

**SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS
CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO
RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE
PULMÓN ASOCIADO A TABACO**

Investigador principal:

José Luis Pérez Gracia
Departamento de Oncología
Clínica Universidad de Navarra
Avda. Pío XII 36
31008, Pamplona
Telf.: 948 255 400 / 658 92 02 12
Correo electrónico: jlgracia@unav.es

Duración del proyecto: 1 año

3 de mayo de 2018

ÍNDICE

<u>1</u>	<u>RESUMEN.</u>	3
<u>2</u>	<u>ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.</u>	3
2.1	<u>SELECCIÓN DE FENOTIPOS EXTREMOS.</u>	3
2.2	<u>SECUENCIACIÓN DEL EXOMA.</u>	4
<u>3</u>	<u>BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE COMENTADA.</u>	5
<u>4</u>	<u>HIPÓTESIS.</u>	6
<u>5</u>	<u>OBJETIVOS.</u>	6
5.1.1	<u>Objetivo principal:</u>	6
5.1.2	<u>Objetivos secundarios:</u>	7
<u>6</u>	<u>METODOLOGÍA.</u>	7
6.1	<u>DISEÑO.</u>	7
6.1.3	<u>Extracción de DNA y secuenciación del exoma.</u>	7
6.1.4	<u>Consideraciones éticas.</u>	8
6.2	<u>VARIABLES.</u>	9
6.3	<u>LIMITACIONES DEL ESTUDIO Y PLAN DE CONTINGENCIA.</u>	9
<u>7</u>	<u>PLAN DE TRABAJO.</u>	9
7.1	<u>ETAPAS DE DESARROLLO.</u>	9
7.2	<u>DISTRIBUCIÓN DE TAREAS DEL EQUIPO INVESTIGADOR.</u>	9
<u>8</u>	<u>PLAN DE DIFUSIÓN.</u>	10
8.1	<u>IMPACTO CLÍNICO.</u>	10
8.2	<u>RESULTADOS BIBLIOMÉTRICOS.</u>	10
<u>9</u>	<u>MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.</u>	11
9.1	<u>MEDIOS DISPONIBLES</u>	11
9.2	<u>MEDIOS NO DISPONIBLES.</u>	11
<u>10</u>	<u>JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LA AYUDA SOLICITADA.</u>	11
<u>11</u>	<u>PRESUPUESTO SOLICITADO.</u>	11

1 RESUMEN.

Antecedentes: el riesgo de desarrollar cáncer no microcítico de pulmón (CNMP) no es uniforme en distintos individuos. Nuestro grupo ha identificado por primera vez, mediante GWAS polimorfismos de nucleótido único (SNPs) asociados a individuos con fenotipos extremos de muy alto y muy bajo riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco (Fusco, et al. Cancer Medicine 2018, en prensa). En este proyecto utilizaremos la misma estrategia, empleando secuenciación del exoma.

Objetivo: identificar mediante secuenciación del exoma genotipos asociados a individuos con fenotipos extremos de muy alto y muy bajo riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco.

Métodos: secuenciaremos el exoma de 50 individuos con fenotipo de muy alto riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco (casos extremos: pacientes <50 años con CNMP, fumadores >20 paquetes/año) y de otros 50 con muy bajo riesgo (controles extremos: fumadores >20 paquetes/año y >75 años, sin CNMP, ni otros tumores.). Los genotipos identificados se validarán en series independientes y con registros existentes de secuenciación en individuos con riesgo alto, bajo y convencional de riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco.

Relevancia del proyecto: la identificación de perfiles genéticos asociados a fenotipos de muy alto y muy bajo riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco puede revelar mecanismos de resistencia y sensibilidad a este tumor que generen nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. Además, este proyecto consolida una nueva metodología de investigación traslacional que puede aplicarse a otros tumores.

2 ANTECEDENTES Y ESTADO ACTUAL DEL TEMA.

2.1 Selección de fenotipos extremos.

El estudio de factores genéticos relacionados con la incidencia de cáncer puede permitir el diagnóstico precoz de esta enfermedad. Una de las estrategias más exitosas para identificar marcadores genéticos de cáncer ha sido identificar y estudiar individuos o familias con fenotipos muy característicos, consistentes en un riesgo muy elevado de desarrollar tumores. Algunos ejemplos bien conocidos son el hallazgo de mutaciones germinales de p53 en el síndrome de Li-Fraumeni (1), descrito al identificar un exceso de muertes por rhabdomyosarcoma en hermanos; (2,3) el descubrimiento de inactivación de ambas copias del gen supresor tumoral del retinoblastoma en pacientes con retinoblastoma hereditario (4,5), que fue sagazmente anticipado por Knudson; (6) o la detección de mutaciones en BRCA-1 en familias con alta incidencia de cáncer de mama a edades tempranas. (7) El factor común de estos hallazgos es que todos se realizaron en un número pequeño de individuos que presentaban fenotipos muy característicos: un riesgo muy elevado de desarrollar tumores a edades tempranas. La identificación de estos fenotipos fue el factor primordial que permitió realizar estos descubrimientos y lo que les confirió su gran validez biológica.

SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO A TABACO. Versión 1, 3 de mayo de 2018.

En todos estos estudios los fenotipos valorados eran perjudiciales (aumento del riesgo de desarrollar tumores). Esto es lógico, dado que los fenotipos perjudiciales son más sencillos de identificar, por las anomalías asociadas. Sin embargo, algunos estudios han valorado fenotipos beneficiosos, como la ausencia de una enfermedad en individuos con importantes factores de riesgo. Un ejemplo llamativo es la identificación de individuos que no desarrollaban infección por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) pese a estar muy expuestos al mismo. (8) Su estudio permitió identificar alteraciones en el gen del correceptor CCR-5 que producen protección completa frente a la infección por algunas cepas del VIH (9, 10, 11) Como estas alteraciones no tienen otras consecuencias fenotípicas, observar que estos individuos estaban protegidos frente al VIH fue determinante para identificar la causa de dicha protección.

En vista del alto rendimiento de esta estrategia, parece lógico desarrollarla para estudiar otras enfermedades. En el caso del cáncer, existen importantes diferencias fenotípicas entre distintos individuos, tanto en el riesgo de desarrollar cáncer como en su curso clínico. Mientras algunos pacientes fallecen de forma precoz, otros sobreviven mucho más tiempo del esperable. Existen comunicaciones sobre pacientes con supervivencias muy prolongadas al cáncer gástrico, (12, 13, 14) cáncer de colon, (15) cáncer de páncreas (16) o mieloma (17) en estadios en principio considerados incurables. Respecto a la posibilidad de que existan individuos con riesgo disminuido de cáncer, aunque no se han realizado estudios clínicos de envergadura para identificar estos casos, existen estudios preclínicos que indican que algunas alteraciones genotípicas se asocian a mayor resistencia a desarrollar tumores, como es el caso de los ratones con sobreexpresión de p53.(18) Aunque estos animales fueron creados artificialmente, su existencia sugiere que es biológicamente posible que existan individuos en la naturaleza con un perfil genético que les confiera mayor resistencia a desarrollar tumores.

La selección adecuada de individuos con fenotipos extremos de buen pronóstico (19, 20, 21) puede ser muy eficaz para establecer las causas que explican la existencia de fenotipos de muy alto interés clínico y puede generar dianas para el tratamiento de las enfermedades en estudio. Al tratarse de fenotipos muy característicos, la posibilidad de que se deban al azar es baja. Además, la realización de los estudios directamente en seres humanos, implica una mayor relevancia clínica de los hallazgos. Por último, la realización de estudios en un número pequeño de individuos con fenotipos característicos, simplifica el proceso y disminuye el coste.

2.2 Secuenciación del exoma.

La tecnología de secuenciación analiza las secuencias genéticas de las regiones codificantes del genoma humano, donde se estima que ocurren el 85% de las alteraciones responsables de las enfermedades de origen genético. Por ello, esta técnica se considera el método más eficiente para estudiar el ADN e identificar las causas genéticas de las diferentes enfermedades o fenotipos.

Esta tecnología ya ha demostrado su utilidad para identificar genotipos asociados a alto y bajo riesgo de desarrollar enfermedades. La secuenciación del genoma de pacientes con fibrosis quística con infección precoz y tardía por *Pseudomonas aeruginosa* ha permitido identificar variantes genéticas asociadas con estos fenotipos. (23) Hay que destacar que la estrategia utilizada consistió tanto en comparar ambos grupos extremos como en compararlos con una población "normal", no formada por individuos con fenotipos extremos. (24) Por ello, en nuestro proyecto compararemos los genotipos identificados entre los individuos con fenotipos extremos entre sí, y con una población normal, sin un riesgo aparentemente elevado o disminuido de desarrollar CNMP inducido por tabaco.

3 BIBLIOGRAFÍA MÁS RELEVANTE COMENTADA.

1. Malkin D, et al. Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 1990; 250: 1233-1238.
2. Miller RW. Deaths from childhood cancer in sibs. *N Engl J Med* 1968; 279: 122-126.
3. Li FP, Fraumeni JF Jr. Rhabdomyosarcoma in children: epidemiologic study and identification of a familial cancer syndrome. *J Natl Cancer Inst* 1969; 43: 1365-1373.
4. Benedict WF, et al. Patient with 13 chromosome deletion: evidence that the retinoblastoma gene is a recessive cancer gene. *Science* 1983; 219: 973-975.
5. Cavenee WK, et al. Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma. *Nature* 1983; 305: 779-784.
6. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
7. Hall JM, et al. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science* 1990; 250: 1684-1689.

En estos estudios se identificaron factores genéticos que aumentan el riesgo de cáncer empleando la estrategia de selección de fenotipos extremos. Todos estos estudios han descubierto hallazgos fundamentales para la Oncología: mutaciones de p53, mutaciones de BRCA-1 o del gen supresor del retinoblastoma.

8. Rowland-Jones S, et al. HIV-specific cytotoxic T-cells in HIV-exposed but uninfected Gambian women. *Nat Med* 1995; 1: 59-64.
9. Liu, R, et al. Homozygous defect in HIV-1 coreceptor accounts for resistance of some multiply-exposed individuals to HIV-1 infection. *Cell* 1996; 86: 367-377.
10. Samson M, et al. Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR-5 chemokine receptor gene. *Nature* 1996; 382: 722-725.
11. Quillent C, et al. HIV-1-resistance phenotype conferred by combination of two separate inherited mutations of CCR5 gene. *Lancet* 1998; 351: 14-18.

Estos trabajos identificaron diferentes alteraciones genéticas protectoras frente al desarrollo de una enfermedad, en concreto el VIH. La metodología empleada consistió en una selección de fenotipos extremos, estudiando individuos que no desarrollaban VIH a pesar de estar fuertemente expuestos al mismo.

12. Miyaji M, et al. A case of advanced gastric cancer with liver metastasis with no recurrence and long survival] *Gan To Kagaku Ryoho* 1996; 23: 915-918.
13. Mura T, et al. A resected case of advanced gastric cancer with complete remission of liver metastasis by chronic daily administration of oral etoposide and UFT. *Gan To Kagaku Ryoho* 1992;19:1071-1074.
14. Sasaki Y, et al. Complete response in a case of unresectable gastric cancer with a combination of tegafur, 5-fluorouracil and mitomycin C] *Gan To Kagaku Ryoho* 1988; 15: 2793-2795.
15. Mukai M, et al. Long-term survival after immunochemotherapy for juvenile colon cancer with peritoneal dissemination: a case report. *Oncol Rep* 2000; 7: 1343-1347.
16. Silberstein E, et al. Twelve-year survival after the diagnosis of locally advanced carcinoma of the pancreas: A case report. *J Surg Oncol* 2000; 75: 142-145.
17. Dutcher JP, et al. Long-term survival of a patient with multiple myeloma--a cure? A case

SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO A TABACO. Versión 1, 3 de mayo de 2018.

report. Cancer 1984; 53: 2069-2072.

Estos trabajos describen casos de largos supervivientes en distintos tipos de tumores en estadios avanzados. Estos casos pueden considerarse fenotipos extremos, dado que estas supervivencias tan prolongadas no son esperables en los tumores descritos.

18. Garcia-Cao I, et al. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. E.M.B.O. J. 2002; 21: 6225-6235.

Este trabajo describe un modelo de ratón que sobreexpresa p53 y que presenta resistencia al desarrollo de tumores. Esto indica que la existencia de alteraciones genéticas que protejan frente al desarrollo de cáncer es teóricamente posible.

19. Pérez-Gracia JL, Ruiz-Ilundáin MG. Cancer protective mutations: looking for the needle in the haystack. Clinical and Translational Oncology 2001; 3 169-171 (Editorial).

20. Perez-Gracia JL, et al. The role of extreme phenotype selection studies in the identification of clinically relevant genotypes in cancer research. Cancer 2002; 95:1605-10.

21. Perez-Gracia JL, et al. Selection of extreme phenotypes: the role of clinical observation in translational research. Clin Transl Oncol. 2010; 12: 174-80.

Estos artículos revisan la estrategia de selección de fenotipos extremos en cáncer y aportan nuevas vías de desarrollo de la misma, incluyendo la descrita en este proyecto de investigación.

22. Fusco J, et al. Genomic characterization of individuals presenting extreme phenotypes of high and low risk to develop non-small cell lung cancer induced by tobacco. Cancer Medicine 2018.

Este estudio analizó más de 2 millones de SNP en individuos con fenotipos extremos de riesgo de CNMP inducido por tabaco. La validación de sus resultados es el objetivo de este proyecto.

4 HIPÓTESIS.

Existen factores genéticos que confieren protección o aumento de susceptibilidad a desarrollar CNMP inducido por tabaco, dado que el riesgo de desarrollar esta enfermedad no es uniforme en todos los individuos. La selección de individuos con fenotipos extremos de muy alto y bajo riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco y el estudio de su DNA genómico mediante secuenciación del exoma puede permitir identificar estos factores.

5 OBJETIVOS.

5.1.1 Objetivo principal:

Identificar genotipos asociados a individuos con fenotipos de muy alto y muy bajo riesgo de desarrollar CNMP asociado al tabaco mediante secuenciación del exoma de estos individuos. Los resultados se compararán entre ambos grupos y también con una población normal, sin un riesgo aparentemente elevado o disminuido.

5.1.2 Objetivos secundarios:

1. Validar los resultados en una serie independiente de individuos con fenotipos similares.
2. Generar hipótesis que permitan validar funcionalmente en modelos preclínicos los genotipos identificados y validados.

SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO A TABACO. Versión 1, 3 de mayo de 2018.

3. Establecer por primera vez la prueba de concepto de que existen perfiles genéticos de protección frente al desarrollo de cáncer.
4. Validar la metodología de selección de fenotipos extremos.

6 METODOLOGÍA.

6.1 Diseño.

Estudio traslacional de selección de fenotipos extremos. Los individuos se seleccionarán de acuerdo a la presentación de fenotipos extremos respecto al riesgo de desarrollar CNMP inducido por tabaco.

6.1.1 Criterios de inclusión.

Los sujetos seleccionados deberán cumplir los siguientes criterios:

1. Fumadores importantes (definido como un consumo de tabaco de al menos 20 paquetes/año (20 años fumando un paquete al día o una cantidad equivalente) con las siguientes características:
 - Grupo A: menores de 55 años, diagnosticados de CNMP en cualquier estadio.
 - Grupo B: mayores de 75 años sin diagnóstico de CNMP ni otros tumores.
2. Consentimiento informado por escrito.
3. Ausencia de diagnóstico de otros tumores en los últimos 5 años (excepto tumores cutáneos de tipo no melanoma) y de síndromes familiares de cáncer.

6.1.2 Cálculo del tamaño muestral.

El cálculo del tamaño muestral se ha realizado mediante el programa estadístico (QUANTO). Se han considerado los siguientes parámetros, bajo un modelo aditivo: incidencia de la enfermedad del 0.001, alelos de riesgo con una frecuencia en la población superior al 5%, nivel de significación estadística del 5%. Con estas premisas, para detectar riesgos relativos superiores a 3.00 serán precisos 103 casos y 103 controles para cada una de las cohortes.

Disponemos de suficientes muestras de casos y controles para llevar a cabo el estudio. Para cuantificar las diferencias de riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en nuestras cohortes emplearemos: el modelo de Bach para definir el riesgo de cáncer de pulmón en fumadores (Bach, JNCI 2003; 95: 470-8); y el registro de incidencia de cáncer de pulmón del Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), del National Cancer Institute (NCI).

6.1.3 Extracción de DNA y secuenciación del exoma.

La calidad y cantidad de los ADNs serán analizadas mediante Qubit 2.0 (Life Technologies). Las librerías serán elaboradas siguiendo las recomendaciones del proveedor con el Nextera Rapid Capture Exome o Expanded Exome Kits (Illumina). Este estudio está diseñado para la realización de una captura de más del 97% de las CCDS, lo que incluye aproximadamente 215.000 exones con un tamaño total de ~62Mb, cubriéndose los 5 nt de las regiones flanqueantes de splicing. Las librerías, tras su cuantificación mediante qPCR, serán procesadas para la elaboración del SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO A TABACO. Versión 1, 3 de mayo de 2018.

template y carga de los Chips PI utilizando el sistema Ion Chef™. La secuenciación de las librerías se realizará con una profundidad media superior a 100X en un secuenciador masivo de última generación, HiSeq (Illumina). Tras la secuenciación se valorarán como parámetros de calidad de la eficiencia en el enriquecimiento y de la cobertura, la presencia de más del 92% de bases on-target y una profundidad superior a 20 lecturas en más del 90% de los amplicones.

Las lecturas obtenidas con el secuenciador se analizarán con el siguiente flujo de trabajo: 1) la eliminación de las secuencias de los adaptadores usados en la fase de preparación de las librerías y de los índices (barcodes) que identifican las distintas muestras. 2) El alineamiento de las secuencias obtenidas frente a la última versión del genoma de referencia (build 38 del genoma Hg19) 3) la Identificación de las variantes mediante el algoritmo Variant Caller. 4) Anotación funcional de cada una de las variantes identificadas, incluyendo información acerca del efecto de cada variante en la proteína, predicción de la patogenicidad de las mutaciones con varios predictores, y frecuencia de la variante en poblaciones control incluidas en las bases de datos (dbSNP y EVS). 5) Filtrado en dúo de la muestra tumoral frente al control de tejido normal, para la identificación y clasificación del origen de las variantes identificadas (germinal vs constitucional).

Las variantes seleccionadas serán validadas mediante las siguientes estrategias:

- Acomodar el proyecto a alguna de las plataformas de genotipado del centro nacional de genotipado, CeGen. En función del número de variantes a validar y el número de muestras a analizar, este proyecto se acomodará o bien en la plataforma MassArray de Sequenom con tecnología iPLEX® Gold o bien en la plataforma ABI 7900 HT System de LifeTechnologies con tecnología Taqman®.
- Utilizando los índices de patogenicidad que resulten de los algoritmos de predicción in silico

6.1.4 Consideraciones éticas.

El estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica de la Clínica Universidad de Navarra. Antes de ser incluidos en el estudio, todos los pacientes han firmado el consentimiento informado, que explica la naturaleza del estudio y especifica la información previa requerida por la Ley 14/2007 de Investigación Biomédica.

6.2 Variables.

Las variables empleadas son:

- para la selección de casos y controles: presencia o ausencia de CNMP, edad (años) y consumo de tabaco (paquetes-año).
- para la validación de alteraciones genéticas: análisis de las diferencias estadísticas observadas en la expresión diferencial entre ambas cohortes (ver análisis estadístico de los resultados).

6.3 Limitaciones del estudio y plan de contingencia.

SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO A TABACO. Versión 1, 3 de mayo de 2018.

Las principales limitaciones del estudio son que a pesar de la rigurosa selección realizada, el grupo de pacientes con cáncer sea demasiado heterogéneo o que los casos seleccionados no sean suficientemente extremos para detectar diferencias significativas. En este caso a) definiremos los casos de forma más homogénea, (p.e: limitándonos a un subgrupo de CNMP, i.e: adenocarcinoma o carcinoma escamoso); y b) definiremos los criterios de los casos y controles de forma más restrictiva, por ejemplo disminuyendo la edad de los pacientes con CNMP y aumentando la de los controles. Para ello emplearíamos muestras adicionales

7 PLAN DE TRABAJO.

7.1 Etapas de desarrollo.

- Septiembre- diciembre 2018: selección de casos, monitorización de la base de datos y preparación de muestras.
- Diciembre 2018- febrero 2019: secuenciación del exoma.
- Febrero 2019-Agosto 2019: análisis, interpretación y publicación de resultados.

7.2 Distribución de tareas del equipo investigador.

- Centro 1: Departamento de Oncología. Clínica Universidad de Navarra (centro coordinador): responsables del reclutamiento de pacientes con cáncer y de la preparación y coordinación de las bases de datos.
 - o Dr. José Luis Pérez Gracia. Consultor Clínico. Investigador principal y coordinador del proyecto.
 - o Dr. Alfonso Gúrpide Ayarra. Consultor Clínico.
- Centro 2: Programa de Genética del Cáncer Humano. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO): responsables de la realización de genotipados y de la interpretación de los resultados.
 - o Dra. Anna González Neira. Directora de la Unidad de Genotipado Humano.
- Centro 3: Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra.
 - o Dr. Luis Montuenga. Jefe de grupo.
 - o Dr. Rubén Pio. Investigador senior.
 - o Dra. María José Pajares. Investigadora senior.

8 PLAN DE DIFUSIÓN.

8.1 Impacto clínico.

1.- De los resultados concretos del proyecto: la identificación de perfiles genéticos asociados a fenotipos de muy bajo y muy alto riesgo de desarrollar cáncer de pulmón ante la exposición al tabaco, el factor de riesgo más relevante conocido, conllevaría los siguientes beneficios:

- identificación de poblaciones de riesgo, en los que se podrían llevar a cabo programas de información y deshabituación tabáquica así como de cribaje para

la detección precoz de cáncer de pulmón. Esta selección mejoraría los resultados de los programas de intervención y disminuiría su coste.

- identificación de vías de carcinogénesis y oncogénesis en el grupo de fumadores con cáncer a edad temprana, que podrían ser manipuladas mediante intervenciones farmacológicas o de otro tipo. Los mecanismos identificados podrían ser estudiados también en otros tumores y las posibles intervenciones podrían ser extrapoladas a los mismos.
- identificación de mecanismos biológicos de protección frente al desarrollo de tumores en el grupo de fumadores que no desarrolla cáncer. El conocimiento de estos mecanismos podría generar estrategias terapéuticas relevantes para la prevención del cáncer. Hay que destacar que los individuos del grupo sin cáncer no solo no han desarrollado CNMP, sino tampoco otros tumores, muy especialmente aquellos dependientes de tabaco.

2. De la validación de la metodología de selección de fenotipos extremos.

La validación de esta nueva metodología de investigación traslacional en cáncer permitiría su aplicación a otros tipos de tumores, estudiando individuos con diferentes riesgos de desarrollo de cáncer ante la exposición a factores de riesgo relevantes. También sería posible su aplicación a otras enfermedades no tumorales con factores de riesgo conocidos.

8.2 Resultados bibliométricos.

1. De los resultados concretos del proyecto:

- una publicación del trabajo original en una revista internacional de Oncología de alto impacto (primer decil: Lancet Oncology, Journal of Clinical Oncology, Cancer Research, Clinical Cancer Research, ...). Si los resultados de la validación fueran muy positivos, se valoraría su envío a una revista internacional de Medicina o de Investigación de primer nivel (Nature Genetics, Lancet, ...).
- una revisión sobre factores genéticos de riesgo de cáncer de pulmón inducido por tabaco en una revista de Oncología de alto impacto (primer decil).

2. De la validación de la metodología de selección de fenotipos extremos:

- una revisión sobre la metodología de selección de fenotipos extremos en cáncer, que se enviará a una revista internacional de alto impacto (primer decil: Lancet Oncology, Journal of Clinical Oncology, Cancer Research, Clinical Cancer Research, ...).

9 MEDIOS DISPONIBLES PARA LA REALIZACIÓN DEL PROYECTO.

9.1 Medios disponibles

1. Equipo investigador con experiencia en proyectos de investigación traslacionales y en las labores que les corresponde desarrollar durante el proyecto.
2. Plataforma de validación: desde el punto de vista tecnológico, el grupo investigador dispone de toda la infraestructura necesaria para realizar este proyecto dentro de la Unidad de Genotipación Humana en el CNIO: robot extractor automático de DNA, fluorímetro para la medición de concentración de DNA, robots dispensadores para automatizar el proceso, plataforma de

SECUENCIACIÓN DEL EXOMA DE INDIVIDUOS CON FENOTIPOS EXTREMOS DE ALTO Y BAJO RIESGO DE DESARROLLAR CÁNCER DE PULMÓN ASOCIADO A TABACO. Versión 1, 3 de mayo de 2018.

genotipado, memoria requerida para almacenamiento de datos generados y software de análisis necesarios.

3. Muestras de individuos con fenotipos extremos de riesgo de cáncer de pulmón inducido por tabaco: ya disponemos de las muestras suficientes para llevar a cabo el estudio (ver consideraciones estadísticas). Por lo tanto, la viabilidad del proyecto es muy alta.

9.2 Medios no disponibles.

No se precisa de ningún medio adicional, salvo financiación para llevar a cabo las técnicas previstas.

10 JUSTIFICACIÓN DETALLADA DE LA AYUDA SOLICITADA.

Se solicita ayuda económica para los siguientes conceptos:

- Material fungible: secuenciación de exomas y análisis estadístico de los resultados.
- Tasas y gestión de las publicaciones asociadas.

11 PRESUPUESTO SOLICITADO.

SUBVENCIÓN SOLICITADA	IMPORTE
MATERIAL FUNGIBLE	
- Extracción de DNA	1.500
- Secuenciación de exomas	25.000
- Tasas de las publicaciones asociadas	2.500
TOTAL	29.000