

TÍTULO TRABAJO FIN DE MASTER:

**PRONÓSTICO E/OU DIAGNÓSTICO DA PROTEÍNA HuR E DO DNA
CIRCULANTE NO CANCRO GÁSTRICO E DE MAMA**

**VALOR PRONÓSTICO Y/O DIAGNÓSTICO DE LA PROTEÍNA HuR Y DEL
DNA CIRUCLANTE EN CÁNCER GÁSTRICO Y DE MAMA**

**PROGNOSTIC AND/OR DIAGNOSTIC VALUE OF HuR PROTEIN AND
CIRGULATING DNA IN GASTRIC AND BREAST CANCER**

ALUMNO: CARLOS ARTURO GONZÁLEZ CASTAÑEDA

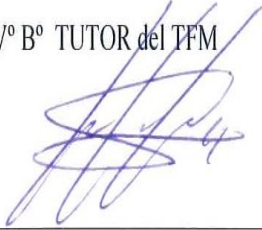
DIRECTORA: DRA. ANGELICA FIGUEROA CONDE-VALVIS
INVESTIGADORA PRINCIPAL
GRUPO DE INVESTIGACIÓN TRASLACIONAL DEL CÁNCER
INSTUTO DE INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA A CORUÑA (INIBIC)

CURSO 2014/2015

FECHA DE PRESENTACIÓN: 26 JUNIO 2015



Vº Bº TUTOR del TFM



Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvis

Vº Bº TUTOR ACADÉMICO



Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva

ALUMNO



Carlos Arturo González Castañeda

INDICE

1- Introducción	5
2- Objetivos	9
3- Material y Métodos	
3.1. <i>Pacientes y Muestras</i>	11
3.2. <i>Ensayo ELISA</i>	12
3.3. <i>Detección DNA circulante</i>	13
3.4. <i>Análisis Estadístico</i>	14
4. Resultados	
4.1- <i>Pacientes y controles: diseño del estudio</i>	17
4.2- <i>Análisis del contenido HuR</i>	
4.2.1 <i>Análisis del contenido HuR</i>	18
4.2.2 <i>Análisis Estadístico de HuR:</i>	20
4.2.3 <i>HuR y correlación con otros biomarcadores.</i>	21
4.2.4 <i>Potencial valor diagnóstico/pronóstico de HuR</i>	21
4.3- <i>Análisis del contenido HuR</i>	
4.3.1 <i>Análisis del contenido de DNAc</i>	25
4.3.2 <i>Análisis estadístico del DNA circulante</i>	27
4.3.3 <i>DNA circulante y correlación con otros biomarcadores.</i>	29
4.3.4 <i>Potencial valor diagnóstico/pronóstico del DNA circulante</i>	29
5. Discusión	33
6- Conclusiones	35
7- Agradecimientos	36

INTRODUCCIÓN

Introducción

El cáncer es una de las enfermedades más frecuentes a nivel mundial y según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) es una de las principales causas de muerte ocasionando aproximadamente 8 millones de defunciones anuales (1). Además de un descenso en la calidad de vida, gran parte de los casos a pesar del tratamiento, se resuelven finalmente con la muerte. Entre las principales neoplasias malignas se encuentran las de pulmón, próstata, mama, estomago, colon y hematopoyéticas. Muchas de estas neoplasias pueden tener un pronóstico favorable según el momento de instauración del tratamiento lo cual depende de un diagnóstico precoz, sin embargo, no existe en la mayoría de los casos un método de cribado o uso de biomarcadores para detección oportuna de tumores y en el caso de los existentes suelen tener una baja sensibilidad y especificidad. Es por eso que es prioritario el descubrimiento e implementación de nuevos biomarcadores. Se conoce como biomarcadores a las moléculas liberadas por las células, ya sean proteínas u otras macromoléculas, hacia fluidos corporales, dentro de los cuales el suero es el más importante por su facilidad de obtención y manipulación; estos son necesarios para apoyar el diagnóstico, para evaluar la evolución de la enfermedad, así como predecir la respuesta a los tratamientos, por lo cual son una herramienta con un potencial de gran utilidad y son el punto de encuentro entre la clínica y la biología molecular tumoral.

En el presente trabajo se pretende explorar de forma preliminar la potencialidad como biomarcadores de la proteína HuR y el DNA libre circulante presentes en sueros de pacientes afectados de tumores gástricos y de mama avanzados.

La proteína HuR (Human antigen R) es una proteína de unión a RNA (BPR –Binding Protein RNA) que pertenece a la familia ELAV (Embryonic Lethal-Abnormal Vision) 1 y 2, en la cual existen otros miembros de ésta familia que son HuB, HuC y HuD que se encuentran en sistema nervioso mientras que HuR se expresa en múltiples tejidos como son el adiposo, intestinal, bazo, testículo y mama, además HuR se ha descrito en tejidos neoplásicos aunque existen estudios que respaldan que incluso en lesiones pre malignas como la hiperplasia ductal atípica y el carcinoma ductal in situ de mama tiene niveles citoplasmáticos aumentados (2). HuR tiene la capacidad de regular la expresión de distintas moléculas por mecanismos post transcripcionales que afectan al RNA en su transporte, degradación y traducción. Dicho efecto lo logra mediante la unión a elementos ricos en adenina y uridina (ARE rich elements) localizado en las regiones 3' UTR de

los mRNA o a través de tres motivos de reconocimiento RRM (RNA Recognition Motif) (3) en la cola poli A (4). Normalmente HuR se encuentra en el núcleo pero viaja hacia al citoplasma cuando recibe señales de daño en el DNA a través de la ATM protein kinasa (Ataxia Telangiectasia protein-kinase) la cual a su vez activa a las kinasas de check point 1 y 2 que además de trasladar a HuR al citoplasma controla la unión a mRNAs (3).

HuR interacciona con algunos miRNA por tener sitios funcionales en los mRNA lo que sugiere una interrelación favorable o antagónica para la estabilización del mRNA(5). Tal es el caso de miR-200c y su interacción con HuR en el transcrito de la tubulina de clase III en tumores de ovario(6). En general el papel más estudiado de HuR es el relacionado con la estabilización de los transcritos de los mRNA como es el caso del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) y de la cicloxigenasa tipo 2 (COX2) que están asociados a la angiogénesis tumoral y proliferación celular respectivamente (7); También es capaz de mantener el mRNA de la enzima DNA metiltransferasa 3b (DNMT3b) la cual al estabilizarse termina por sobre expresarse y generar un patrón de hipermetilación de genes tumorales (8). Además en algunos estudios se revela la capacidad de unión de HuR a miembros de la familia antiapoptótica de bcl-2 y esto se relaciona con aumento en el crecimiento tumoral y resistencia a tratamientos normales de quimioterapia (9). Otras alteraciones en las dianas de HuR en otros mRNA incluyen supresores tumorales (p53), ciclinas (A, B1 y D1), protooncogenes (c-fos, c-myc), citocinas (TGF- β , TNF- α) (3), moléculas de señalización mitóticas (MAP kinasa), metaloproteinasas de matriz 9 y 7 (MMP9, MMP7), el factor inducible por hipoxia (HIF-1a) y el factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) (10).

Por la gran versatilidad de ésta proteína decidimos analizarla con ensayo ELISA por su rapidez y sencillez en la detección de moléculas, además en el caso de HuR existen pocos estudios que respalden su uso rutinario.

En cuanto al DNA libre circulante es aquel DNA que se encuentra en la sangre de la circulación sistémica (11), el cual se encuentra incrementado en individuos con cáncer. Aunque no se conoce con certeza el mecanismo mediante el cual el DNA es liberado a la circulación algunas hipótesis sugieren que es liberado por células tumorales apoptóticas o necróticas (12) o provenientes de células metastásicas o tumorales circulantes (13). También se sugiere que proviene de células no tumorales circundantes al tejido tumoral (14) que son degeneradas por daño directo o por la

hipoxia que genera el crecimiento tumoral (15). Esto puede ser utilizado para detección no solo de tumoraciones avanzadas sino para neoplasias incipientes e incluso pre malignas (16).

El DNAc se puede encontrar en suero y plasma lo que hace que sea una molécula de detección simple y accesible de interés para análisis rutinario. Además el DNAc puede servir como herramienta del estudio de mutaciones tumorales en el DNAc (17) (18). Convencionalmente se había utilizado técnicas de detección por PCR en tiempo real, sin embargo no es un método que pueda ser utilizado de forma rutinaria por el elevado coste y falta de sencillez, por lo que se ha optado por el método de detección directa de fluorescencia con el uso de fluorocromos de afinidad por ácidos nucleicos que se unen al DNA circulante y mediante fluorometría se hace la lectura de emisión (19). Tal es el caso del colorante SYBR Gold el cual es un agente intercalante que se creía incapaz de utilizarse en muestras biológicas sin embargo se ha demostrado que puede tener una sensibilidad mayor al bromuro de etidio y el SYBR Green II.

En el presente trabajo se tomaron muestras de suero de pacientes del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña, con diagnóstico de cáncer de mama y gástrico en estadio IV de quienes se obtuvieron datos clínicos, histológicos y de laboratorio. Se determinaron los valores en suero de HUR mediante ensayo ELISA y los de DNA circulante mediante ensayo de fluorometría y se determinó su valor como biomarcadores para diagnóstico y pronóstico mediante análisis estadístico.

OBJETIVOS

1. Obtención de datos clínicos y patológicos de una cohorte de pacientes con diagnóstico de cáncer gástrico y de mama.
2. Determinación de los niveles de la proteína HuR en sueros de pacientes con cáncer gástrico y de mama versus individuos sanos, mediante ensayo ELISA.
3. Determinación de los niveles de DNA circulante en suero de pacientes con cáncer gástrico y de mama versus individuos sanos, mediante fluorometría.
4. Estudio de la posible relación de HuR y DNA circulante con otros biomarcadores ya utilizados.
5. Estimación del posible valor diagnóstico y/o pronóstico de la proteína HuR y del DNA circulante en clínica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes y Muestras

Se incluyeron 109 pacientes, del Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña en Galicia, España (CHUAC), con diagnóstico de cáncer en estadio IV, de entre 2006 y 2009, de los cuales 57 fueron de mama y 52 de gástrico, sin enfermedades concomitantes conocidas ni tratamiento antineoplásico o quirúrgico al momento del diagnóstico. Se les realizó extracción de sangre venosa periférica (10ml) en tubo sin anticoagulante y posterior extracción de suero mediante centrifugación. Se incluyeron sueros control de personas sanas que fueron obtenidos de los acompañantes de los pacientes el día de consulta.

Las muestras de suero fueron almacenadas a -80°C hasta su uso. Todos los pacientes que fueron incluidos aceptaron la extracción de sangre y ser parte del estudio mediante consentimiento informado. Se excluyeron paciente con estadio inferior a IV. Además se recabaron algunos datos clínicos, histopatológicos y de laboratorio del expediente clínico de los pacientes con el fin de correlacionar algunas de estas variables con los niveles de HUR y DNAc. El tipo histológico, tanto de la neoplasia de mama como cáncer gástrico, puede tener una estirpe tumoral de mayor significado pronóstico de la enfermedad.

Los tipos histológicos encontrados en cáncer gástrico fueron el intestinal y el difuso. Además se recogieron datos referentes al tratamiento quirúrgico y su valoración intraoperatoria para estadiaje TMN. Por último se recabaron algunas de las pruebas de laboratorio que más comúnmente se toman en este tipo de cáncer por el importante rol que tienen para determinar la extensión tumoral metastásica hepática.

La estirpe histológica de cáncer de mama se agrupo en ductal o lobulillar. Además, se obtuvieron marcadores tumorales que determinan el comportamiento y agresividad tumoral como es el caso de receptores hormonales y Her2.

Se recabaron además datos de seguimiento de los pacientes en el curso de su enfermedad desde la fecha de diagnóstico hasta el momento de este estudio.

Ensayo ELISA

La técnica de ELISA es un ensayo inmunoenzimático ampliamente empleado en el área médica para la cuantificación de moléculas, en este caso lo empleamos para la cuantificación de la proteína HuR (también llamada ELAVL1). El ensayo ELISA se hizo con el kit de detección para la proteína humana HuR basándose en las recomendaciones de la casa comercial (MyBioSource). Se extrajeron las muestras y controles de refrigeración y se dejaron a temperatura ambiente durante la preparación de los estándares. Para iniciar la preparación de estándares, se centrifugó a 10,000rpm por 30 segundos el vial del estándar facilitado por la casa comercial y a continuación se preparó la solución stock. Se añadió 1 ml del diluyente de muestra obteniendo una concentración final de 1600 pg/ml (lo que denominaremos S7). En los tubos siguientes (S6-S1) se añadió 250 µl de diluyente y 250 µl solución stock realizando una serie de diluciones seriadas. En el último tubo tan solo se añadieron 250 µl de diluyente (S0) (Tabla 1).

	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
Proteína pg/ml	0	25	50	100	200	400	800	1,600

Tabla 1. Estándares para la recta estándar en ensayo ELISA.

Una vez preparados los estándares se centrifugaron a 10,000 rpm por 30 segundos antes de iniciar el ensayo. Tanto los estándares, controles y muestras se llevaron por duplicado en una placa de 96 pocillos. Inicialmente se agregaron 100 µl de estándares, muestras o controles en cada pocillo y se dejó incubar durante 2 horas a 37°C, a continuación se eliminó el líquido. Se añadieron 100 µl del anticuerpo de Biotina (1x) y se incubó por 1 hora a 37°C. Se realizaron tres lavados con 200 µl de Buffer de lavado durante 2 minutos cada uno, y tras el último lavado se añadió a cada pocillo 100 µl de HRP-avidina (1x) y se incubó 1 hora a 37°C. Posteriormente se realizaron cinco lavados con 200 µl de Buffer de lavado durante 2 minutos cada uno y tras el último lavado se añadieron 90 µl del sustrato TMB, se cubrió de la luz y se incubó durante 30 minutos a 37°C.

Para finalizar se agregaron 50 μ l de la solución Stop e inmediatamente se realizó la lectura y determinación de la densidad óptica a una longitud de onda de 450nm, utilizando el lector de microplacas de la casa comercial (TECAN-Sunrise).

A continuación se construyó la recta de calibrado, con las medidas de absorbancia de los estándares para la obtención de la ecuación de la pendiente que nos permitió la extrapolación de datos a los controles y muestras. Todas las medidas se realizaron por duplicado y para cada elemento medido se obtuvo la media de absorbancia y se le restó el valor de S0 para eliminar concentraciones inespecíficas.

Detección DNA circulante

La detección en suero de DNA circulante se realizó por fluorometría conforme a distintos trabajos publicados donde se opta por el uso fluorocromos (12) sin procesamientos previos de las muestras como la extracción y amplificación (14). En este caso utilizamos SYBR Gold de la casa comercial Life Technologies como agente intercalante de unión al DNA circulante que suponemos se encuentra en el suero de los pacientes para posterior lectura de emisión de la fluorescencia.

Primero se preparó una solución stock de 10% de BSA (bovine sero albumin, A9647-Sigma Aldrich) en PBS (MP Biomedicals LLC). A continuación, se preparó la solución stock de DNA de salmón liofilizado (D1626-Sigma Aldrich) agregando 25ml de agua libre de nucleasas a una concentración final de 10 μ g/ μ l y se mantuvo a -20°C hasta su utilización. Con la solución stock se preparó una suspensión para representar la recta de calibrado, añadiendo 999 μ l de BSA al 10% en PBS a 1 μ l de la solución stock de DNA de salmón obteniendo una concentración de 10ng/ μ l. A continuación, se realizaron las diluciones en ocho tubos (S0-S7) a las concentraciones representadas en la tabla 2.

	S0	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
DNA (µl)	0	25	50	100	250	500	1000	2,5*
PBS-BSA 10% (µl)	1000	975	950	900	750	500	0	997,5
Concentración DNA en PBS-BSA 10% (ng/ml)	0	250	500	1000	2500	5000	10000	25000

Tabla 2. Diluciones para la curva estándar.

*Se utilizó el DNA de salmón y no de la solución stock.

A continuación se preparó el SYBR Gold (S11494, Life Technologies) añadiendo 999µl de DMSO (Dimethyl Sulfoxide, 154938 Sigma Aldrich) a 1µl del SYBR Gold para llevar a una concentración stock de 10x. Utilizando una placa de 96 pocillos negra (Corning 96 multiwell plates, black, Sigma Aldrich) se analizaron los estándares, controles y muestras por duplicado, igual que para el ensayo ELISA. Se añadieron 10µl de las diluciones de la curva estándar, controles y muestras a cada pocillo y posteriormente se añadieron 40µl de la dilución de trabajo de SYBR Gold (1x) a cada pocillo. La lectura posterior se realizó en el lector multi-modal de microplacas Synergy H1 de Biotek y el software Gen5, a una longitud de onda de excitación de 485nm y longitud de onda de emisión a 535nm.

En la curva estándar se enfrentó la fluorescencia de los estándares en el eje x y la concentración conocida de DNA circulante en el eje y (Gráfico 2). Se obtuvo la ecuación de la recta con la que se calcularon las concentraciones de DNA expresada en ng/ml.

Análisis Estadístico

Tras la obtención de la cantidad de HuR y DNA circulante en controles y pacientes se realizó un análisis estadístico con el software IBM SPSS 20. Se determinaron las diferencias en la expresión de HuR y DNA circulante, mediante el test de Spearman, en relación a otras variables: entre controles y pacientes, entre pacientes hombres y mujeres, entre pacientes con cáncer gástrico y mama, diferencias entre sexos, diferencias entre edades base a un punto de cohorte y las

diferencias entre los pacientes que recibieron algún tipo de intervención quirúrgica de extirpación tumoral.

Se determinó el potencial valor diagnóstico de HuR y DNA circulante mediante curvas COR (Curva de Características Operacionales del Receptor o Curvas de Rendimiento Diagnóstico) a través de la comparación de distintos puntos de corte y de la selección del más óptimo con respecto a su sensibilidad y especificidad. Esto nos permitió determinar con qué eficacia puede usarse HuR o el DNA circulante como prueba diagnóstica.

Por último se determinó el potencial valor pronóstico con el método Kaplan-Meier (Estimador de Kaplan-Meier o producto-límite) que estima la supervivencia cuando la tasa de mortalidad varía en el tiempo de seguimiento y no sigue una distribución concreta. Con lo que conseguimos ver la supervivencia de nuestros pacientes en estudio según los niveles de HuR y DNA circulante.

RESULTADOS

Pacientes y controles: diseño del estudio.

De las 109 muestras totales obtenidas, 52 fueron de pacientes con cáncer gástrico y 57 con cáncer de mama, de los cuales se seleccionaron únicamente los casos que se encontraban en estadio IV según los criterios de estadiaje tumoral TMN consensado a nivel internacional por el Instituto Nacional de Cáncer (National Institute Cancer-NIH), la Unión Internacional para control del cáncer (Union for International Cancer Control-UICC) y el Comité Conjunto Americano en Cáncer (American Joint Committee on Cancer-AJCC) que hace referencia a tumores que se han diseminado a órganos o tejidos distantes. Con dicho criterio la selección de muestras, se incluyeron finalmente para su análisis 11 muestras de cáncer gástrico, 9 de cáncer de mama y 14 controles. La recopilación de datos adicionales clínicos, anatomopatológicos y de laboratorio se agruparon por separado y se determinó la frecuencia de los datos más relevantes que pudieran tener alguna relación con las posibles moléculas en estudio. Para el caso del cáncer gástrico se determinaron 9 casos pertenecientes a sexo masculino y 2 del femenino, una edad media de 67 años, dos tipos histológicos: 4 casos del tipo intestinal y 7 tipo difuso y finalmente 4 casos a los cuales se les realizó algún tipo de resección quirúrgica tumoral (Tabla 3).

Para las muestras de cáncer de mama también se agruparon según criterios de relevancia tumoral en mama. Todos nuestros casos fueron de mujeres (n=9), la edad media 70 años, los tipos histológicos fueron 8 casos de carcinoma ductal, 1 solo caso de carcinoma lobulillar, 8 casos con resección quirúrgica, 7 casos con expresión inmuohistoquímica de receptores hormonales y 6 casos expresión del receptor de membrana Her2/neu (Tabla 4).

	n	%
Sexo		
Mujeres	2	18,2
Hombres	9	81,8
Edad (Media, años)	67	
Tipo Histológico:		
Intestinal	4	36,4
Difuso	7	63,6
Cirugía	4	36,4

Tabla 3. Datos de pacientes con cáncer gástrico

	n	%
Sexo		
Mujeres	9	100
Edad (Media, años)	70	
Tipo Histológico:		
Ductal	8	88,9
Lobulillar	1	11,1
Cirugía	8	88,9
Receptores Hormonales:		
Positivos	7	77,8
Negativos	1	11,1
Her2		
Positivos	2	22,2
Negativos	6	66,7

Tabla 4. Datos de pacientes con Cáncer de Mama

Análisis del contenido HuR

Como se comentó previamente, siguiendo las indicaciones del kit se obtuvo la lectura de la densidad óptica de estándares, controles y pacientes, por duplicado. Con los resultados obtenidos a partir de la concentración de proteínas de los estándares se construyó la recta patrón y la ecuación de la recta con un r^2 de 0,993 (Gráfico 1). Para la obtención de la concentración de proteínas, se extrapolaron las medidas de absorbancia de casos y controles, se obtuvo una media de dichos valores, se les restó igualmente el valor de S0 y se transformaron a base logarítmica 10.

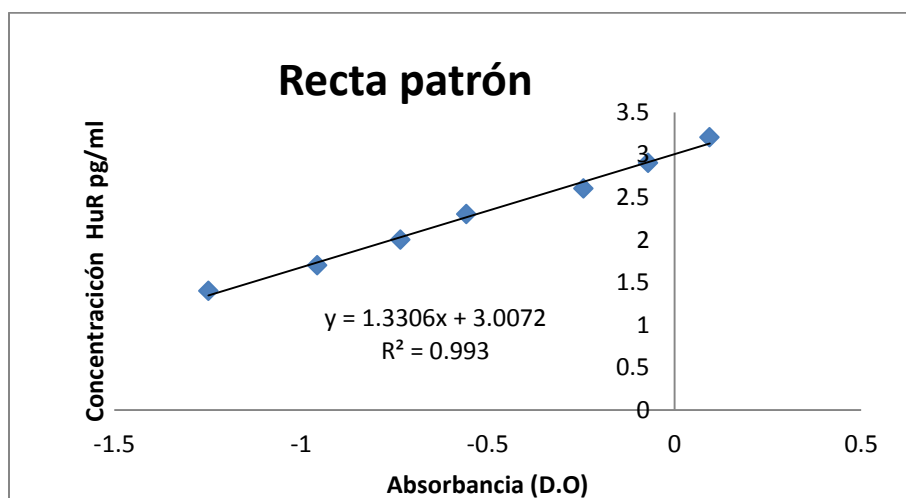


Gráfico 1. Recta patrón de la concentración/absorbancia de HuR.

La concentración de los niveles de la proteína HuR son expresados en pg/ml y solo en tres casos de cáncer gástrico no se detectó la proteína en cuestión (Tabla 5). La nomenclatura que recibe cada caso hace alusión a las iniciales de su nombre y apellidos.

Caso	Concentración HuR (pg/ml)
APV	11.52
DHS	7.30
JGD	2.21
MCCP	0
JPM	9.35
EMP	3.97
LGP	0
MCA	0
JVV	65.61
AFM	18.63
JAEG	34.12
Media	13,89
Error Estándar de la Media	6,02

Tabla 5. Niveles de HuR en casos de cáncer gástrico

Para los casos de cáncer de mama de igual forma solo hubo tres casos en donde no se consiguió determinar niveles de HuR en suero. Para la nomenclatura que recibe cada caso es por el número que se le asigno por expediente clínico a la hora de recabar los datos (Tabla 6).

Caso	Concentración HuR (pg/ml)
06/4	1.38
07/28	17.88
07/2	64.24
06/23	13.33
06/3	0
06/17	11.74
06/32	58.52
07/113	0
07/116	0
Media	18,57
Error	
Estándar de la Media	8,41

Tabla 6. Niveles de HuR en casos de cáncer de mama

Análisis Estadístico de HuR:

Para el análisis estadístico de los resultados en las cantidades obtenidas de HuR utilizamos el test no paramétrico de Mann-Whitney. Inicialmente se demostró que existen diferencias significativas en la presencia en suero de HuR ($p=0,005$, Test Mann-Whitney) entre los controles y las muestras de pacientes. Se determinó que no habían diferencias significativas en la cantidad sérica de HuR ($p=0,0882$ Test Mann-Whitney) entre pacientes de cáncer gástrico y mama.

Con respecto a la diferencia entre sexos se encontró que no existen diferencias en la cantidad sérica de HuR ($p=0,356$) entre pacientes masculinos y femeninos aunque cabe destacar que las muestras de cáncer de mama provenían únicamente de mujeres. Por lo que analizamos por separado los niveles de HuR entre sexos de pacientes con cáncer gástrico no encontrando diferencias entre ambos ($p=0,057$).

En cuanto a la edad se determinó el punto de cohorte de 70 de años de edad tanto para cáncer gástrico y de mama y se determinó que no hay diferencias en los niveles de HuR entre los pacientes que sobrepasan esta edad y los que están por debajo de ella ($p=0,672$ Test Mann-Whitney) ni siquiera en los controles ($p=0,947$ Test Mann-Whitney).

Así mismo buscamos saber si había diferencias según la edad y tipo de tumor sin embargo no se encontraron diferencias en los niveles de HuR en pacientes con cáncer gástrico mayores y menores de 70 años ($p=0,854$ Test Mann-Whitney) ni en las pacientes con cáncer de mama ($p=0,803$ Test Mann-Whitney).

Con respecto a los pacientes con cáncer gástrico que fueron intervenidos quirúrgicamente no se apreciaron diferencias en la presencia de HuR ($p=0,703$ Test de Mann-Whitney) con respecto a los que no lo fueron. Lo mismo sucedió con las pacientes con cáncer de mama ($p=0,431$ Test Mann-Whitney). Todos los resultados se encuentran resumidos en la tabla 7.

HuR y correlación con otros biomarcadores.

Se correlacionaron los niveles de HuR con otros datos recabados del expediente clínico: edad, porcentaje de pérdida de peso, Albúmina sérica, proteínas séricas, Fosfatasa Alcalina, Lactato Deshidrogenasa (LDH), Ki67 y Ca 15.3.

Se encontró que únicamente HuR se correlaciona positivamente con la concentración en suero de Ki67 ($p=0,029$ Test de Spearman) en pacientes con cáncer de mama.

Potencial valor diagnóstico/pronóstico de HuR

Para determinar a partir de qué nivel de HuR son considerados como positivos o negativos se estimó un punto de corte en base a la sensibilidad y especificidad y con la utilización del índice de Youden (Sensibilidad + Especificidad – 1). Para el caso de los niveles séricos de HuR el mejor punto de corte encontrado es el que tiene una sensibilidad del 80% y una especificidad del 78,6%. Dicho punto de corte corresponde a la cifra 23,94 pg/ml. Niveles por debajo de esa cifra se consideran positivos y por arriba se consideran negativos. A partir de estos datos se construyó la curva COR que sirvió para comprobar la validez de HuR como herramienta diagnóstica (Gráfico 2).

Parámetros Evaluados	Media	p valor	Diferencia Significativa
Muestras:			
Controles	36,66	0,005	Sí
Pacientes	16,00		
Tumores:			
Gástrico	13,89	0,0882	No
Mama	18,57		
Sexo:			
Hombres	16,98	0,356	No
Mujeres	15,20		
Cáncer Gástrico:			
Hombres	16,98	0,057	No
Mujeres	0,00		
Cáncer de Mama:			
Mujeres	18,57	-----	No
Edad:			
<70 años	14,10	0,672	No
>70 años	18,30		
Gástrico:			
<70 años	11,93	0,854	No
>70 años	16,23		
Mama:			
<70 años	16,70	0,803	No
>70 años	20,90		
Cirugía:			
Cáncer Gástrico	9,46	0,703	No
Cirugía:			
Cáncer de Mama	8,66	0,431	No

Tabla 7. Resultado de Análisis Estadístico de HuR

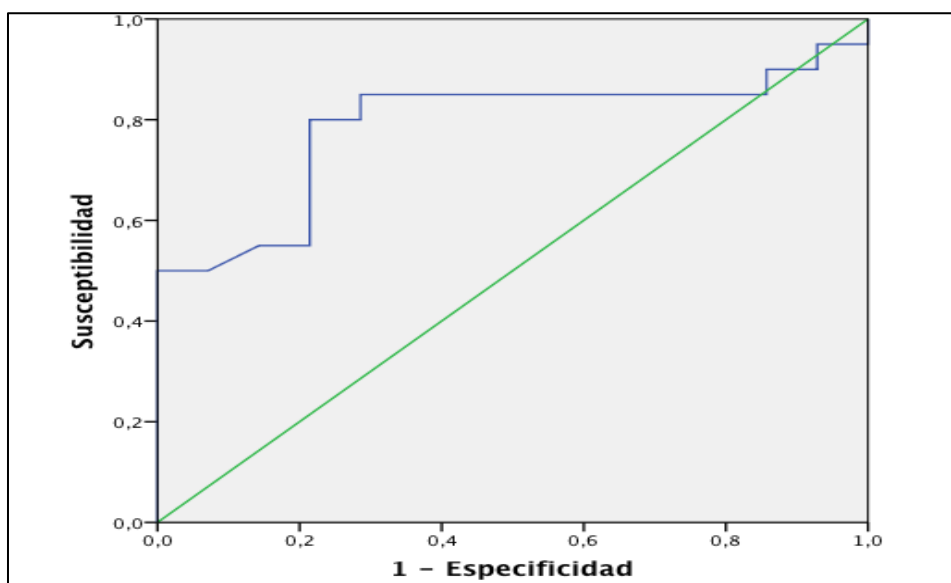


Gráfico 2. Curva COR para HuR

Para conocer su potencial diagnóstico de HuR se determinó el área bajo la curva el cual tuvo un valor de 0,7888 lo que representa que los niveles séricos de HuR son capaces en un 78% de separar con cierto grado de exactitud a pacientes de controles (Tabla 8).

Área bajo la Curva	Error Estándar	Significancia	Intervalo de Confianza 95%	
0,7888	0,81	p = 0,005	Menor 0,628	Mayor 0,947

Tabla 8. Estimación del área bajo la curva COR para HuR.

Para determinar el posible potencial pronóstico de HuR se utilizó el método no paramétrico de Kaplan-Meier con el cual nos fue posible estimar la supervivencia de los pacientes estudiados en relación a los niveles de la proteína en estudio. Primero se estimó la supervivencia libre de progresión en semanas (Progression Free Survival - PFS) (Gráfico 3) y después la supervivencia total en semanas (Gráfico 4). A través del Log Rank Test se determinaron las posibles diferencias entre las supervivencias de los pacientes pertenecientes a cada uno de los grupos, estableciendo también un p valor para ambas estimaciones de supervivencia.

En base a nuestro punto de cohorte (p=0.986 Log Rank Test) los pacientes por arriba o abajo no tienen diferencias en la supervivencia libre de progresión (Gráfico 3). Lo mismo sucede para la

supervivencia total donde no existen diferencias entre los individuos con niveles de HuR por debajo del punto de corte ($p=0,950$ Log Rank Test) (Gráfico 4).

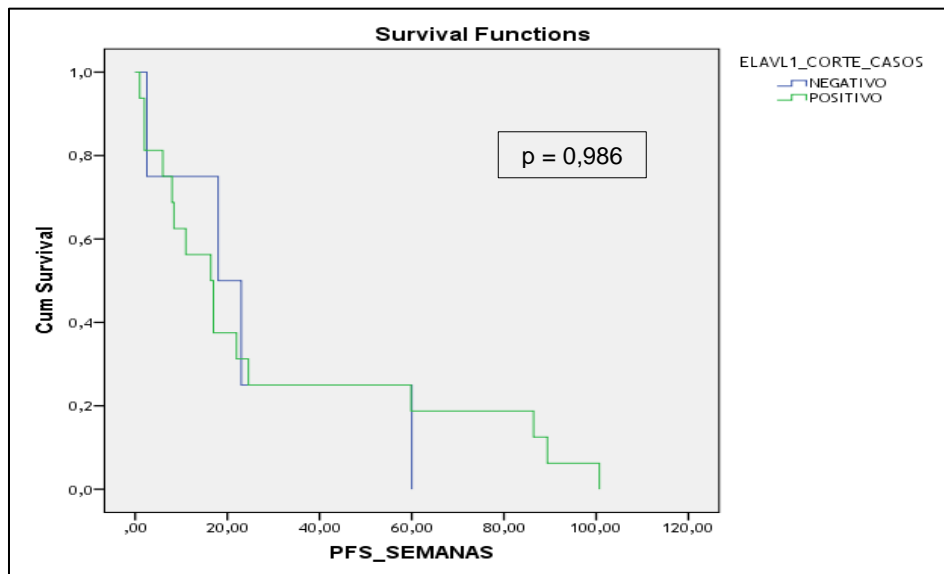


Gráfico 3. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia libre de progresión en relación en semanas en relación con HuR; p: p valor; Cum Survival: supervivencia acumulada.

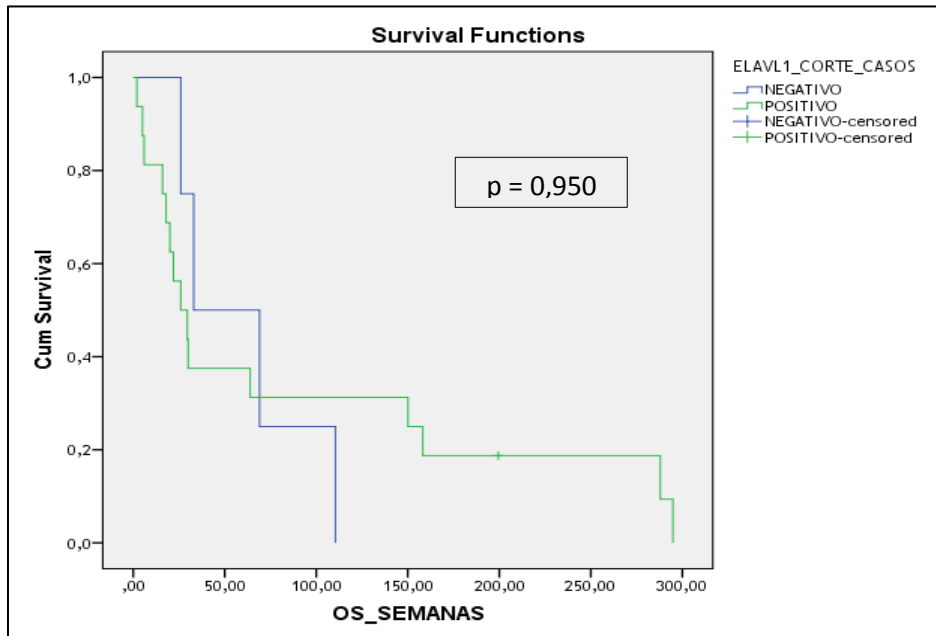


Gráfico 4. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Total en relación con HuR. Datos censurados correspondientes a no presentar muerte al momento estimado.

Análisis del contenido de DNAC

De igual forma se construyó la recta patrón para el análisis de la cantidad de DNA circulante en base a los estándares utilizados con un r^2 de 0.9624 (Gráfico 5).

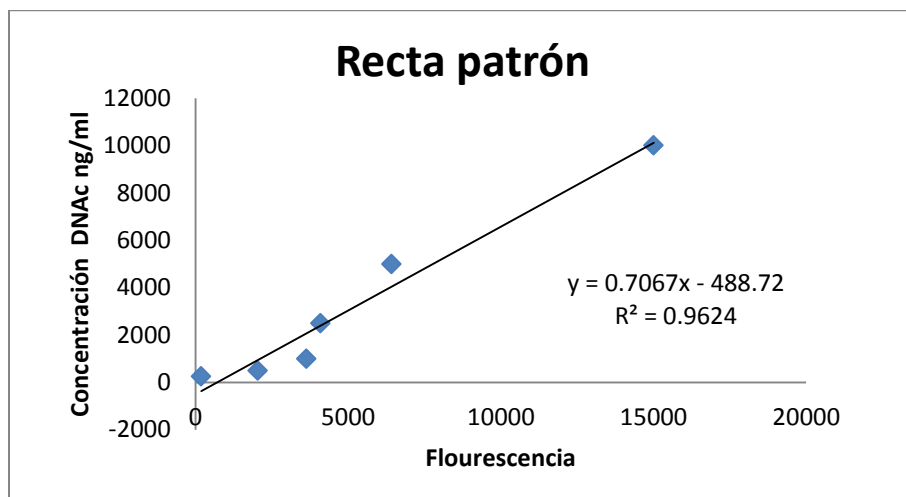


Gráfico 5. Recta patrón del DNA circulante.

Tras la extrapolación de datos determinamos la concentración de DNA circulante en los casos con cáncer gástrico (Tabla 9) y de mama (Tabla 10).

Caso	Concentración DNAc (ng/ml)
APV	4039.81
DHS	13109.6
JGD	18603.13
MCCP	1849.75
JPM	1836.32
EMP	3123.93
LGP	1715.12
MCAH	1228.20
JVV	4769.83
AFM	1693.57
JAEG	2364.93
Media	4939,47
Error Estándar de la Media	1700,51

Tabla 9. Concentración DNAc en cáncer gástrico

Caso	Concentración DNAc (ng/ml)
06/4	3584.69
07/28	7386.39
07/2	1875.89
06/23	1653.64
06/3	1553.64
06/17	1389.33
06/32	1460.71
07/113	3087.53
07/116	1114.42
Media	2567,36
Error	
Estándar de la Media	662,41

Tabla 10. Concentración de DNAc en cáncer de mama

Análisis estadístico del DNA circulante

Se encontró que existen diferencias significativas del DNA circulante ($p=0,001$ Test Mann-Whitney) ente pacientes y controles, sin embargo no hay diferencias significativas entre pacientes con cáncer gástrico y de mama ($p=0,160$ Test Mann-Whitney).

Se encontraron diferencias en la presencia de DNA circulante ($p=0,037$ Test Mann-Whitney) entre ambos sexos en suero de pacientes, siendo mayores en hombres.

En cuanto a la edad no se encontraron diferencias ($p=0,641$) entre controles mayores y menores de 70 años de edad ($p=0,425$). Aun siendo analizados por separado no existen diferencias con respecto a la edad en pacientes con cáncer gástrico ($p=0,273$ Test Mann-Whitney). Sin embargo, en pacientes con cáncer de mama si se aprecian diferencias significativas en los niveles de DNA circulante ($p=0,027$), siendo mayores las cifras en pacientes mayores de 70 años.

Entre los pacientes que fueron operados y no operados no se encontraron diferencias en la presencia de DNA circulante en suero ($p=0,280$ Test Mann-Whitney). Siendo analizados por separado, ni los pacientes con cáncer gástrico ($p=0,571$ Test Mann-Whitney) ni las de mama ($p=0,121$) mostraron diferencias significativas. Todos los resultados se encuentran resumidos en la tabla 11.

Parámetros Evaluados	Media	p valor	Diferencia Significativa
Muestras:			
Controles	1338,93	0,001	Sí
Pacientes	3872,02		
Tumores:			
Gástrico	4939,48	0,160	No
Mama	2567,36		
Sexo:			
Hombres	5695,14	0,037	Sí
Mujeres	2380,39		
Cáncer Gástrico:			
Hombres	5695,14	0,157	No
Mujeres	1538,98		
Cáncer de Mama:			
Mujeres	2567,36	----	No
Edad:			
<70 años	3785,40	0,425	No
>70 años	3977,90		
Cáncer Gástrico:			
<70 años	4025,21	0,273	No
>70 años	6036,60		
Cáncer de Mama:			
<70 años	3497,64	0,027	Sí
>70 años	1404,53		
Cirugía:			
Cáncer Gástrico	3916,85	0,571	No
Cirugía:			
Cáncer de Mama	1965,00	0,121	No

Tabla 11. Resultado de Análisis Estadístico del DNA circulante

DNA circulante y correlación con otros biomarcadores

Se correlacionaron también los niveles de DNA circulante con otros datos recabados del expediente clínico como edad, porcentaje de pérdida de peso, Albúmina sérica, proteínas séricas, Fosfatasa Alcalina, Lactato Deshidrogenasa (LDH), Ki67 y Ca 15.3.

Tomando los mismos datos del expediente clínico se encontró que el DNAC se correlaciona positivamente con la concentración en suero de MIC1 ($p=0029$ Test de Spearman) en pacientes con cáncer gástrico.

Potencial valor diagnóstico/pronóstico del DNA circulante

Para determinar el valor diagnóstico se utilizó al igual que para el caso de HuR las curvas COR y área bajo la curva (Gráfico 6).

En cuanto al DNA circulante se determinó que el punto de corte óptimo donde se consigue la máxima sensibilidad y especificidad (90% y 71,4%, respectivamente) separando pacientes de controles que corresponde a cifras de 1363,18 ng/ml. Los niveles de DNA circulante por encima del punto de corte se consideran positivos; por debajo se consideran negativos o sanos.

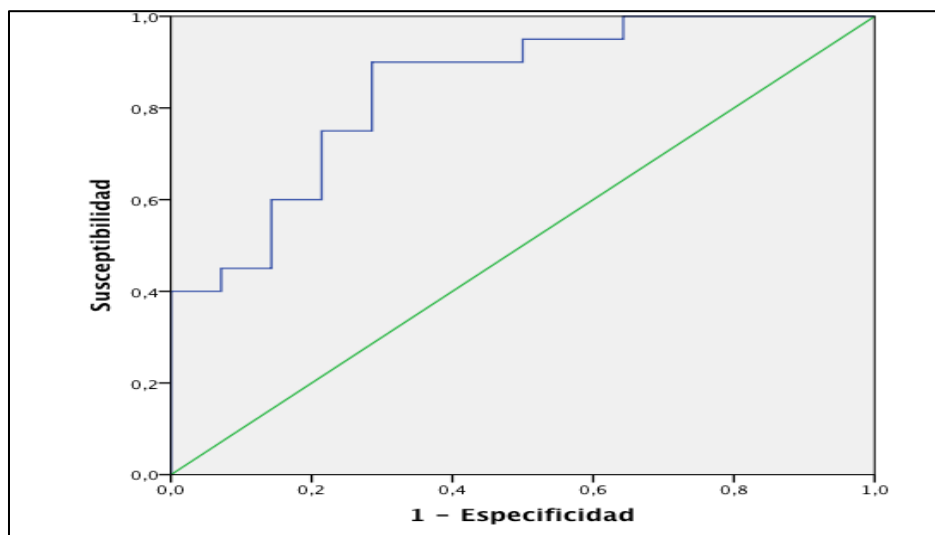


Gráfico 6. Curva COR para DNA circulante

De igual forma que para HuR se determinó el área bajo la curva que fue del 0,843 o lo que es lo mismo que hay un 84 % de eficacia para diferenciar pacientes de controles en base a los niveles de DNA circulante (Tabla 12).

Área bajo la curva	Error Estándar	Significancia	Intervalo de Confianza 95%	
0,843	0,068	0,001	0,709	0,977

Tabla 12. Estimación del Área bajo la curva COR para DNAc

Al estimar el punto de cohorte, entre individuos con niveles de DNA circulante considerados como positivos, para análisis de supervivencia libre de progresión ($p=0,177$ Log Rank Test) (Gráfico 7) y para supervivencia total ($p=0,343$ Log Rank Test) (Gráfico 8) se determinó que no existen diferencias con los individuos considerados negativos.

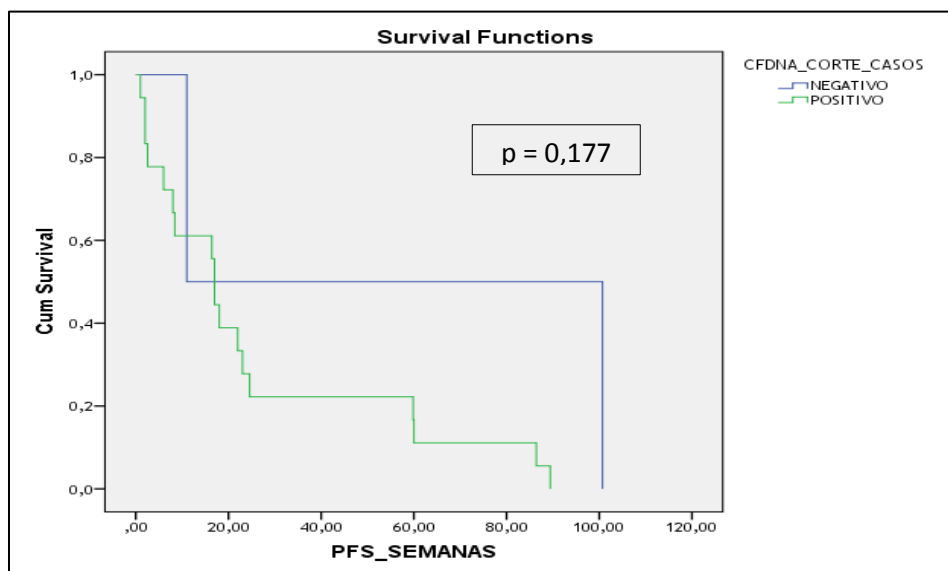


Gráfico 7. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Libre de Progresión en semanas en relación con el DNA circulante.

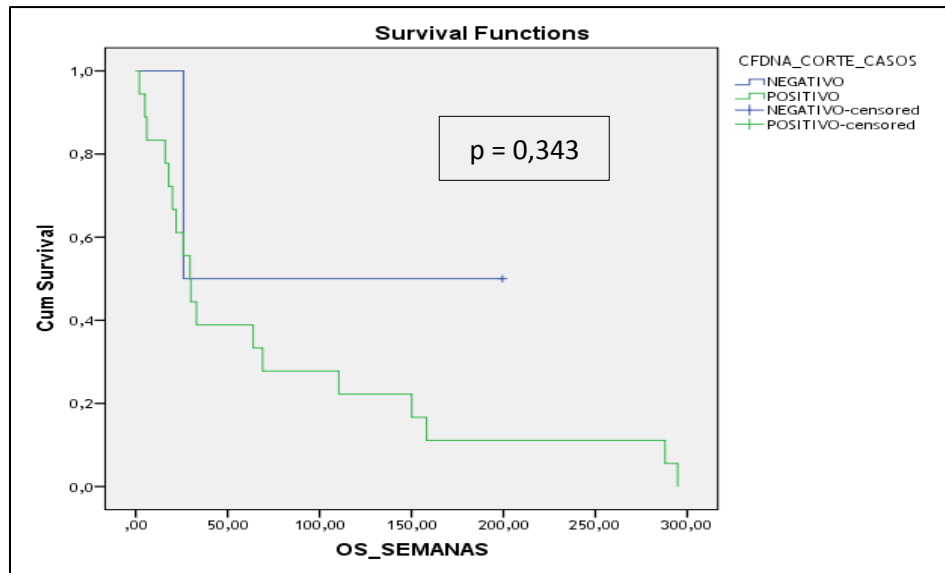


Gráfico 8. Curva Kaplan-Meier de Supervivencia Total en relación con el DNA circulante.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Discusión

Este trabajo surge de la necesidad de encontrar nuevos biomarcadores para el cáncer que puedan ser utilizados e interpretados de forma simple en la clínica por lo que seleccionamos pacientes con cáncer gástrico y de mama con el peor estadio clínico de la enfermedad a quienes se les extrajeron muestras de sangre y apartamos el suero para la detección de la proteína HuR y de DNA circulante mediante ensayo ELISA y fluorometría respectivamente. La selección de estos métodos de detección fue precisamente por la simplicidad de su metodología y aunque para el ensayo ELISA ya está estandarizada la metodología de detección en sin fin de enfermedades infecciosas y otros marcadores no encontramos en la literatura trabajos sobre la detección de HuR. Por otro lado la detección del DNA circulante se ha hecho ya desde hace tiempo más con fines de investigación sin aplicación de forma rutinaria y por métodos costosos y de poco alcance para la aplicación clínica, razón por la cual decidimos utilizar la fluorometría para lo que utilizamos el agente intercalante SYBR Gold que es capaz de unirse a las cadenas DNA circulante que se encuentra en el suero de los pacientes. Posterior a agregar SYBR Gold se realizó la lectura de la fluorescencia emitida mediante fluorímetro (Synergy HI-Biotek).

Anteriormente se creía que las muestras biológicas eran incapaces de analizarse mediante ensayo de fluorescencia directa por la posible interferencia de moléculas orgánicas inespecíficas que se encuentran en las muestras biológicas. Sin embargo existen estudios que demuestran que es un fondo que no afecta de forma importante a la cantidad de DNA de la lectura final. Otra gran ventaja de la fluorometría es que no existe la necesidad de purificación y amplificación del DNA por lo que se acorta en tiempo y costes.

En nuestro estudio logramos encontrar niveles detectables de la proteína HuR en el suero de los pacientes de cáncer gástrico y de mama, observándose que los niveles varían de los controles. Sin embargo para nuestra sorpresa los niveles de HuR en pacientes eran menores que los de los controles. Estos hallazgos son similares a los encontrados por Zhu Yuan y colaboradores (10) y de Heinonen y colaboradores (20), donde comprueban que no hay cifras más elevadas en los grados más avanzados de cáncer de mama en estadio TMN4, sugiriendo que esto puede deberse a la creación de auto anticuerpos contra HuR en distintos tipos de tumores (21); además sugieren que puede deberse a que los niveles de HuR dependen también de una estirpe tumoral más agresiva y negatividad de receptores hormonales (10) (4) para el caso de tumores de mama (20).

Sin embargo, estos criterios que no fueron tomados en cuenta en este trabajo. Finalmente, como comentamos previamente, los niveles de HuR también se encuentran alterados en lesiones malignas incipientes donde posiblemente juega un papel más relevante en iniciación en la carcinogénesis que en su mantenimiento (22). Posiblemente podría ser importante hacer un estudio de las mismas características pero comparando individuos controles, individuos con lesiones pre malignas y con distintos estadios de la enfermedad para conocer mejor el comportamiento de HuR y comprobar su valor como herramienta diagnóstica y/o pronóstica.

En cuanto al DNA circulante, reconocemos la técnica de fluorometría tan efectiva como otras técnicas de medición (23)(14), además encontramos en este trabajo adecuados niveles que pueden servir como herramienta diagnóstica pero que carece de valor pronóstico. Estos resultados son similares a los encontrados por Ashutosh y colaboradores (24) que comprueban el valor diagnóstico de los niveles de DNA circulante en pacientes de cáncer de pulmón. Los autores Catarino y colaboradores (25) también sugieren que carece de valor pronóstico de supervivencia en estudios de DNA circulante medidos mediante PCR en tiempo real. En nuestro caso, al igual que para HuR, sugeriríamos que un estudio con mayor número de pacientes daría una muestra más clara de su verdadero potencial pronóstico en función de la supervivencia. Está claro que su uso rutinario en clínica puede tener beneficios porque aunque en nuestro trabajo apenas conseguimos una correlación positiva con otro biomarcador, Dawson y colaboradores (26) encontraron una correlación positiva con Ca15.3 en distintas muestras de pacientes con cáncer de mama.

Conclusiones

- Se obtuvieron las muestras de pacientes con cáncer gástrico y mama que cumplieron con los criterios de inclusión del estudio: Estadio clínico IV según el estadiaje internacional TMN.
- Se determinaron los niveles de HuR y consiguiendo un punto de cohorte para diferenciar pacientes y controles ($p=0,005$, Test Mann-Whitney).
- Se determinaron los niveles del DNA circulante y se consiguió un punto de cohorte para diferenciar pacientes y controles ($p=0,001$ Test Mann-Whitney)
- Se encontró que HuR se correlaciona positivamente con el marcador tumoral de cáncer de mama (Ki67) ($p=0,029$ Test de Spearman)
- Se determinó que no existe diferencia significativa de HuR entre individuos de distinto sexo, edad, tipo de tumor o si recibió alguna cirugía de resección neoplásica.
- Determinamos que los niveles de HuR tienen una exactitud del 78% de capacidad diagnóstica ($p=0.005$).
- Se determinó un pobre valor pronóstico para HuR en la Supervivencia Libre de Progresión ($p= 0,986$ Log Rank Test) y en la supervivencia total ($p=0,950$ Log Rank Test).
- Se encontraron diferencias significativas en los niveles de DNA circulante entre hombres y mujeres, siendo mayores las cifras en hombres ($p= 0,037$ Test Mann-Whitney).
- Se determinó que existen cifras mayores en pacientes por debajo de 70 años en tumores de mamá ($p=0,027$ Test Mann-Whitney)
- Se encontró que tenía una correlación positiva con MIC1 y no con el resto de marcadores ($p=0029$ Test de Spearman).
- No se encontró diferencias en la supervivencia libre de progresión ($p=0,177$ Log Rank Test) ni en la supervivencia total ($p=0,343$ Log Rank Test) con los niveles de DNA circulante entre los sueros positivos y negativos.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la tutora académica la Dra. María Esperanza Cerdán Villanueva, directora del Máster en Biología Molecular, Celular y Genética en la Universidad de A Coruña y a la directora del Trabajo de Fin de Máster, la Dra. Angélica Figueroa Conde-Valvis, Investigadora del grupo Traslacional de Cáncer por abrirme las puertas del centro de investigación del Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC) y proporcionar las facilidades para el desarrollo de este trabajo; al Dr. Manuel Valladares Ayerbes y al Dr. Moisés Blanco Calvo por el apoyo técnico e informático en las técnicas desarrolladas; al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACYT) por el soporte económico durante mis estudios; a mis padres José Roberto González Negrete y Noemí Castañeda Córdova por su apoyo único e incondicional durante mi estancia académica y a mi prometida Ilse García Sánchez por llenar de amor y cariño mi vida.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO | Cancer. World Health Organization; Available from: <http://www.who.int/cancer/en/>
2. Heinonen M, Hemmes A, Salmenkivi K, Abdelmohsen K, Vilén S-T, Laakso M, et al. Role of RNA binding protein HuR in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol.* 2011;224(4):529–39.
3. Kim HH, Abdelmohsen K, Gorospe M. Regulation of HuR by DNA Damage Response Kinases. *J Nucleic Acids.* 2010;2010.
4. Wang J, Guo Y, Chu H, Guan Y, Bi J, Wang B. Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(5):10015–41.
5. Srikantan S, Tominaga K, Gorospe M. Functional Interplay between RNA-Binding Protein HuR and microRNAs. *Curr Protein Pept Sci.* 2012;13(4):372–9.
6. Prislei S, Martinelli E, Mariani M, Raspaglio G, Sieber S, Ferrandina G, et al. MiR-200c and HuR in ovarian cancer. *BMC Cancer.* BMC Cancer; 2013;13(1):72.
7. Kurosu T, Ohga N, Hida Y, Maishi N, Akiyama K, Kakuguchi W, et al. HuR keeps an angiogenic switch on by stabilising mRNA of VEGF and COX-2 in tumour endothelium. *Br J Cancer.* Nature Publishing Group; 2011;104(5):819–29.
8. López De Silanes I, Gorospe M, Taniguchi H, Abdelmohsen K, Srikantan S, Alaminos M, et al. The RNA-binding protein HuR regulates DNA methylation through stabilization of DNMT3b mRNA. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(8):2658–71.
9. Filippova N. The RNA-Binding Protein HUR promotes Glioma Growth and Treatment Resistance. *Changes.* 2012;29(6):997–1003.
10. Yuan Z, Sanders AJ, Ye L, Wang Y, Jiang WG. Prognostic value of the human antigen R (HuR) in human breast cancer: High level predicts a favourable prognosis. *Anticancer Res.* 2011;31(1):303–10.
11. Jung K, Fleischhacker M, Rabien A. Cell-free DNA in the blood as a solid tumor biomarker-A critical appraisal of the literature. *Clin Chim Acta.* Elsevier B.V.; 2010;411(21-22):1611–24.

12. Czeiger D, Shaked G, Eini H, Vered I, Belochitski O, Avriel A, et al. Measurement of circulating cell-free DNA levels by a new simple fluorescent test in patients with primary colorectal cancer. *Am J Clin Pathol.* 2011;135(2):264–70.
13. Gallegos JR, Leyva CP. Circulating tumor cells in breast cancer : a potential biological hazard. 2014;(M):45–51.
14. Elshimali YI, Khaddour H, Sarkissyan M, Wu Y, Vadgama J V. The clinical Utilization of circulating cell free DNA (CCFDNA) in blood of cancer patients. *Int J Mol Sci.* 2013;14(9):18925–58.
15. Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch R. DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients : Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necr. *Cancer Res.* 2001;61:1659–65.
16. Bettgowda C, Bettgowda C, Sausen M, Leary RJ, Kinde I. Detection of Circulating Tumor DNA in Early- and Late-Stage Human Malignancies. 2014;24.
17. Spindler KLG, Pallisgaard N, Andersen RF, Brandslund I, Jakobsen A. Circulating Free DNA as Biomarker and Source for Mutation Detection in Metastatic Colorectal Cancer. *PLoS One.* 2015;10(4):e0108247.
18. Heitzer E, Auer M, Ulz P, Geigl JB, Speicher MR. Circulating tumor cells and DNA as liquid biopsies. *Genome Med* 2013,. 2013;5(73):1–11.
19. Goldshtein H, Hausmann MJ, Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem.* 2009 Nov;46(Pt 6):488–94.
20. Heinonen M, Fagerholm R, Aaltonen K, Kilpivaara O, Aittomäki K, Blomqvist C, et al. Prognostic role of HuR in hereditary breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2007;13(23):6959–63.
21. D'Alessandro V, Muscarella LA, Copetti M, Zelante L, Carella M, Vendemiale G. Molecular detection of neuron-specific ELAV-like-positive cells in the peripheral blood of patients with small-cell lung cancer. *Cell Oncol.* 2008;30(4):291–7.
22. Heinonen M, Hemmes A, Salmenkivi K, Abdelmohsen K, Vil S. Role of RNA binding protein HuR in ductal carcinoma in situ of the breast. 2011;(April):529–39.
23. Goldshtein H, Hausmann MJ, Douvdevani A. A rapid direct fluorescent assay for cell-free DNA quantification in biological fluids. *Ann Clin Biochem.* 2009;46(Pt 6):488–94.

24. Pathak AK, Bhutani M, Kumar S, Mohan A, Guleria R. Circulating cell-free DNA in plasma/serum of lung cancer patients as a potential screening and prognostic tool. *Clin Chem*. 2006;52(10):1833–42.
25. Catarino R, Coelho A, Araújo A, Gomes M, Nogueira A, Lopes C, et al. Circulating DNA: Diagnostic tool and predictive marker for overall survival of NSCLC patients. *PLoS One*. 2012;7(6):1–8.
26. Dawson S-J, Tsui DWY, Murtaza M, Biggs H, Rueda OM, Chin S-F, et al. Analysis of Circulating Tumor DNA to Monitor Metastatic Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2013;368(13):1199–209.