureza en la extracción de ADN.

Pruebas Realizadas.

- Sin usar el SDS con 300 µL de plasma + 800 µL TKM2
- Sin usar el Dodecilsulfato Sódico (SDS) con 400 µL de Plasma + 400 µL de TKM2
- Usando 400 µL de Plasma + 400 µL de TKM2 + 55 µL de SDS
- Usando 800 µL de plasma + 55 µL de SDS

Obteniendo mayor rendimiento en la técnica donde no se utilizó el SDS con 300 µL de plasma + 800 µL TKM2.

4. Metodología General.

Consentimiento Informado:

Los individuos sanos y pacientes oncológicos fueron informados del estudio de manera verbal y luego de haberles explicado con detalle el propósito de la investigación y la importancia de la misma, ellos aceptaron aportar la muestra de sangre necesaria para que se llevaran a cabo los análisis pertinentes y así determinar los niveles de ADN circulante.

Extracción de ADNcf a partir de plasma:

Se empleó el método modificado de extracción a partir de sangre periférica propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 (Lahiri y Nurnberger en 1991). Para llevar a cabo la extracción del ADN se extrajo 300 µL de plasma de la muestra de sangre periférica obtenidos por centrifugación a 1800 rpm durante 10 minutos. Este se trasvasó a un tubo eppendorf con 800 µL de TKM2 (10mM Tris-HCl pH 7,6, 10 mM de KCl, 10 mM MgCl₂, 0,4 M NaCl, 10 mM EDTA). Luego se incubó a 65 °C por 15 min, se dejó enfriar y se adicionó 300 µL de NaCl 5,3 M; se homogenizó y se centrifugó a 12.000 rpm por 10 min. Para obtener la malla de ADN, del sobrenadante obtenido se tomó 700 µL y fue trasvasado a un tubo con 700 µL de etanol absoluto frío, se mezcló y se llevó a la nevera por 48 horas. Posteriormente se centrifugó a 1800 rpm durante 1 minuto, se tomó 500 µL del sobrenadante y se colocó en un tubo eppendorf nuevo; nuevamente se llevó a centrifugar a 12.000 rpm durante 8 minutos. Se procede a extraer el etanol y se deja secar en el mechero por 20 minutos con la finalidad de eliminar los residuos de etanol. Finalmente se agregan 10 µL de agua destilada y se incuba a 80 °C por 10 minutos para disolver bien. Por último se centrifuga por 1 minuto a 1.800 rpm.

Toma de muestra de Sangre:

Una vez que cada participante había firmado el consentimiento y proporcionado la información necesaria, se le extrajeron 5 mL de sangre periférica por punción venosa que se recolectaron en un tubo con 100 µL de EDTA al 15%.

Procedimientos para la extracción de ADN

Toma de Muestra



Figura 6. Toma de Muestra

Fuente: Archivo Personal

Primera parte de extracción de ADN:



Figura 7. Primera parte de extracción de ADNcf

Fuente: Archivo Personal

Segunda Parte de extracción de ADN:

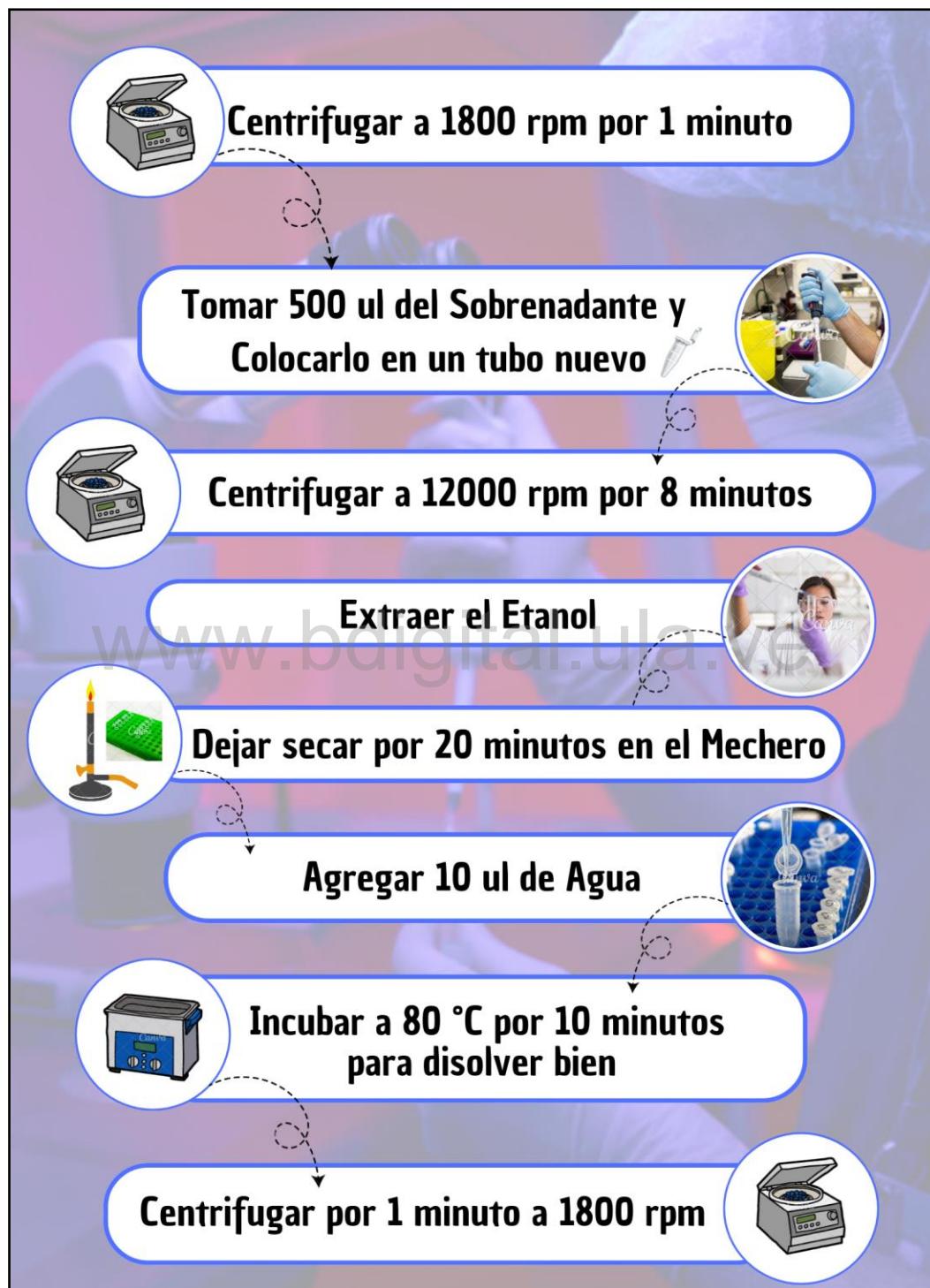


Figura 8. Segunda parte de extracción de ADNcf

Fuente: Archivo Personal

5. Determinación de concentración de ADN circulante por Espectrofotometría.

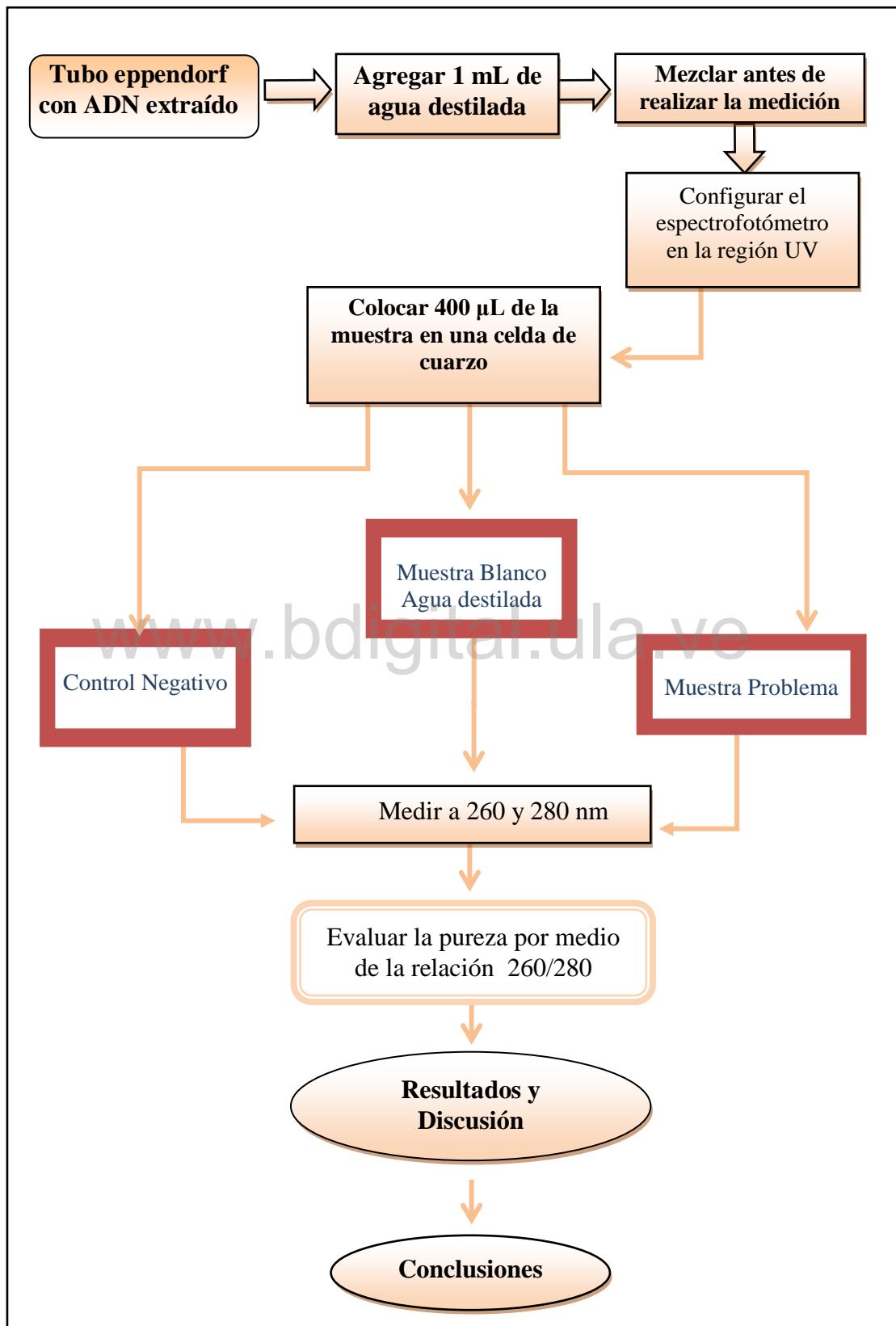
Control Negativo:

Los controles se prepararon siguiendo el mismo protocolo de extracción de ADN antes mencionado empleando agua estéril en lugar de plasma.

Detección y Cuantificación de Niveles de ADN Circulante:

La medición de diferentes niveles de ADN circulante se realizó utilizando la técnica de espectrofotometría UV-Visible, con un sistema dotado de una fuente de radiación ultravioleta centrada en 260 nm y 280 nm. El espectrofotómetro utilizado en este trabajo, fue un equipo de LAMBDA 3B marca Perkin Elmer. La medida del espectro de absorbancia, que registra el espectrofotómetro obedece a la ley de Lambert-Beer. El ADN contiene bases nitrogenadas, las cuales son aromáticas lo que indica que el ADN tiene la particularidad de poder absorber luz ultravioleta. Su máximo de absorción se encuentra a 260 nm logrando calcular la concentración del ADN y evaluando su pureza por medio de la relación 260/280. Su detección se realizó de la siguiente manera:

- Obtención de Absorbancia en controles de ADN positivo (puro) a partir de Leucocitos. (Barrido Espectral)
- Preparación de controles negativos que contenían todos los reactivo y agua estéril en lugar de plasma.
- Medición de niveles de ADN en muestras de sangre de personas sanas y de pacientes oncológico en longitudes de onda de 260 nm y 280 nm.
- Corrección de la concentración de ADN restando el valor de los controles negativos.
- Obtención de Concentración real de ADN por medio de la relación de pureza 260/280



Determinación de Concentración Real de ADN según su Pureza

Para la obtención de la concentración de ADN real se emplea la relación 260/280 obteniendo el índice de pureza y por medio de la tabla “absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas” se determinó el porcentaje real de ácidos nucleicos presentes en la muestra.

Tabla 1. Absorbancia de ácidos nucleicos y proteínas

% PROTEIN	% NUCLEIC ACID	OD ₂₆₀ :OD ₂₈₀	% PROTEIN	% NUCLEIC ACID	OD ₂₆₀ :OD ₂₈₀
100	0	0.57	45	55	1.89
95	5	1.06	40	60	1.91
90	10	1.32	35	65	1.93
85	15	1.48	30	70	1.94
80	20	1.59	25	75	1.95
75	25	1.67	20	80	1.97
70	30	1.73	15	85	1.98
65	35	1.78	10	90	1.98
60	40	1.81	5	95	1.99
55	45	1.84	0	100	2.00
50	50	1.87			

Fuente: Saambrook, J., & Russell, D. (2001). Molecular Cloning,

6. Estadística: Análisis de grupos por t student.

Para el análisis de los resultados, los datos obtenidos se almacenaron en una base de datos y se procesaron de acuerdo a la prueba estadística t student, utilizada para determinar si la media de una muestra es estadísticamente diferente de una media poblacional conocida o hipotética. Esta prueba se utiliza cuando la población no sigue una distribución normal o cuando el tamaño de la muestra es pequeño.

- Varones y Mujeres Respecto de sus Concentraciones de ADN.
- Grupos etarios de 20-35 Años y 36-55 Años. Respecto de sus Concentraciones de ADN.
- Grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años. Respecto de sus Concentraciones de ADN.

- Grupos etarios de 36-55 años y 56 años en adelante. Respeto de sus Concentraciones de ADN.
- Individuos sedentarios y individuos que se ejercitan respecto de sus Concentraciones de ADN
- Individuos con antecedentes familiares de cáncer e individuos sin antecedentes con respecto de sus Concentraciones de ADN.
- Individuos Hipertensos e individuos sanos con respecto de sus Concentraciones de ADN.
- Pacientes Oncológicos e Individuos sanos que pertenezcan al mismo grupo etario que los Pacientes Oncológicos.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO IV

Resultados y discusiones

Resultados

A continuación se detallan los resultados obtenidos en la recolección de los datos de manera simple y objetiva a modo de proporcionar una visión precisa de lo que se encontró en el estudio, al mismo tiempo la discusión por su parte interpreta el significado de los resultados.

Establecimiento de las condiciones pre-analíticas

Existen diversos factores pre-analíticos que pueden afectar los resultados obtenidos durante el estudio como son el tiempo transcurrido entre la extracción de la sangre y la centrifugación de la muestra, las condiciones de centrifugación, las condiciones de almacenaje de la muestra y el método de extracción del ADN circulante.

Este último factor resulta especialmente relevante ya que existen en el mercado numerosos kits manuales y automatizados que permiten la extracción de ADN circulante, y diversos estudios han demostrado que la elección entre uno y otro puede afectar de forma significativa al rendimiento de la extracción y al contenido de ADN circulante.

En las tablas 2 y 3 se encuentran las características fenotípicas tales como edad, sexo, actividad física, hábitos alimenticios, antecedentes médicos entre otros, de los individuos sanos y los pacientes con cáncer que se deben tener en cuenta en el análisis de los resultados.

Tabla 2. Características Fenotípicas de los individuos sin cáncer

Código	Descripción	Edad	Sexo	Se Ejercita	Alimentación Balanceada	Antecedente Familiar	OPNT	ECV
C-001	Control Negativo	27	M	Si	No	Si	No	No
C-002	Control Negativo	26	M	No	No	No	No	No
C-003	Control Negativo	25	F	No	No	Si	No	No
C-004	Control Negativo	27	F	No	Si	No	No	No
C-005	Control Negativo	30	F	Si	Si	Si	No	No
C-006	Control Negativo	26	F	Si	No	Si	No	No
C-007	Control Negativo	27	F	Si	Si	Si	No	No
C-008	Control Negativo	28	M	Si	No	Si	No	No
C-009	Control Negativo	27	M	Si	No	Si	No	No
C-017	Control Negativo	25	F	Si	No	Si	No	No
C-018	Control Negativo	30	M	No	No	No	No	No
C-020	Control Negativo	26	M	No	Si	Si	No	No
C-022	Control Negativo	31	M	Si	Si	No	No	No
C-025	Control Negativo	25	F	No	No	Si	No	No
C-026	Control Negativo	28	M	Si	No	No	No	No
C-027	Control Negativo	29	F	No	Si	Si	No	No
C-028	Control Negativo	27	M	Si	No	No	No	No
C-031	Control Negativo	50	M	No	No	Si	No	Si
C-033	Control Negativo	70	F	Si	Si	No	No	Si
C-034	Control Negativo	22	F	No	No Sabe	Si	No	No
C-035	Control Negativo	48	F	Si	No	No	No	No
C-036	Control Negativo	34	M	Si	No	Si	No	No
C-039	Control Negativo	24	F	No	Si	No	No	No
C-042	Control Negativo	24	F	No	Si	Si	No	No
C-045	Control Negativo	27	M	Si	Si	Si	No	No
C-046	Control Negativo	24	F	Si	Si	No	No	No
C-047	Control Negativo	25	F	No	No	Si	No	No
C-050	Control Negativo	58	F	No	Si	Si	No	Si
C-051	Control Negativo	59	F	No	Si	No	No	No
C-052	Control Negativo	53	F	No	Si	Si	No	No
C-053	Control Negativo	45	F	Si	Si	Si	No	No
C-054	Control Negativo	44	F	Si	Si	No	No	No
C-055	Control Negativo	49	F	No	No	No	No	Si
C-056	Control Negativo	27	F	Si	No	Si	No	No
C-058	Control Negativo	55	F	Si	No	Si	No	Si

Continúa...

Código	Descripción	Edad	Sexo	Se Ejercita	Alimentación Balanceada	Antecedente Familiar	OPNT	ECV
C-059	Control Negativo	37	F	Si	No	No	No	No
C-060	Control Negativo	70	M	Si	No	No	No	Si
C-061	Control Negativo	55	F	No	No	No	No	No
C-062	Control Negativo	33	F	No	Si	Si	No	No
C-063	Control Negativo	60	F	Si	Si	Si	No	Si
C-065	Control Negativo	40	F	Si	Si	No	No	No
C-066	Control Negativo	28	F	No	Si	Si	No	No
C-067	Control Negativo	41	F	No	Si	Si	No	No
C-068	Control Negativo	23	M	No	Si	No	No	Si
C-069	Control Negativo	26	M	No	Si	Si	No	No
C-070	Control Negativo	25	F	No	Si	Si	No	No
C-072	Control Negativo	24	F	No	Si	Si	No	No
C-073	Control Negativo	23	F	Si	Si	No	No	No
C-074	Control Negativo	31	F	No	Si	Si	No	Si
C-075	Control Negativo	24	F	No	Si	No	No	No

Tabla 3. Características Fenotípicas de los Pacientes Oncológicos.

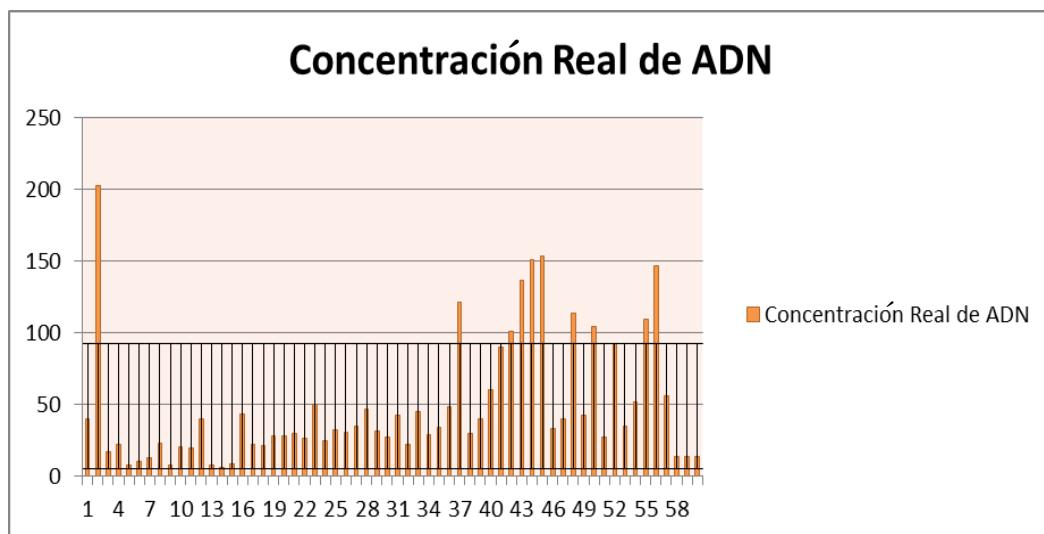
Código	Descripción	Edad	Sexo	Se Ejercita	Alimentación Balanceada	Antecedente Familiar	OPTN	ECV
P-001	Paciente Oncológico	56	F	No	Si	Si	No	No
P-002	Paciente Oncológico	55	F	Si	Si	Si	No	No
P-003	Paciente Oncológico	67	F	No	No	No	No	No
P-004	Paciente Oncológico	52	M	No	Si	Si	No	No
P-005	Paciente Oncológico	69	M	No	Si	Si	No	No
P-006	Paciente Oncológico	66	M	No	Si	No	No	No
P-007	Paciente Oncológico	80	M	No	Si	Si	No	Si
P-008	Paciente Oncológico	59	M	No	Si	No	No	No

Continúa...

Código	Tipo de Cáncer que Padece	Fecha de Diagnóstico	Recibe Tratamiento	Estado de la Enfermedad
P-001	Mama	4 meses	Si	Grado 3
P-002	Mama	01-03-2024	Si	Grado 2
P-003	Mieloma Múltiple	1 Año	Si	No
P-004	CA-Próstata	1 Año	Si	Grado 1
P-005	CA-Próstata	Hace 1 mes	No	No sabe
P-006	CA-Próstata	Hace 4 Años	Si	No sabe
P-007	Metástasis no conoce foco principal	1 Mes	No	Metástasis
P-008	Mama	1 Año	No	Grado 1

En la gráfica 1 se observan las concentraciones reales de ADN de cada uno de los individuos con la barra de error de una desviación estándar.

Gráfica 1. Concentración Real de ADN en general.



Los valores presentados en las tablas 4 y 5 muestran los valores de absorbancia corregida a longitudes de onda de 260 y 280 nm así como la concentración real de ADN, además en las gráficas 2 y 3 se presenta estas concentraciones de forma gráfica junto con la barra de error de desviación estándar. En el control poblacional y en los pacientes oncológicos.

Tabla 4. Controles Poblacionales (Individuos sin cáncer).

Código	DO 260 Corregida	DO280 Corregida	Concentración Real de ADN	Pureza
C-001	0,089	0,071	22,13	1,25
C-002	0,033	0,026	8,13	1,25
C-003	0,040	0,035	10,00	1,16
C-004	0,052	0,050	12,88	1,04
C-005	0,092	0,088	23,00	1,05
C-006	0,032	0,032	8,00	1,00
C-007	0,084	0,067	20,88	1,25
C-008	0,162	0,15	40,38	1,08
C-009	0,033	0,026	8,13	1,25
C-017	0,026	0,023	6,38	1,11
C-018	0,035	0,035	8,75	1,00
C-020	0,087	0,064	43,25	1,36
C-022	0,085	0,089	21,25	0,96
C-025	0,111	0,119	27,75	0,93
C-026	0,113	0,108	28,25	1,05
C-027	0,121	0,125	30,25	0,97
C-028	0,106	0,108	26,38	0,98
C-031	0,200	0,208	49,88	0,96
C-033	0,099	0,104	24,63	0,95
C-034	0,129	0,129	32,25	1,00
C-035	0,122	0,129	30,38	0,95
C-036	0,141	0,145	35,13	0,97
C-039	0,094	0,068	46,75	1,39
C-042	0,125	0,13	31,25	0,96
C-045	0,111	0,117	27,63	0,95
C-046	0,17	0,164	42,50	1,04
C-047	0,089	0,072	22,13	1,23

Continúa...

Código	DO 260 Corregida	DO280 Corregida	Concentración Real de ADN	Pureza
C-050	0,182	0,180	45,38	1,01
C-051	0,117	0,119	29,13	0,98
C-052	0,137	0,143	34,25	0,96
C-053	0,195	0,162	48,63	1,20
C-054	0,243	0,185	121,50	1,32
C-055	0,120	0,125	29,88	0,96
C-056	0,359	0,309	89,63	1,16
C-058	0,405	0,357	101,13	1,13
C-059	0,546	0,471	136,50	1,16
C-060	0,606	0,526	151,38	1,15
C-061	0,613	0,522	153,13	1,17
C-062	0,133	0,112	33,25	1,19
C-063	0,162	0,146	40,38	1,11
C-065	0,455	0,368	113,75	1,24
C-066	0,172	0,172	42,88	1,00
C-067	0,419	0,374	104,63	1,12
C-068	0,055	0,038	27,25	1,45
C-069	0,371	0,342	92,75	1,08
C-070	0,141	0,129	35,25	1,10
C-072	0,209	0,193	52,13	1,08
C-073	0,439	0,407	109,75	1,08
C-074	0,586	0,556	146,50	1,05
C-075	0,224	0,215	56,00	1,04

Gráfica 2. Concentración Real de ADN en el Control Poblacional

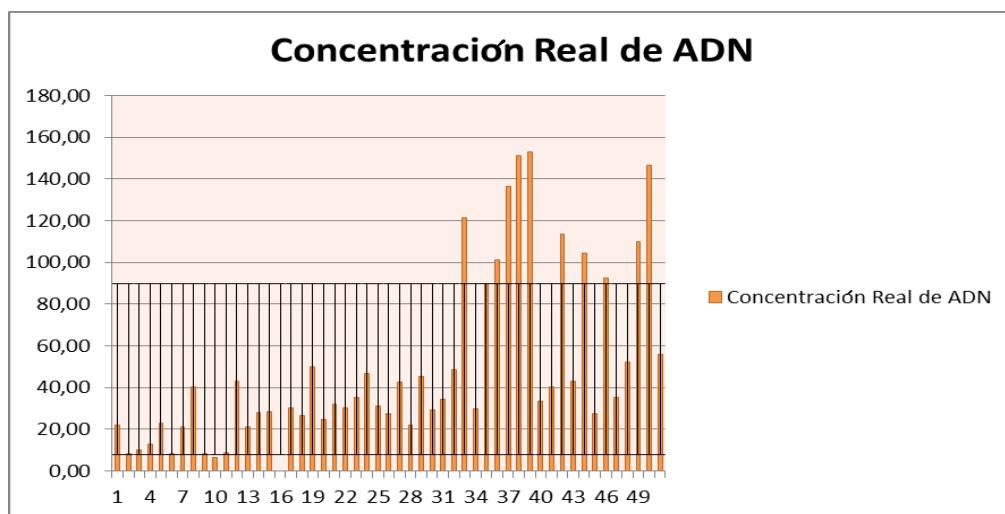
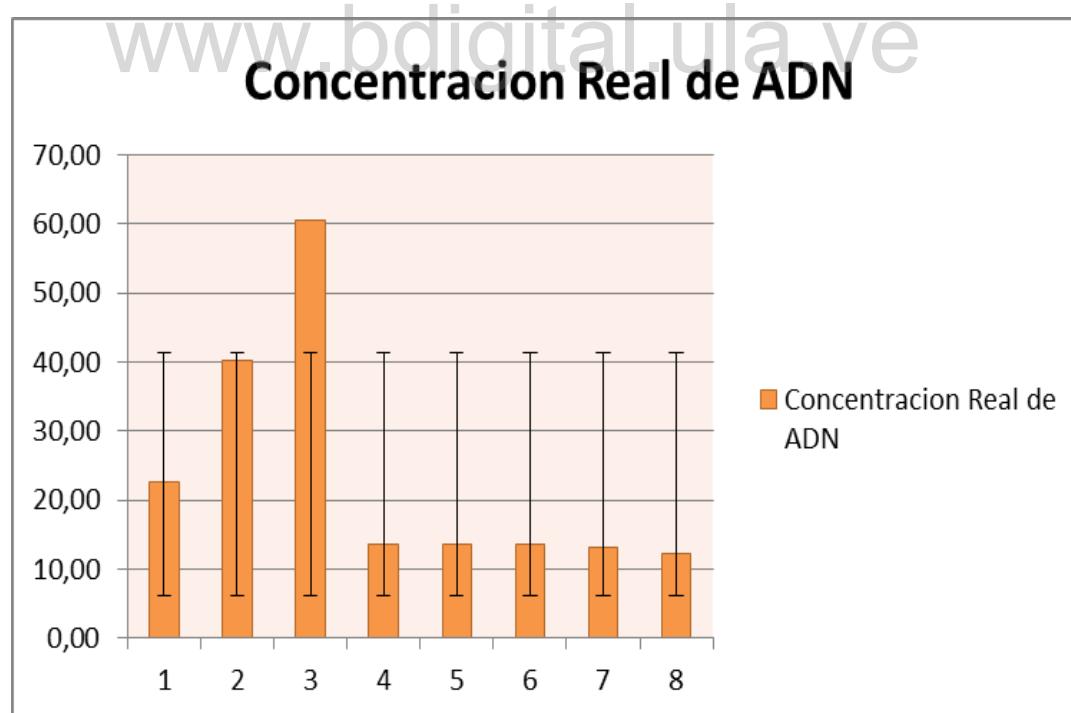


Tabla 5. Pacientes Oncológicos.

Código	DO 260 Corregida	DO280 Corregida	Concentración Real de ADN	Pureza
P-001	0,091	0,072	22,63	1,27
P-002	0,161	0,159	40,25	1,01
P-003	0,242	0,240	60,5	1,01
P-004	0,055	0,061	13,63	0,90
P-005	0,055	0,047	13,63	1,16
P-006	0,055	0,047	13,63	1,17
P-007	0,053	0,053	13,25	1,00
P-008	0,049	0,050	12,25	0,99

Gráfica 3. Concentración Real de ADN en Pacientes Oncológicos.



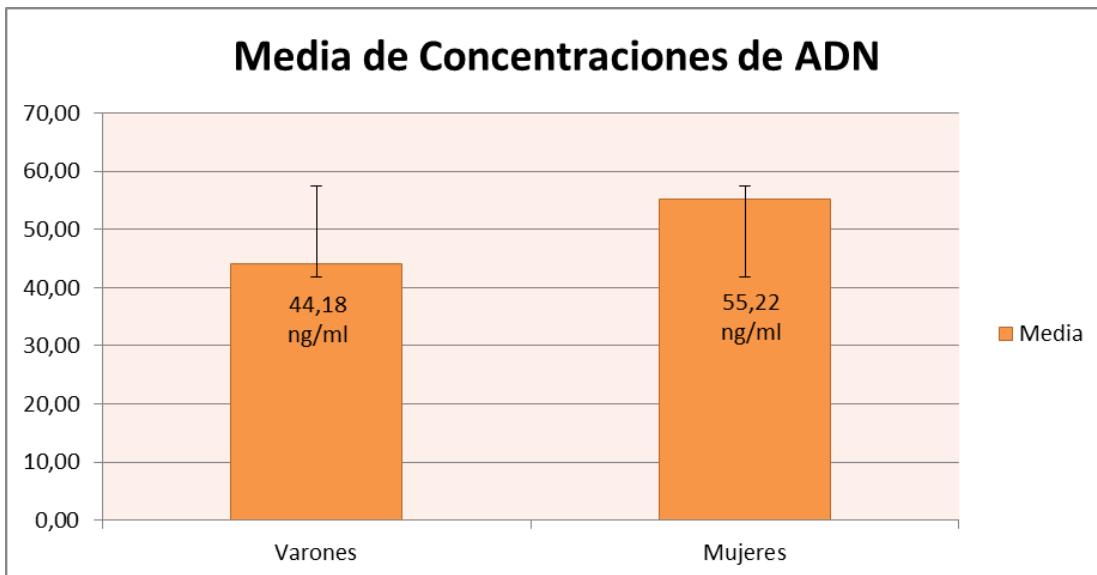
Prueba Estadística t de student 2 Colas Varianzas Iguales Eventos Independientes

Los valores presentados en la tabla 6, muestran el estudio estadístico que compara grupos de varones y de mujeres respecto a las concentraciones de ADN Circulante con una media en varones de 44,18 ng/ml y en mujeres de 55,22 ng/ml, media que también se observa en la gráfica 4, mediante el estadístico de la Prueba t de student obteniendo una p de 0,40 y un valor critico de t de 2,01.

Tabla 6. Prueba t de student de Comparación entre Varones y Mujeres respecto de sus Concentraciones de ADN.

	Varones	Mujeres
Media	44,18	55,22
Varianza	1448,21	1659,76
Observaciones	13,00	36,00
Varianza agrupada	1605,75	
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	47,00	
Estadístico t	-0,85	
P($T \leq t$) dos colas	0,40	
Valor crítico de t (dos colas)	2,01	

Gráfica 4. Media de concentraciones de ADN de Varones Vs Mujeres con error estándar.



Hipótesis específica 1.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre Varones y Mujeres

Ha: existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre Varones y Mujeres

Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se ha determinado que no existen diferencias significativas entre los varones y mujeres ($p > 0,05$). Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa entre los grupos mencionados.

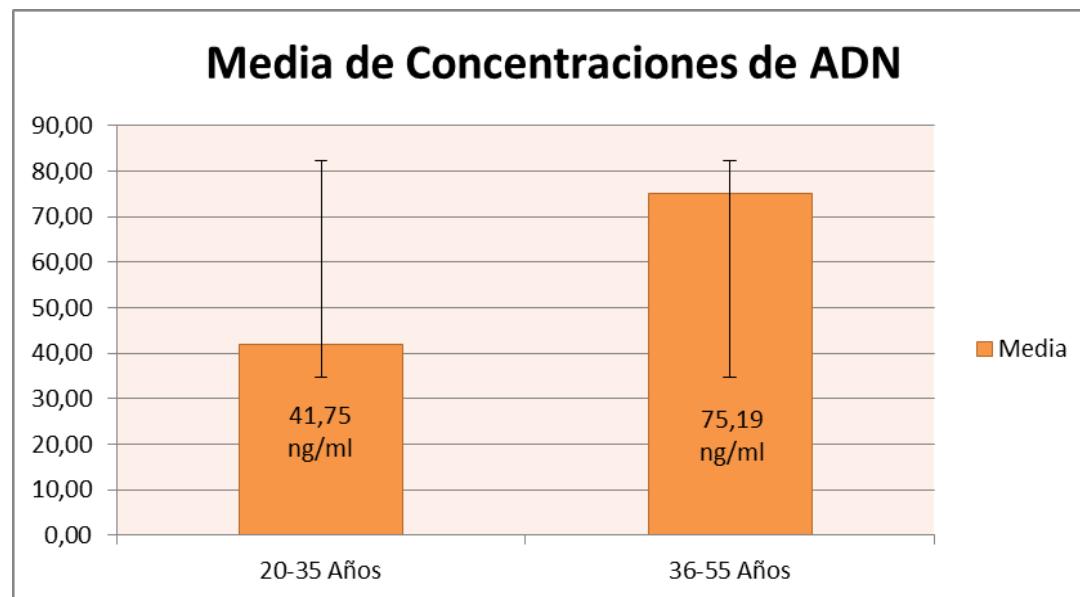
Los valores presentados en la tabla 7, muestran el estudio estadístico que compara los grupos etarios de 20-35 Años y 36-55 Años respecto a las concentraciones de ADN Circulante con una media en el grupo de 20-30 años de 41,75 ng/ml y el grupo de 36-55 años de 75,19 ng/ml media que también se observa en el gráfica 5, mediante

el estadístico de la prueba t de student obteniendo una p de 0,01 y un valor critico de t de 2,02.

Tabla 7. Prueba t de student de Comparación entre grupos etarios de 20-35 Años y 36-55 Años. Respecto de sus concentraciones de ADN.

	20-35 Años	36-55 Años
Media	41,75	75,19
Varianza	972,76	2258,24
Observaciones	29	13
Varianza agrupada	1358,40	
Diferencia hipotética de las medias	0,00	
Grados de libertad	40,00	
Estadístico t	-2,72	
P($T \leq -t$) dos colas	0,01	
Valor crítico de t (dos colas)	2,02	

Gráfica 5. Media de concentraciones de ADN 20-35 Años Vs 36-55 años con error estándar.



Hipótesis específica 2.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años.

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años.

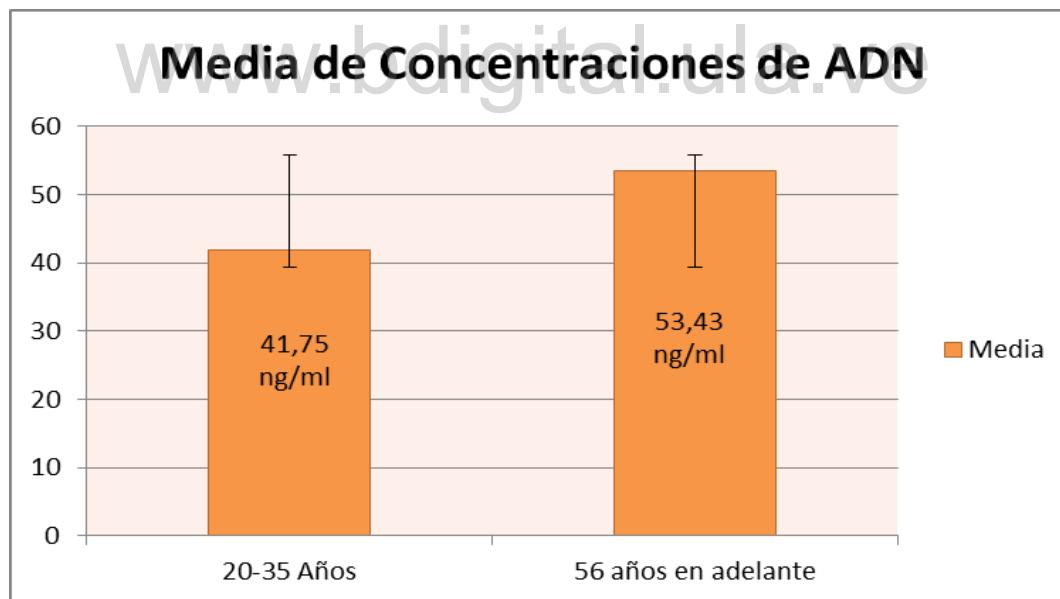
Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se pudo constatar la presencia de diferencias significativas entre los grupos estudiados con un valor de p inferior a 0,05, lo que indica una alta probabilidad de que dichas disparidades no hayan ocurrido por azar. Por lo tanto, se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa entre los grupos mencionados.

Los valores presentados en la tabla 8, muestran el estudio estadístico que compara los grupos etarios de 20-35 Años y 56 años en adelante respecto sus concentraciones de ADN circulante con una media en el grupo de 20-35 años de 41,75 ng/ml y el grupo de 56 años en adelante de 53,43 ng/ml media que también se observa en el gráfica 6, mediante el estadístico de la Prueba t de student obteniendo una p de 0,42 y un valor critico de t de 2,03.

Tabla 8. Prueba t de student de comparación entre grupos etarios de 20-35 Años y 36-55 Años. Respecto de sus Concentraciones de ADN.

	20-35 años	56 años en adelante
Media	41,75	53,43
Varianza	972,76	2041,32
Observaciones	29	7
Varianza agrupada	1161,33	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	34	
Estadístico t	-0,81	
P($T \leq t$) dos colas	0,42	
Valor crítico de t (dos colas)	2,03	

Gráfica 6. Media de concentraciones de ADN de 20-35 Años Vs 56 años en adelante con error estándar.



Hipótesis específica 3.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los grupos etarios de 20-35 años y 56 años en adelante.

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los grupos etarios de 20-35 años y 56 años en adelante.

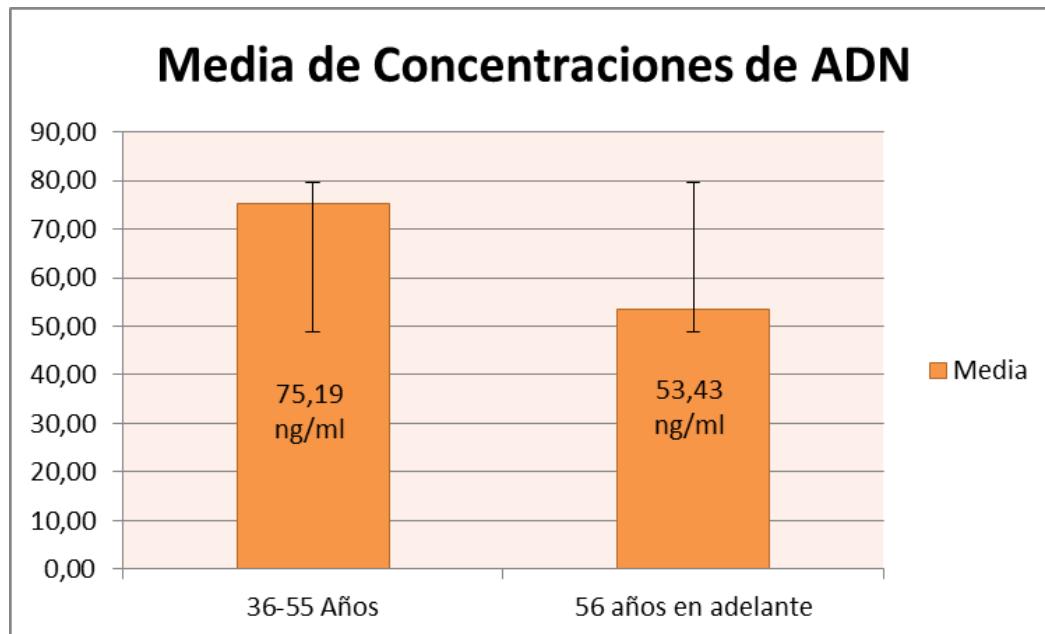
Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se ha determinado que no existen diferencias significativas entre los grupos etarios de 20-35 años y 56 años en adelante ($p > 0,05$). Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que exista una diferencia significativa entre los mencionados.

Los valores presentados en la tabla 9, muestran el estudio estadístico que compara los grupos etarios de 36-55 años y 56 años en adelante respecto sus concentraciones de ADN circulante con una media en el grupo de 36-55 años de 75,19 ng/ml y el grupo de 56 años en adelante de 53,43 ng/ml media que también se observa en la gráfica 7, mediante el estadístico de la Prueba t de student obteniendo una p de 0,33 y un valor critico de 2,10.

Tabla 9. Prueba t de student de Comparación entre grupos etarios de 36-55 Años y 56 años en adelante. Respecto de sus Concentraciones de ADN.

	36-55 Años	56 años en adelante
Media	75,19	53,43
Varianza	2258,24	2041,32
Observaciones	13	7
Varianza agrupada	2185,93	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	18	
Estadístico t	0,99	
P($T \leq t$) dos colas	0,33	
Valor crítico de t (dos colas)	2,10	

Gráfica 7. Media de concentraciones de ADN de 36-55 Años Vs 56 años en adelante con error estándar.



Hipótesis específica 4.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los grupos etarios de 36-55 años y 56 años en adelante.

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los grupos etarios de 36-55 años y 56 años en adelante.

Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se ha determinado que no existen diferencias significativas entre los grupos etarios de 36-55 años y 56 años en adelante ($p > 0,05$). Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que exista una diferencia significativa entre los mencionados.

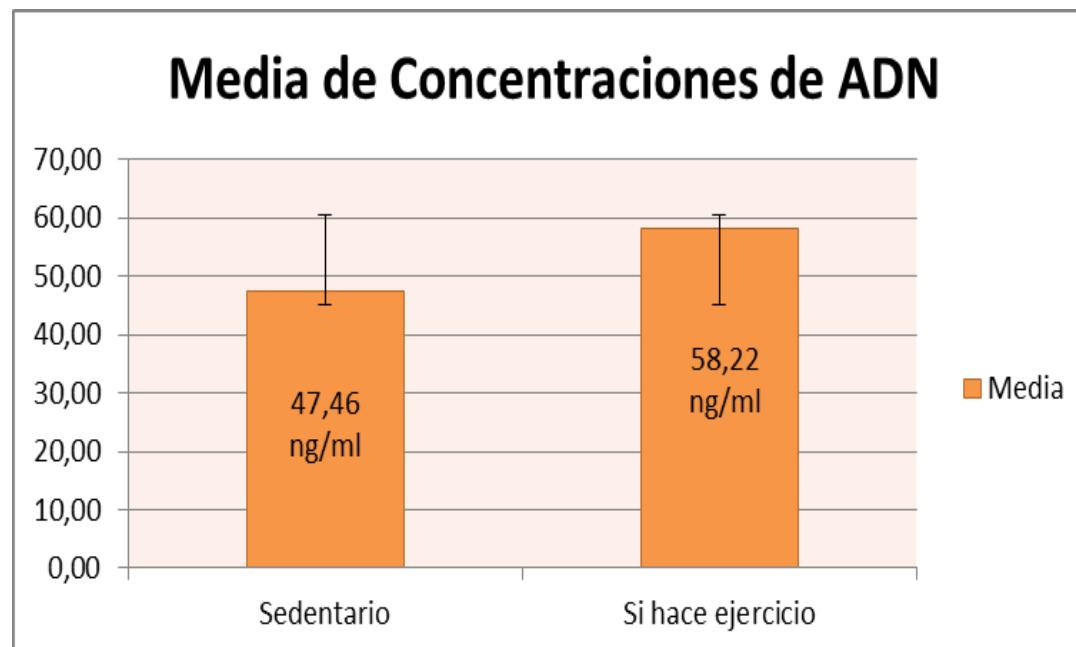
Los valores presentados en la tabla 10, muestran el estudio estadístico que compara los grupos de individuos sedentarios y otro grupo de individuos que se ejercitan respecto sus concentraciones de ADN Circulante con una media en el grupo de sedentarios de 47,46 ng/ml y el grupo que se ejercitan de 58,22 ng/ml media que

también se observa en el gráfica 8, mediante el estadístico de la Prueba T de Student obteniendo una p de 0,35 y un valor critico de t de 2,01.

Tabla 10. Prueba t de student de Comparación entre grupo de individuos sedentarios y otro grupo de individuos que se ejercitan respecto de sus Concentraciones de ADN.

	Sedentario	Si hace ejercicio
Media	47,46	58,22
Varianza	1333,48	1931,37
Observaciones	27	22
Varianza agrupada	1600,62	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	47	
Estadístico t	-0,94	
P($T \leq t$) dos colas	0,35	
Valor crítico de t (dos colas)	2,01	

Gráfica 8. Media de concentraciones de ADN de un grupo de individuos sedentarios y otro grupo de individuos que se ejercitan con error estándar.



Hipótesis específica 5.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los individuos sedentarios y los que se ejercitan.

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los individuos sedentarios y los que se ejercitan.

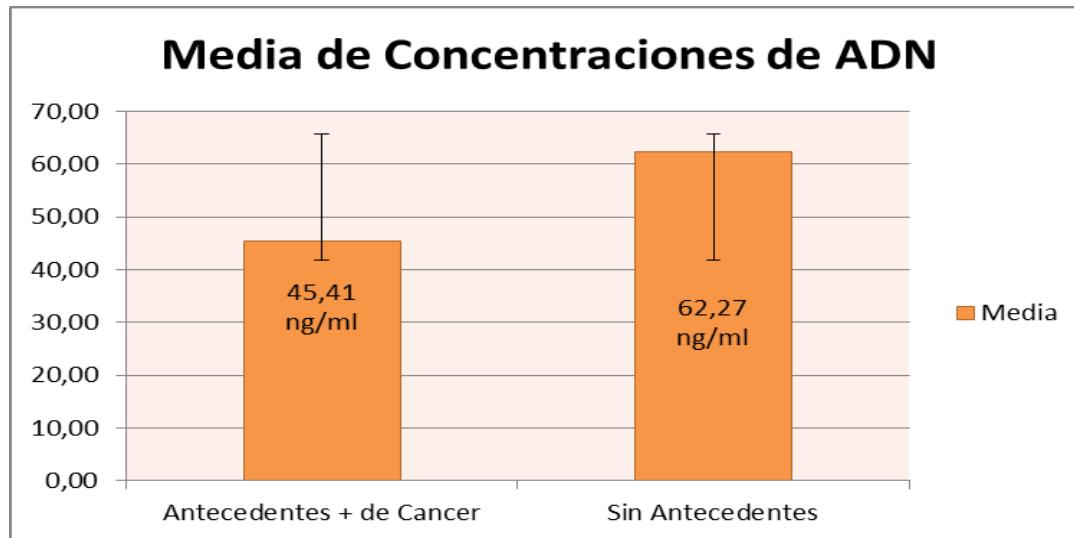
Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se ha determinado que no existen diferencias significativas entre los individuos sedentarios y los que se ejercitan ($p > 0,05$). Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que exista una diferencia significativa entre los mencionados.

Las valores presentados en la tabla 11, muestran el estudio estadístico que compara un grupo de individuos con antecedentes familiares de cáncer y otro grupo de individuos sin antecedentes con respecto sus concentraciones de ADN Circulante con una media en el grupo de individuos con antecedentes familiares de cáncer de 45,41 ng/ml y el grupo de individuos sin antecedentes de 62,27 ng/ml media que también se observa en el gráfica 9, mediante el estadístico de la Prueba T de Student obteniendo una p de 0,15 y un valor critico de 2,01.

Tabla 11. Prueba t de student de Comparación entre grupo de individuos con antecedentes familiares de cáncer y otro grupo de individuos sin antecedentes con respecto de sus Concentraciones de ADN.

	Antecedentes + de Cáncer	Sin Antecedentes
Media	45,41	62,27
Varianza	1017,30	2357,09
Observaciones	29	20
Varianza agrupada	1558,92	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	47	
Estadístico t	-1,47	
P($T \leq t$) dos colas	0,15	
Valor crítico de t (dos colas)	2,01	

Gráfica 9. Media de concentraciones de ADN de grupo de individuos con antecedentes familiares de cáncer y otro grupo de individuos sin antecedentes, con error estándar.



Hipótesis específica 5.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los individuos que tienen antecedentes familiares positivos de cáncer y los que no tiene antecedentes

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los individuos que tienen antecedentes familiares positivos de cáncer y los que no tiene antecedentes.

Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se ha determinado que no existen diferencias significativas entre los individuos con antecedentes positivos de familiares con cáncer y los individuos sin antecedentes ($p > 0,05$). Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa entre los mencionados.

Los valores presentados en la tabla 12, muestran el estudio estadístico que compara un grupo de individuos hipertensos y otro grupo de individuos sanos con

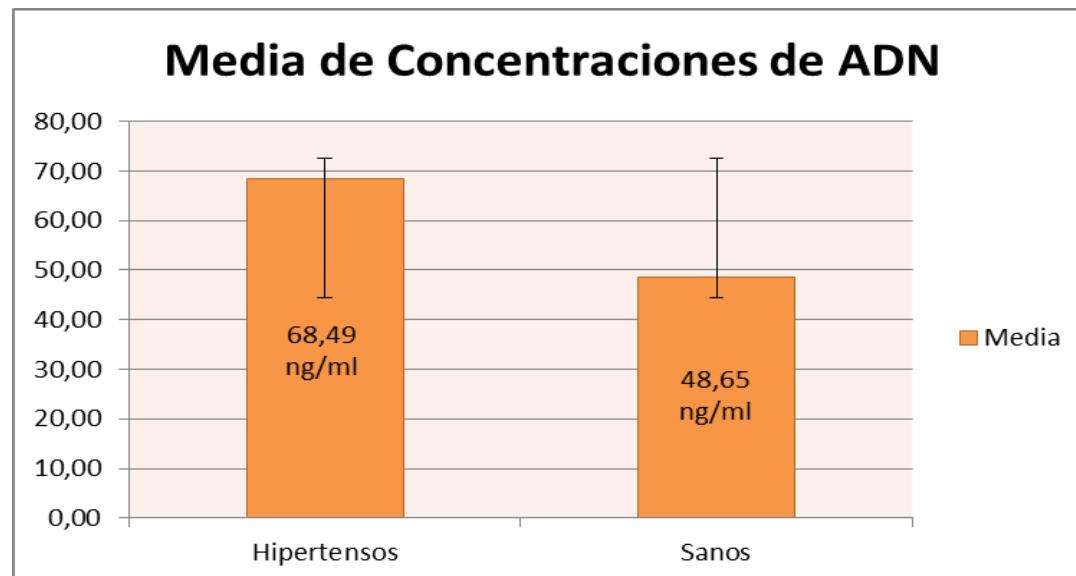
respecto sus concentraciones de ADN Circulante con una media en el grupo de individuos hipertensos de 68,49 ng/ml y el grupo de individuos sanos de 48,65 ng/ml media que también se observa en el gráfica 10, mediante el estadístico de la Prueba t de student obteniendo una p de 0,18 y un valor critico de 2,01.

www.bdigital.ula.ve

Tabla 12. Prueba t de student de Comparación entre grupo de individuos Hipertensos y otro grupo de individuos sanos con respecto de sus Concentraciones de ADN.

	Hipertensos	Sanos
Media	68,49	48,65
Varianza	2600,97	1357,28
Observaciones	9	40
Varianza agrupada	1568,97	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	47	
Estadístico t	1,36	
P($T \leq t$) dos colas	0,18	
Valor crítico de t (dos colas)	2,01	

Gráfica 10. Media de concentraciones de ADN de grupo de individuos Hipertensos y otro grupo de individuos sanos, con error estándar.



Hipótesis específica 6.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los individuos Hipertensos y los Sanos

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre los individuos Hipertensos y los Sanos

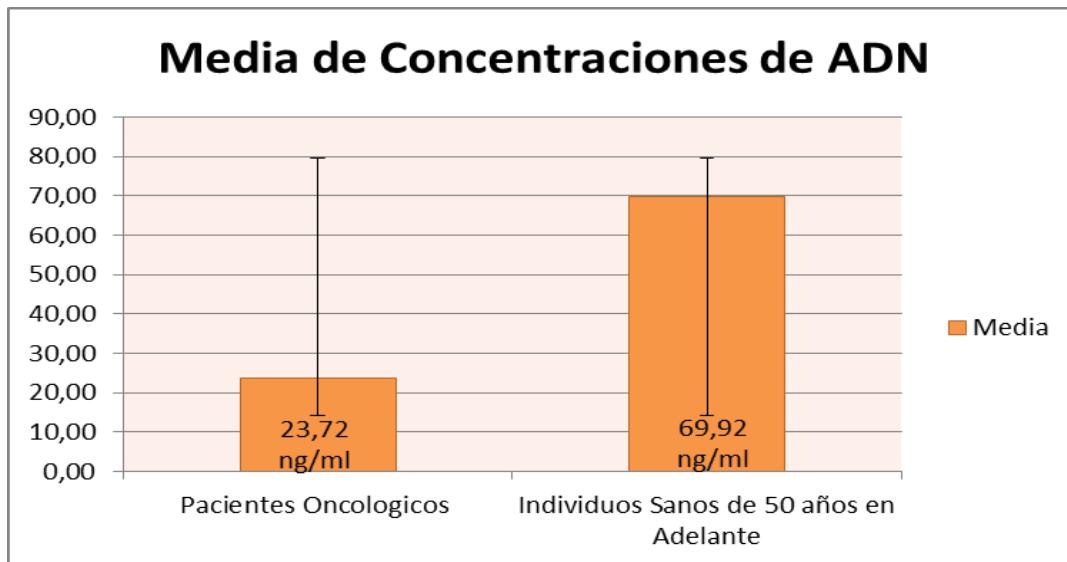
Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se ha determinado que no existen diferencias significativas entre los individuos hipertensos y los sanos ($p > 0,05$). Por lo tanto, no se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que no hay evidencia suficiente para afirmar que exista una diferencia significativa entre los mencionados.

Los valores presentados en la tabla 13, muestran el estudio estadístico que compara un grupo de Pacientes Oncológicos y otro grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes con respecto a sus concentraciones de ADNcf con una media en el grupo de Pacientes Oncológicos de 27,38 ng/ml y el grupo individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes de 69,92 ng/ml media que también se observa en el gráfica 11, mediante el estadístico de la Prueba T de Student obteniendo una p de 0,08 y un valor critico de 2,16.

Tabla 13. Prueba t de student de Comparación entre grupo de Pacientes Oncológicos y otro grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes con respecto de sus Concentraciones de ADNcf.

	Pacientes Oncológicos	Individuos Sanos de 50 años en Adelante
Media	23,72	69,92
Varianza	310,59	2674,64
Observaciones	8	9
Varianza agrupada	1571,42	
Diferencia hipotética de las medias	0	
Grados de libertad	15	
Estadístico t	-2,40	
P($T \leq t$) dos colas	0,03	
Valor crítico de t (dos colas)	2,13	

Gráfica 11. Media de concentraciones de ADN de grupo Pacientes Oncológicos y otro grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes, con error estándar.



Hipótesis específica 7.

Ho: No existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre el grupo de Pacientes Oncológicos y el grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes

Ha: Existen diferencias en las medias para las Concentraciones de ADN entre el grupo de Pacientes Oncológicos y el grupo de individuos sanos pertenecientes al mismo grupo etario que los pacientes

Tras realizar el análisis estadístico correspondiente, se pudo constatar la presencia de diferencias significativas entre los grupos estudiados con un valor de p inferior a 0,05, lo que indica una alta probabilidad de que dichas disparidades no hayan ocurrido por azar. Por lo tanto, se puede rechazar la hipótesis nula y se concluye que hay evidencia suficiente para afirmar que existe una diferencia significativa entre los mencionados.

DISCUSIONES

En el presente trabajo de investigación “Niveles de ADNcf Utilizando Espectrofotometría Uv-Visible en muestras de sangre de Pacientes Oncológicos”, participaron 62 personas adultas de diferentes grupos etarios que comprenden desde los 22 años hasta los 70 años de edad. El grupo de 20 a 30 años fueron estudiantes de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes que se encontraban sanos. El grupo etario correspondiente a los 31 años en adelante fueron individuos que acudieron al Laboratorio General del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes y 8 Pacientes Oncológicos que acudieron al Laboratorio General y a la Unidad de Urología del Instituto Autónomo Hospital Universitario de Los Andes. Se prepararon controles positivos de ADN nuclear a partir de leucocitos empleando el método Lahiri y Nurnberger., 1991 obteniendo una concentración de ADN en estado puro de 3569,5 ng/ul con un porcentaje de pureza del 90% lo que indica una alta eficiencia. Se estableció medir a 2 longitudes de onda (260 y 280 nm) puesto que en estas los ácidos nucleicos y proteínas absorben mayor cantidad de luz UV.

Por otra parte en la optimización de condiciones de trabajo para la determinación de ADNcf en plasma, los resultados mostraron que es posible utilizar el procedimiento adaptado del propuesto por (Lahiri y Nurnberger., 1991). Las concentraciones obtenidas por este método se pueden utilizar como una aproximación de los valores. A pesar de que se probaron diferentes condiciones la contaminación con proteínas, las cuales son muy frecuentes en plasma no se pudo optimizar, por lo que la aplicación de esta técnica en futuros trabajos requeriría pruebas adicionales que permitan establecer las mejores condiciones preanalíticas. Es importante destacar que el protocolo inicial fue diseñado para extraer ADN nuclear a partir de leucocitos, por lo que los primeros pasos dedicados a la separación celular fueron omitidos.

Adicionalmente, sería importante explorar métodos de extracción basados en extracción con solventes orgánicos, el cual ha sido el principal método (sin el uso de kit comerciales) que ha sido empleado para este propósito. Muchos autores informan

que la fase preanalítica tiene la mayor frecuencia de errores asociados con las pruebas de laboratorio, (Wallin., y cols., 2008). Según los criterios utilizados para determinar los errores asociados a cuestiones pre-analíticas, estos pueden representar más del 90% del error total, lo que indica la necesidad de centrarse en este paso en la planificación del estudio del ADN libre en plasma ya que no existe consenso sobre los resultados de concentraciones y métodos analíticos en estudios de pacientes con cáncer. Sería importante desarrollar un método estandarizado para la recolección de muestras y el aislamiento del ADN para evitar errores preanalíticos y valores que van desde concentraciones apenas detectables hasta unos pocos nanogramos por mililitro, y donde jugaría un papel muy importante la técnica utilizada para la cuantificación, por la sensibilidad del método.

Existe una considerable controversia sobre las concentraciones de referencia de ADN en controles sanos, con valores reportados que van desde concentraciones apenas detectables hasta unos pocos nanogramos por mililitro, (Koffler., y cols., 1973). Sin embargo, la mayoría de los autores coinciden en que las concentraciones de ADN son mayores en personas con diversos trastornos malignos y no malignos que en controles sanos, (Pathak y cols., 2006). En individuos sanos, el ADNcf se origina a partir de la apoptosis, mientras que en tumores malignos su origen es producto de apoptosis, necrosis y senescencia, (Szilelgyi., y cols., 2020).

Muchos estudios han abordado el uso de ADN en suero/plasma para el tratamiento de enfermedades, (Kamm y Smith., 1972). Sin embargo, en términos de cuantificación del ADN, no existe un estándar. En el pasado, los ensayos colorimétricos o fluorométricos utilizaban reactivos como la difenilamina, que cuando se añadía al plasma/suero del paciente producía un cambio de color cuyo grado se correlacionaba con la concentración de ADN, (Kamm y Smith., 1972). La escasa especificidad y sensibilidad de los reactivos y sus reacciones secundarias con otros componentes de las muestras habrían limitado su uso en análisis cuantitativos.

Varios grupos de investigadores han utilizado diferentes protocolos de extracción de ácidos nucleicos para plasma y suero. Ha habido relativamente pocos estudios cuantitativos que comparen formalmente el rendimiento de estos diferentes

protocolos de extracción. Para futuras aplicaciones a gran escala de la tecnología de ADN de plasma/suero, será necesaria la automatización de la preparación de ácidos nucleicos. Varios investigadores en el campo de los ácidos nucleicos circulantes están comenzando a evaluar los sistemas de preparación de ácidos nucleicos, (Costa y Ernault, 2002). También se están explorando cuestiones pre-analíticas, como una comparación formal de plasma y suero y los efectos de diferentes protocolos de centrifugación.

La concentración de ADN se obtuvo mediante Espectrofotometría UV- Visible aplicando la corrección de la absorbancia de 260 y 280 nm realizando una resta del control negativo el cual se preparó empleando los reactivos utilizados en la técnica de extracción, con agua en lugar de plasma para realizar la corrección y que los reactivos presentes en la técnica de extracción no interfirieran en la concentración de ADNcf.

Además se obtuvo la concentración real de ADN por medio de la relación de absorbancias 260/280 obedeciendo a la tabla 1 según se detalla en la metodología. En la Tabla 4 se observan las concentraciones de ADN en personas sanas con una media de 53,89 ng/ml empleando como técnica de extracción el procedimiento adaptado del propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 (Lahiri y Nurnberger., 1991). Debido al reducido número de estudios en población general, comparamos nuestros resultados con los obtenidos en grupos control de otros estudios. Un primer estudio en población china realizado por Zhong y cols., 2007 reportó 1,121 copias/ml de ADNcf, en tanto que Guidi y cols., 2006 en un estudio realizado en Colombia, encontró 720 ng/ml de ADNcf. Mientras que Rodríguez y cols., 2021 en un estudio a una población en México reportó 108.08 ng/ml. En estos tres estudios se utilizó q-PCR para la amplificación del ADNcf, por lo que las diferencias en los resultados parecen no estar relacionadas con la técnica utilizada, considerando que pueden existir factores poblacionales o estilos de vida que influencien las variaciones de concentración de ADNcf. Al respecto Sedlackova y cols., 2013 sugieren que la concentración de ADNcf puede ser subestimada cuando se emplea q-PCR debido a la presencia de moléculas de ADNcf altamente fragmentadas que no logran amplificarse.

Los resultados obtenidos en este estudio son completamente disímiles a los obtenidos en otras poblaciones. Las razones de estas diferencias podrían ser múltiples, aunque los procesos metodológicos usados probablemente son los más importantes. Seguramente, estudios que incluyan una mayor muestra poblacional, con grupos de edad más equilibrados, podrían dar resultados más consistentes y comparables.

Ahora bien, algunos de los aspectos más relevantes que podrían explicar estas diferencias pueden ser debido al tipo y manejo de la muestra o probablemente debido a lisis celular. Para la extracción de sangre se utilizan desde tubos convencionales con EDTA hasta aquellos con factores de protección a largo plazo. El tiempo y condiciones de almacenamiento de muestras también podrían influir en los resultados, (Guidi., y cols., 2006).

Cabe destacar que los controles negativos pacientes que no padecen de cáncer que participaron en este estudio, eran individuos que asistían al Laboratorio General del IAHULA, y por ende estos padecían de ciertas enfermedades que pueden alterar los valores de ADNcf tales como la dislipidemia, enfermedades cardiovasculares, diabetes, enfermedades infecciosas, entre otras. Estas condiciones de salud pueden desencadenar procesos inflamatorios, estrés oxidativo y daño celular, lo que a su vez puede influir en la liberación de ADN al torrente sanguíneo.

Algo semejante ocurre con las concentraciones de ADN en Pacientes Oncológicos que se observan en la Tabla 5 con una media de concentración 23,72 ng/ml empleando como técnica de extracción el procedimiento adaptado del propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991 (Lahiri y Nurnberger., 1991). Comparando los resultados con los reportados en este trabajo se observa que los valores obtenidos difieren con respecto a los reportados, ya que las concentraciones de ADNcf disminuyen en lugar de aumentar con respecto a los pacientes control.

En este orden de ideas, Ren y cols., 2024 evaluaron muestras de plasma de 71 pacientes con NSCLC (Cáncer de pulmón de células no pequeñas), realizando la extracción con el kit de ácido nucleico circulante QIAamp (Qiagen, Alemania), Y empleando como método de cuantificación la técnica q-PCR. Ellos reportaron una

media de concentración de 21,11 ng/ml, evidenciándose que los valores obtenidos por los autores son similares a los que se obtuvieron en este estudio. Cuando se comparó la concentración del ADNcf con los controles del grupo etario correspondiente, se observó una diferencia significativa. A pesar de tener una muestra pequeña, se puede evidenciar una tendencia estadística de que existe diferencia entre los controles y los pacientes oncológicos, aunque es de notar que debido al pequeño tamaño muestral, el estudio puede limitarse.

Por lo que se refiere a la prueba estadística t de student, en la mayoría de los casos no se presentan diferencias significativas en la media de los grupos estudiados, excepto en la comparación de los grupos etarios de 20-35 años y 36-55 años, lo cual tiene concordancia con la literatura ya que se reporta que en los grupos etarios mayores de 40 años los valores de ADNcf se elevan en comparación con grupos de menor edad.

Otro punto importante de resaltar es que las publicaciones en las que se reportan valores de ADNcf elevados en pacientes oncológicos no evidencian la edad del grupo control o negativo con el cual los comparan, siguiendo este un aspecto importante y de gran relevancia ya que en este estudio se demostró que la edad es un factor influyente en el valor de la concentración de ADNcf.

En definitiva el potencial clínico del ADNcf, especialmente en el campo del cáncer, es verdaderamente fascinante. La capacidad de detectar y analizar fragmentos de ADN tumoral en la sangre de los pacientes, abre un mundo de posibilidades en cuanto al diagnóstico temprano, monitoreo de la progresión de la enfermedad, evaluación de la respuesta al tratamiento y detección de posibles recaídas. Esta herramienta no invasiva y relativamente sencilla de obtener, puede revolucionar la forma en que se aborda el cáncer, permitiendo una medicina más personalizada y precisa. Sin duda, el estudio del ADNcf representa un avance significativo en la medicina moderna que promete mejorar la calidad de vida y las tasas de supervivencia de los pacientes con cáncer. Sin duda el ADNcf puede representar un antes y un después en la oncología.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

El protocolo propuesto por Lahiri y Numberger en 1991, permite la extracción de ADN nuclear a partir de leucocitos presentando una alta eficiencia (90%).

La adaptación del Protocolo propuesto por Lahiri y Nurnberger en 1991. Permitió la detección de ADNcf a partir de plasma de sangre de pacientes oncológicos y personas sanas. Sin embargo es necesario afinar aún más el protocolo con la finalidad de disminuir la contaminación con proteínas.

El análisis con Espectrofotometría UV-Visible presentó buena sensibilidad en la detección y cuantificación de ADN circulante, ya que los límites de detección y cuantificación fueron apropiados para el estudio realizado. La Espectrofotometría UV-Visible demostró ser una técnica novedosa y una herramienta muy valiosa para la determinación cuantitativa de ADN circulante.

Las condiciones preanalíticas del estudio del ADNcf influyen de forma determinante en el proceso analítico, por lo que su implantación y control debe realizarse de forma rigurosa.

Existen diferencias significativas entre los pacientes oncológicos y los individuos que no presentan esta patología. Además se debe resaltar que la edad es un factor determinante en la concentración de ADNcf

Otras Patologías como dislipidemia, infecciones y enfermedades cardiovasculares pueden influir en el valor de la concentración de ADNcf

Recomendaciones.

Emplear otras técnicas de extracción de ADN como por ejemplo, las técnicas con solventes orgánicos.

Es de suma importancia establecer valores de referencia de ADN circulante en una población control numerosa, que habite en la ciudad de Mérida y donde las personas tengan similitudes en cuanto a varios parámetros, por ejm., hábitos alimenticios, estilo de vida, sexo, edad, entre otros.

A nivel global es necesario generar una estandarización de la técnica de extracción de ADNcf con la finalidad de que se empleé la misma a nivel universal y poder comparar los valores, así como analizar otros factores tales como: Poblaciones, estilos de vida entre poblaciones mestizas y caucásicas.

Aumentar el tamaño de la muestra en futuros estudios sobre todo en cuanto a los pacientes oncológicos.

Determinar el tamaño de los fragmentos de ADNcf por técnicas como qPCR entre otros.

Entre los objetivos principales que trataremos de llevar a cabo con la continuación de esta investigación, podemos mencionar el hecho de que la determinación cuantitativa de ADN circulante, sea un marcador para poder diferenciar entre pacientes sanos y pacientes con cáncer. En este orden de ideas, habría que estar totalmente seguros de que los pacientes sanos no presentan cáncer u otras patologías como: inflamación, infección, insuficiencia respiratoria, embolismo, entre otras, ya que estas también producen alteraciones del ADN circulante.

Con respecto al punto anterior, al lograr que la concentración de ADN circulante sea un marcador, se podría diagnosticar de forma temprana la presencia de un tumor, cancerígeno o no, y así evitar los métodos de detección del cáncer los cuales son muy invasivos.

REFERENCIAS BIBLIOHEMEROGRÁFICAS

- Abe, T., Nakashima, C., Sato, A., Harada, Y., Sueoka, E., Kimura, S., ... y Sueoka-Aragane, N. (2020). Origen del ADN libre circulante en pacientes con cáncer de pulmón. *PLoS One*, 15 (7), e0235611.
- Abellán, A., y Torres, L., (2012). Determinación de los niveles de cromo 6 y cromo 3 en aguas del río albarregas del estado Mérida utilizando espectrofotometría UV-Vis. Universidad de los Andes.
- Abril, N., Bárcena, J., Fernández, E., Galván, A., Jorrín, J., Peinado, J. (2010). Espectrometría: Espectros de absorción y cuantificación colorimétrica de biomoléculas. *Revista Universitaria de Rabanales*, 2 (8): 1- 8.
- Alberg, A, y Samet, JM (2003). Epidemiología del cáncer de pulmón. *Chest*, 123 (1), 21-49.
- American Cancer Society (2020) ¿Qué es el Cáncer ? Disponible en: <https://www.cancer.org/es/cancer/entendimiento-del-cancer/que-es-el-cancer.html>.
- Bahsas, R. (2022). Medio Interno y su Regulación, Fisiología de la Sangre. En: Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes, Mérida (Venezuela). Complemento de la Unidad de Aprendizaje 1 de la Unidad Curricular de Fisiología.
- Beck J, Oellerich M, Schulz U, Schauerte V, Reinhard L, Fuchs U, Knabb C, Zittermann A, Olbricht C, Gummert J, Shipkova M, Birschmann I, Wieland E, Schütz E. (2015). Donor-Derived Cell-Free DNA Is a Novel Universal Biomarker for Allograft Rejection in Solid Organ Transplantation. *Rev Transplantation Proceedings*, 47 (8): 2400-2403.
- Bettegowda, C., Sausen, M., Leary, RJ, Kinde, I., Wang, Y., Agrawal, N., ... y Díaz Jr, LA (2014). Detección de ADN tumoral circulante en neoplasias malignas humanas en etapa temprana y tardía. *Science Translational Medicine*, 6 (224), 224ra24-224ra24.

- Bronkhorst A, Aucamp J, Pretorius P. (2015). Cell-free DNA: Preanalytical variables. *Clinica Chimica Acta*, 450 (52): 243-253.
- Brunatti, C., & Martín, A. (2010). Introducción a la espectroscopía de absorción molecular ultravioleta, visible e infrarrojo cercano. Recuperado el, 24.
- Calasanz, M. J. (2006, August). Nueva era de investigación en cáncer. In *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* (Vol. 29, No. 2, pp. 173-176). Gobierno de Navarra. Departamento de Salud.
- Cancer Research UK. (2017). Serie hipotética de mutaciones que llevan al cáncer
- Chan, R., Lok, K., Woo, J. (2009). Cáncer de próstata y consumo de vegetales. *Mol. Nutrición. Res. Alimentaria*, 53 (2): 201-216.
- Chargaff E, Davidson J. (1950). The Nucleic Acids. Chemistry and Biology (No Title).
- Charlot I, Salmon J, Gagneux L, Brochot, J, Eschard P. (2012). Mieloma multiple. *EMC - Aparato Locomotor*, 45 (1): 1-13.
- Chávez, S., Bravata, C. Acosta G., Reyes O., & Sierra, M. (2016). Uso de citometría de flujo para detectar células tumorales circulantes en pacientes con cáncer de mama. *Revista del Hospital Juárez de México*, 82(3-4), 155-164.
- Cheng L, Alexander R, MacLennan G, Cummings O, Montironi R, Lopez A, Cramer H, Davidson D, Zhang S. (2012). Molecular pathology of lung cancer: Key to personalized medicine. *Mod Pathol*, 25 (3): 347-369.
- Cortina, L., & López De R. (2000). Utilización de la sangre y sus componentes celulares. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 16(2), 78-89.
- Costa JM, Ernault P. (2002). Ensayo automatizado para análisis de ADN fetal en suero materno. *Clin Chem*. 48:679–680
- Crowley E, Di Nicolantonio F, Loupakis, F, Bardelli, A. (2013). Liquid biopsy: monitoring cancer-genetics in the blood. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 10 (8): 472-484.
- Dasari, A., Morris, V. K., Allegra, C. J., Atreya, C., Benson III, A. B., Boland, P., ... & Kopetz, S. (2020). ctDNA applications and integration in colorectal cancer:

- an NCI Colon and Rectal-Anal Task Forces whitepaper. *Nature reviews Clinical oncology*, 17(12), 757-770.
- Dawson, SJ, Tsui, DW, Murtaza, M., Biggs, H., Rueda, OM, Chin, SF, & Rosenfeld, N. (2013). Análisis del ADN tumoral circulante para el seguimiento del cáncer de mama metastásico. *Revista de Medicina de Nueva Inglaterra*, 368 (13): 1199-1209.
- Diaz Jr, L. A., & Bardelli, A. (2014). Liquid biopsies: genotyping circulating tumor DNA. *Journal of clinical oncology*, 32(6), 579-586.
- Ezquerro, J., Trejo, C., González, A. (2008). El ADN circulante y su potencial clínico. *Ciencia, Revista de la Academia Mexicana de Ciencias*, 59 (1): 64-73.
- Fierro F. (2014). Electroforesis de ADN. En Cornejo A, Serrato A, Rendón B, Rocha M (Eds.), *Herramientas moleculares aplicadas en ecología: aspectos teóricos y prácticos* (pp. 27-51). México, D.F. Primera edición.
- Gil M, Valero D. (2017). Nuevas Tecnologías Para El Diagnóstico Genético. REV. MED. CLIN. CONDES, 28(4) 538-545.
- Gil Sabater, A. (2021). Validación de nuevos biomarcadores no invasivos para el cáncer renal: DNA libre circulante en orina (Doctoral dissertation, Universitat Politècnica de València).
- Global Oncology Trends, (2019). Terapéutica, desarrollo clínico e implicaciones para el sistema de salud. IQVIA Institute for Human Data Science. Disponible en: <https://www.iqvia.com/insights/the-iqvia-institute/reports-and-publications/reports/global-oncology-trends-2019>
- Gonzales C, Rodríguez S, Herrera D, Becerra P, Silva M, Locia J, Martínez M, Aguilar M. (2007). Prolactin and prostate cancer. *Revista Médica de la Universidad Veracruzana*, 7 (2): 26-31.
- Guidi GC, Lippi G, Solero GP, Poli G, Plebani M. (2006). Gestión de la transferibilidad de datos de laboratorio. *Clin Chim Acta* 374: 57–63.
- Hendy O, Motalib T, El Shafie M, Khalaf F, Kotb S, Khalil A, Ali, S. (2016). Circulating cell free DNA as a predictor of systemic lupus erythematosus

- severity and monitoring of therapy. Egyptian Journal of Medical Human Genetics, 17 (1): 79-85.
- Hernández, R., Fernández, C., & Baptista, P. (2014). *Metodología de la investigación* (Vol. 6, pp. 102-256). México: McGraw-Hill.
- Huanca P. (2013). Contaminantes atmosféricos que ocasionan efectos genotóxicos y mutagénicos en la humanidad Riesgo de cáncer y mutación por contaminantes ambientales. Revista CON-CIENCIA, 1(1): 123-130.
- Hurtado, J., (2010). Metodología de la investigación: guía para la comprensión holística de la ciencia. Quirón ediciones.
- Husain H, Velculescu V. (2017). Cancer DNA in the Circulation. JAMÁ, 318 (13): 1272- 1274.
- Illana J. (2014). Biología Molecular y estructura del ADN. An. Quím, 110 (3): 234-240.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2021) ¿Qué es el cáncer?. NHI. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/cancer/naturaleza/que-es>.
- Instituto Nacional del Cáncer. (2024). Tumor. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU.Diccionarios del NCI. <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionarios/diccionario-cancer/def/tumor>
- Jaraba, V., Torres, P., Manrique, D., & Gallo, E. (2021). Estado actual de las aplicaciones del ADN libre de célula circulante. Medicina & Laboratorio, 23(11-12), 551-564.
- Jiménez, I. (2015). Prevalencia de mutaciones patogénicas de los genes BRCA1 y BRCA2 en pacientes con cáncer de mama esporádico. Puesta a punto de un método de cribado basado en el análisis de las curvas de fusión de alta resolución.
- Juvenal G. (2014). Epigenética: vieja palabra, nuevos conceptos. Revista argentina de endocrinología y metabolismo, 51(2): 66-74.
- Kamm RC, Smith AG. (1972). Concentraciones de ácido nucleico en plasma humano normal. Clin Chem. 18:519–522.

- Karp, G. (2009). Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments. New York: John Wiley and Sons: 3 edición: 671-702.
- Knudson A. (1971). «Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma». Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68 (4): 820-3
- Koffler D, Agnello V, Winchester R, Kunkel HG (1973). J Clin Invest . 52:198–204.
- Lahiri, J. Nurnberger, Jr.(1991). A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. Nucleic Acids Research, 19(19) 5444
- Leary J, Sausen M, Kinde I, Papadopoulos N, Carpten J, Craig D. (2012). Detection of chromosomal alterations in the circulation of cáncer patients with whole-genome sequencing. Sci Transl Med, 4 (162): 154-162.
- López, M.D. (2021). *Evaluación del valor pronóstico de la detección y cuantificación de ADN circulante tumoral en pacientes con cáncer colorrectal estadio II y III* (Trabajo de Investigacion). Universidad Miguel Hernández.
- Macher C, Martínez M, Rubio A, León C, Conde M, Costa A, Navarro E, Guerrero J. (2012). Non-invasive Prenatal Diagnosis of Multiple Endocrine Neoplasia Type 2A using COLD-PCR Combined with HRM Genotyping Analysis from Maternal Serum. PLOS One, 142:241-243.
- Maldonado, J., Casañas, R., Martínez, I. (2018). La espectroscopia UV-Vis en la evaluación de la viabilidad de células de cáncer de mama. Revista Lat. Am. J. Phys. Educ. 12 (2): 1-7.
- Mandel, P., Métais, P. (1948). Les acides nucléiques du plasma sanguin chez l'homme [The nucleic acids of blood plasma in humans]. C R Acad Sci Paris; 142:241-243. Article in French.
- Martínez D, Gil O, Barón A. (2006). ESPECTROMETRIA DE FLUORESCENCIA DE RAYOS X. Revista colombiana de Física, 38 (2): 790-793.
- Martínez F, Ramos M, Miranda E. (2001). Alteraciones cromosómicas en la leucemia linfoblástica aguda. In Anales de Pediatría, 55 (1): 45-52.

- Martínez F. (2010). Estructura y Función del ADN y de los genes. I Tipos de alteraciones de la función del gen por mutaciones. Semergen, 36 (5): 273–277.
- Maston G, Evans S, Green M. (2006). Transcriptional regulatory elements in the human genome Annu. Rev Genomics Hum Genet, 7 (1): 29-59.
- Matheus P, Flores M, Bello A, Belandria O, Venezuela A. (2015). Método por Espectrofotometría de Absorción Molecular Visible para la Determinación de Yoduro en Muestras de Orina. Universidad de los Andes.
- Matheus P, Ramírez E, Araque J, Belandria O, Durán J. (2016). Espectrofotometría de Absorción Molecular Ultravioleta como una herramienta para estudiar el crecimiento de Las Cepas ATCC 25922 Y ATCC 35218 de Escherichia Coli. Acta Bioclínica, 6 (11): 44-59.
- Moss, J., Zick, A., Grinshpun, A., Carmon, E., Maoz, M., Ochana, B. L., ... & Dor, Y. (2020). El ADN circulante derivado de la mama permite la detección y el seguimiento universales del cáncer de mama localizado, 31(3), 395-403.
- Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, L. B., ... & Rosenfeld, N. (2018). Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Science translational medicine*, 10(466), eaat4921.
- Muñoz A. (1997). Cáncer: genes y nuevas terapias. Madrid: Editorial Hélice.
- National Human Genome Research Institute. (2022). Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). NHI. Disponible en: <https://www.genome.gov/es/genetics-glossary/Reaccion-en-cadena-de-la-polimerasa>.
- National Human Genome Research Institute NIH. (2018). Tipos de Codones y Aminoácidos
- National Library of Medicine.U.S (2022). Estructura de doble hélice del ADN.
- Organización Mundial de la Salud (OMS). 2022. Cáncer. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
- Organización de Naciones Unidas (ONU).2021. Mirada global Historias humanas. Disponible en: <https://news.un.org/es/story/2021/02/1487492>.

- Parra. S, Martínez. M, Cigarroa. I, Diaz. X, Matus. C, Garrido. A, y cols. (2021). ¿Cuál es la asociación entre actividad física, sedentarismo y riesgo de desarrollar cáncer en población adulta?. *Rev. chil. Nutr.*, 48(2): 245-254.
- Pathak A, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. (2006). ADN libre de células circulantes en plasma/suero de pacientes con cáncer de pulmón como posible herramienta de detección y pronóstico. *Clin Chem.* 52:1833–1842.
- Pérez, J., Sancho, F. (2003). Maquinas Moleculares Basadas en ADN. Secretariado de Publicaciones de la Universidad de Sevilla, Colección de divulgación científica, número 2.
- Phallen, J., Sausen, M., Adleff, V., Leal, A., Hruban, C., White, J., Velculescu, V. (2017). Direct detection of early-stage cancers using circulating tumor DNA. *Science translational medicine*, 9 (403): 2415- 2415.
- Piro, O. (2014). Breve historia del ADN, su estructura y función. *Rev Ciencia e Investigación*, 64 (3): 25-50.
- Caballero, Y., Patiño, S., Díaz, A., Otálvaro H. (2018). Técnicas de Análisis Fisicoquímico. Manual de Análisis Químico e Instrumental, 2, 15
- Ren, S., Yu1, Ch., Huang, Q. (2024). Valor diagnóstico de la detección combinada de la concentración e integridad del ADNcf en plasma en el NSCLC, *Future Medicine*. 10.2217/lmt-2023-0009.
- Riva F, Bidard F, Houy A, Saliou A, Madic J, Rampanou A. (2017). Patient-specific circulating tumor DNA detection during neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Clin Chem*, 63 (3): 691-699.
- Rodríguez M, Bustamante A, Perlado S, Trujillo M, Díaz J, Plaza J, Ramos C. (2012). Diagnóstico prenatal no invasivo: presente y futuro de mano de las nuevas tecnologías. *Diagnóstico Prenatal*, 23 (2): 67-75.
- Rodriguez J, Saucedo A, Rosales M, Barros P. (2021). Concentración e índice de integridad de ADN libre circulante en población general de Jalisco, México. **Revista Biomédica**, 32 (3): 166-171.

- Rodríguez, E., (2006). Detección y cuantificación de niveles de ADN circulante en suero humano utilizando espectrofotometría uv-visible. Revista Colombiana De Física, 38 (2): 946.
- Romero L, Patiño V. (2021). Qué es el Cáncer. Departamento de Patología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, 5(13): 7-22.
- Saambrook, J., & Russell, D. (2001). *Molecular Cloning, A laboratory Manual*. 3era edición. Cold Spring Harbor, New York.
- Sedlackova T, Repiska G, Celec P, Szemes T, Minarik G. Fragmentation of DNA affects the accuracy of the DNA quantitation by the commonly used methods. Biol Proceeds online. 2013; 15(1), 5. DOI: 10.1186/1480-9222-15-5
- Smith J, Wyatt G. (1951). The composition of some microbial deoxypentose nucleic acids Biochemical, 49 (2): 144- 148.
- Soca P, Herrera A, de León D, Márquez H, Rodríguez H. (2007). El cáncer una enfermedad genética. Correo Científico Médico de Holguín, 11 (3): 3-19.
- Szilelgyi1, O., Keserű1, P., Melrtón1, B., Szemes, N. (2020). Ácidos nucleicos libres de células circulantes: Características principales y aplicación clínica. Int. J. Mol. Ciencia: 21, 6827.
- Tomonori A, Nakashima Ch, Sato A, Harada Y, Sueoka E, Kimura Sh, Kawaguchi A, Aragane A. (2020). Origen del ADN libre circulante en pacientes con cáncer de pulmón. PloS one. 15(7). doi: 10.1371/journal.pone.0235611
- Torres C, Pérez C. (2018). Biomarcadores y práctica clínica. Anales Sis San Navarra, 39 (1): 5-8.
- Torres C, Pérez C. Biomarcadores y práctica clínica. Anales Sis San Navarra. 2016; 39(1). http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272016000100001&lng=es. (Ultimo acceso 25 julio de 2022).
- Trujillo L. (2020). Metabolismo de células cancerosas (Trabajo de Investigación). Universidad de la Laguna, Facultad de Farmacia.

- Underhill, H., Kitzman, J., Hellwig, S., Welker, N., Daza, R., Baker, D. (2016) Longitud del fragmento de ADN tumoral circulante. PLoS Genet, 12 (7): 1-24.
- Wallin O, Söderberg J, Van Guelpen B, Stenlund H, Grankvist K, et al. (2008) Exijan una mejora de las prácticas preanalíticas de muestreo de sangre venosa: una encuesta sobre la gestión de solicitudes de pruebas, el etiquetado de los tubos de ensayo y los procedimientos de búsqueda de información. Clin Chem Acta 391: 91–97.
- Yang P. (2009). Epidemiology of Lung Cancer Prognosis: Quantity and Quality of Life. Methods Mol. Biol, 471: 469–86.
- Zhong XY, Hahn S, Kiefer V, Holzgreve W. (2007). Is the quantity of circulatory cell-free DNA in human plasma and serum samples associated with sex, age, and frequency of blood donations? Ann Hematol. 86(2), 139-143. doi: 10.1007/s00277-006-0182-5.

ANEXOS

Anexo 1



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



Código

Apellido: _____ Nombre: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Lugar y Fecha de nacimiento: _____

Dirección actual: _____ Teléfono: _____

Procedencia: Abuela Materna _____ Abuelo Materno _____
Abuela Paterna _____ Abuelo Paterno _____

Encuesta

Estilo de vida

1. ¿Hace usted ejercicio?

Si	No
----	----

2. Cuántas veces a la semana?

Veces	
-------	--

3. ¿Lleva usted una alimentación balanceada?

Si	No	No Sabe
----	----	---------

Antecedentes de Enfermedad

4. Algun Familiar ha padecido de cáncer.

Si	No	No Sabe
----	----	---------

5. Qué tipo de Cáncer_____

6. Es Usted Paciente Oncológico

Si	No
----	----

7. Actualmente recibe tratamiento

Si	No
----	----

8. Conoce el Estadio de la enfermedad

Si	No
Estadio:	

9. Tiene algún órgano trasplantado

Si	No
----	----

10. Tipo de Cáncer que padece

[Empty box for answer]

11. Hace cuánto tiempo fue Diagnosticado.

[Empty box for answer]

12. Se ha realizado anteriormente pruebas de ADN circulante.

Si	No
----	----

13. Sufre de alguna enfermedad cardiovascular

Si	No
Cual	

Anexo 2



REPUBLICA BOLIVARIANA DE VENEZUELA
UNIVERSIDAD DE LOS ANDES
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS
ESCUELA DE BIOANÁLISIS
LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL



CONSENTIMIENTO INFORMADO

Apellidos _____ Nombres: _____
Edad: _____ Género M(____)F(____) Lugar y Fecha de Nacimiento: _____
Dirección: _____ Teléfono: _____

El presente trabajo de investigación tiene como objeto la Determinación de los Niveles de ADN Circulante utilizando Espectrofotometría Uv-Visible en Muestras de Sangre de Pacientes Oncológicos.

En este trabajo se garantiza la absoluta confidencialidad de los resultados obtenidos. Los encargados del desarrollo de esta investigación, Prof. Dr. Pedro Matheus (Tutor), Prof. Dra. Andrea Avendaño (Cotutora), no reciben beneficios económicos por la realización de este trabajo, salvo los beneficios curriculares que su publicación pueda acarrear y el beneficio social para la comunidad.

Quien suscribe, señala que ha leído la información y ha tenido la oportunidad de hacer preguntas sobre el particular, todas han sido contestadas, y por tanto, da su consentimiento para que su muestra de sangre sea utilizada para el mencionado estudio. Recibe una copia de este consentimiento.

Mérida, a los _____ días del mes _____ de 2024

Firma del Paciente

Tutor

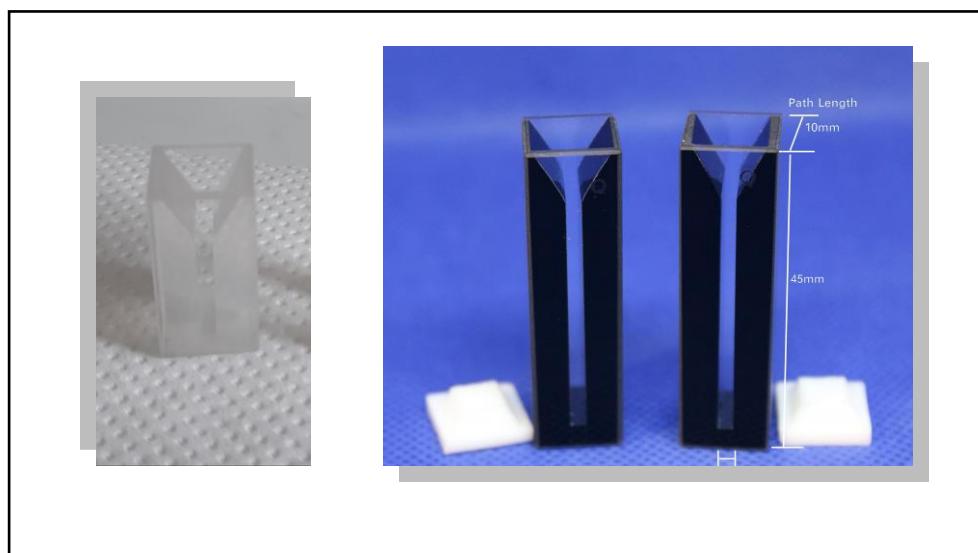
Lcda. en Bioanálisis

Cotutora

Anexo 3
Espectrofotómetro UV-Visible LAMBDA 3B Perkin Elmer.



Anexo 4
Celdas de Cuarzo



Anexo 5

Otros Equipos y Materiales usados



Centrífuga HERMLE Z 360 K (Capacidad para 24 tubos eppendorf y 8 Falcon).



Baño de María Precisión PS scientific con termómetro de 10°C a 150°C



Tubos Falcon y Tubos Eppendorf

Anexo 6
Pipetas Automáticas



Anexo 7

