



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

Determinación de los niveles de expresión de miRNAs circulantes en individuos sanos y pacientes con cáncer pulmonar, expuestos o no al humo del tabaco.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO
PRESENTA**

Luis Rafael Basilio Mercado

TUTOR DE TESIS

Blanca Ortiz Quintero



Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Francisco Javier Plasencia de la Parra

VOCAL: Natividad Garcia Escamilla

SECRETARIO: Blanca Ortiz Quintero

1er. SUPLENTE: Francisca Morayna Gutierrez Luna

2° SUPLENTE: Alberto Ortega Vazquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Departamento de Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias

ASESOR DEL TEMA: Blanca Ortiz Quintero

SUSTENTANTE (S): BASILIO MERCADO LUIS RAFAEL

Esta tesis se desarrolló en el Departamento de Bioquímica de la Unidad de Investigación del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias de la SSA, y fue financiada por el proyecto de CONACyT SALUD-2015-C01-261999.

GLOSARIO DE SIGLAS

AD	Adenocarcinoma pulmonar
AD-Fu	Grupo de sujetos con adenocarcinoma fumadores
AD-Nfu	Grupo de sujetos con adenocarcinoma no fumadores
AGO2	Proteína Argonauta 2
Cq	Valores crudos de los ciclos cuantificados
CRC	Células de cáncer colorrectal
CSC	Condensado de humo tabaco
CT	Ciclo de corte o <i>cyclethreshold</i>
DICER1	RNAasa III presente en el citoplasma
DGCR8	Proteína de union de la región critica del síndrome de DiGeorge
Drosha	RNAasa III específica para RNA de doble hebra
GW182	Proteína GW182
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
KEGG	Base de datos Kyoto para genes y genomas
KLF	Krüppel like factor
LPS	Liposarcoma
METTL3	Gen de la N6-adenosina-metiltransferasa subunidad catalítica
mRNA	RNA mensajero
miRNAs	micro RNAs
NKAP	Proteína asociada a NF-kB
NSCLC	Cáncer de células no pequeñas
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PHLPP2	PH Domain And Leucine Rich Repeat Protein Phosphatase 2
pb	Pares de bases
PDAC	Adenocarcinoma ductal pancreático
PPD	Prueba cutánea de derivado proteico purificado
SCLC	Cáncer de células pequeñas
S-Fu	Grupo de sujetos aparentemente sanos fumadores
SND	Sobrenadante
S-Nfu	Grupo de sujetos aparentemente sanos no fumadores
RISC	Complejo de silenciamiento inducido por RNA
RNA	Ácido ribonucleico
TNCB	Cáncer de mama triple-negativo
XPO5	Exportina 5, exporta pre-miRNA fuera del núcleo al citoplasma

TABLA DE CONTENIDO

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCION	2
2.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER PULMONAR.....	3
2.2 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CANCER PULMONAR	6
2.3 DIAGNOSTICO DEL CANCER PULMONAR	8
2.4 CUADRO CLÍNICO DEL CANCER PULMONAR	10
2.5 TRATAMIENTO DEL CANCER PULMONAR	11
2.6 MICRORNAS (miRNAs).....	11
2.7 BIOGENESIS DE miRNAs	12
2.8 MECANISMOS DE SECRECION DE LOS miRNAs	14
2.9 miRNAs SECRETADOS EN SANGRE PERIFÉRICA COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO EN EL CÁNCER PULMONAR.	16
3. JUSTIFICACIÓN	19
4. HIPOTESIS	20
5. OBJETIVO GENERAL	20
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
6. MATERIAL Y METODOS	21
6.1 SUJETOS SANOS, PACIENTES Y MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	21
6.2 GRUPOS DE ESTUDIO Y NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS.....	22
6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE RNA.....	22
6.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE miRNAs MEDIANTE LA PRUEBA DE TAMIZAJE BASADA EN LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA O “PCRARRAY”	23
6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
6.6 ANÁLISIS DE GENES BLANCO Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADAS POR LOS miRNAs.....	27
7. RESULTADOS	32
7.1 DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO	32
7.2 DETECCIÓN DE miRNAs MEDIANTE PCR-ARRAY.....	33
7.3 ASOCIACION PREDICTIVA DE LOS miRNAs CON PROCESOS DE CARCINOGENESIS	46
7.4 IDENTIFICACION DE LOS miRNAs ASOCIADOS AL TABAQUISMO Y AL DIAGNOSTICO DEL CANCER PULMONAR.	51
7.5 miRNAs ASOCIADOS PATHWAYS IN CANCER.	52
8 DISCUSION	56
9 CONCLUSIONES	60
10.INDICE DE IMÁGENES	61
11.INDICE DE TABLAS.....	62
12 REFERENCIAS	63

1. RESUMEN

El cáncer pulmonar es la primera causa de muerte por neoplasias malignas, y la exposición al humo de tabaco es el principal factor de riesgo conocido. La alta mortalidad de este cáncer se atribuye principalmente al diagnóstico tardío, por lo que la identificación de biomarcadores de diagnóstico es prioritario en esta enfermedad. Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes que regulan la expresión génica de forma post-transcripcional mediante el bloqueo o eliminación de RNA mensajeros blancos. Los miRNAs regulan procesos celulares esenciales como ciclo celular, diferenciación, proliferación y apoptosis; y su expresión aberrante ha sido asociada a la presencia de neoplasias, incluyendo el cáncer pulmonar. Los miRNAs han sido señalados como biomarcadores de diagnóstico potenciales en el cáncer pulmonar en varios estudios publicados; en particular, los miRNAs en circulación sanguínea (suero y plasma) son considerados biomarcadores potenciales no-invasivos de esta enfermedad. Sin embargo, siendo el tabaquismo un factor de riesgo relevante en el cáncer pulmonar, es necesario analizar el efecto del mismo en la expresión de los miRNAs circulantes en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, lo cual no se ha realizado sistemáticamente a la fecha. Para determinar el efecto del tabaquismo en la concentración de miRNAs circulantes y las implicaciones en el valor diagnóstico de los miRNAs asociados a la enfermedad, se analizaron los niveles de concentración de los miRNAs en suero de individuos sanos y en pacientes con cáncer pulmonar subtipo adenocarcinoma (AD), fumadores y no fumadores, mediante la prueba de tamizaje de PCR-Array. El PCR-Array consiste de un PCR en tiempo real en placas que contiene 736 miRNAs conocidos. Los resultados mostraron que 7 miRNAs se encuentran sub-expresados en individuos sanos fumadores con respecto a individuos sanos que nunca fumaron, indicando que la expresión de estos miRNAs se altera debido a la exposición al humo de tabaco. El análisis de los miRNAs expresados en pacientes con AD no-fumadores con respecto a individuos sanos no-fumadores mostró 35 miRNAs sobre-expresados y 3 miRNAs sub-expresados. Los pacientes con AD fumadores mostraron 36 miRNAs sobre-expresados y 3 miRNAs sub-expresados comparados con los

individuos sanos fumadores. El análisis del total de los pacientes con AD comparados con el total de los individuos sanos mostró 43 miRNAs sobre-expresados y 1 miRNA sub-expresado. El análisis de comparación de los miRNAs alterados en pacientes con AD en los diferentes grupos de estudio mostró 18 miRNAs comúnmente alterados en AD no-fumadores, AD fumadores y el total de los pacientes con AD. Nueve miRNAs estaban alterados exclusivamente en AD no-fumadores y 13 miRNAs en AD fumadores.

Los datos sugieren que la expresión de los miRNAs en individuos sanos efectivamente son afectados por el tabaquismo, sin embargo, en este estudio no identificamos a estos miRNAs como alterados en pacientes con AD comparados con sujetos sanos, expuestos o no al humo de tabaco. En el caso de los miRNAs alterados en pacientes con AD con respecto a individuos sanos, los resultados sugieren que la identificación de los mismos depende de la comparación entre individuos expuestos y no expuestos al humo del tabaco, es decir, para identificar biomarcadores de diagnóstico de AD debe incluirse el análisis de la influencia del tabaquismo en los pacientes e individuos incluidos en el estudio.

Por último, el análisis predictivo indicó que varios candidatos miRNAs identificados en pacientes con AD podrían estar involucrados en mecanismos de carcinogénesis, señalándolos como potenciales biomarcadores de diagnóstico de la enfermedad.

2. INTRODUCCION

El cáncer pulmonar es la primera causa de muerte por neoplasias malignas, y la exposición al humo de tabaco es el principal factor de riesgo conocido. La alta mortalidad se atribuye al diagnóstico tardío y a la poca eficiencia de los tratamientos disponibles, por lo que la identificación de biomarcadores y blancos terapéuticos es una prioridad en esta enfermedad.

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no-codificantes que regulan la expresión genética post-transcripcionalmente, y son asociados al desarrollo de neoplasias y señalados como biomarcadores de diagnóstico potenciales. En particular, los miRNAs secretados a circulación sanguínea son biomarcadores no-invasivos de

diagnóstico de diversas neoplasias, incluyendo el cáncer pulmonar. Sin embargo, no fue hasta el 2012 cuando se reportó la alteración del perfil de miRNAs en circulación sanguínea de ratones C57 expuestos al humo de tabaco que habían desarrollado fibrosis intersticial. En el 2013 se reportó que el tabaquismo altera el perfil de miRNAs en plasma de sujetos sanos, sugiriendo la importancia del análisis del efecto del tabaquismo en los miRNAs circulantes asociados a enfermedades relacionadas al tabaquismo, como el cáncer pulmonar.

Actualmente no existen reportes publicados de perfiles de miRNAs séricos específicos en individuos sanos fumadores o no-fumadores, ni de perfiles únicos en pacientes fumadores con adenocarcinoma.

Debido a lo anterior, se propone analizar el efecto del tabaquismo en la concentración de los miRNAs séricos, y determinar si los miRNAs alterados se asocian al tabaquismo o al diagnóstico del cáncer pulmonar. Lo anterior es relevante para conocer las implicaciones en el valor diagnóstico potencial de los miRNAs reportados como alterados en el cáncer pulmonar.

2.1 EPIDEMIOLOGIA DEL CANCER PULMONAR

El cáncer es un grupo de enfermedades heterogéneas caracterizado por el crecimiento descontrolado de células, que producen señales de crecimiento de forma autosuficiente, son insensibles a las señales limitadoras del crecimiento, poseen resistencia a la apoptosis, angiogénesis sostenida y capacidad para llevar a cabo invasión de tejidos adyacentes y metástasis (1).

El cáncer es la mayor causa de mortalidad y morbilidad a nivel global, en el 2012 se reportaron 14 millones de nuevos casos y 8 millones de muertes relacionadas con el cáncer en el mundo (2). Su impacto económico es significativo, se calcula que en el 2010 su costo económico fue de 1.16 billones de dólares sin inclusión en el costo a largo plazo de las familias (2).

El cáncer pulmonar es la primera causa de mortalidad y presenta el tercer lugar de incidencia a nivel mundial entre las neoplasias malignas, con un índice de sobrevivencia a cinco años más bajo de 18.6% en ambos géneros (Figura I) (3). El bajo índice de sobrevivencia del cáncer pulmonar se atribuye principalmente al

diagnóstico tardío, la presencia de metástasis al momento del diagnóstico y a la inefectividad de las terapias disponibles (4, 5).

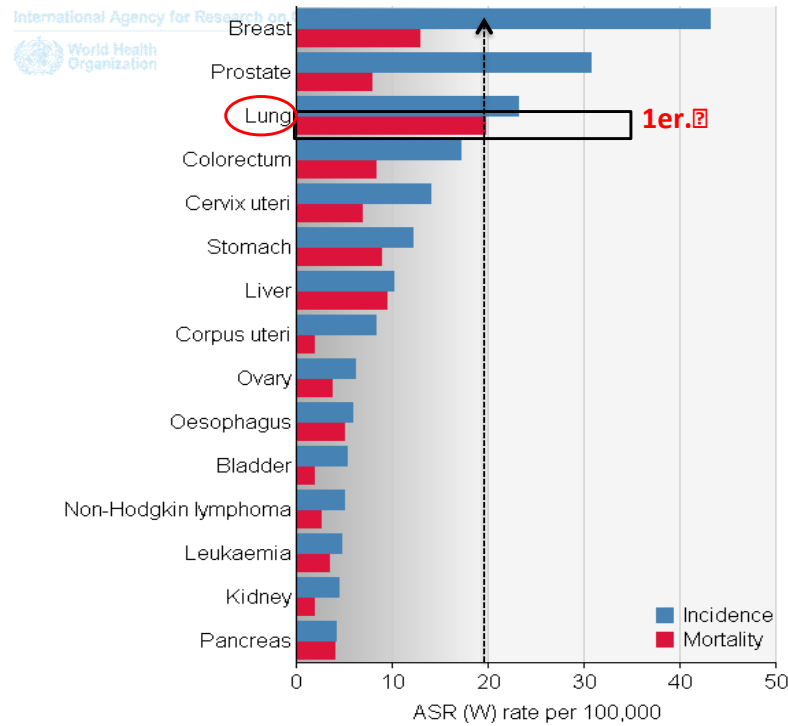


Figura I. Índice de incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, ambos géneros. GLOBOCAN 2012 (IARC) Section of Cancer Surveillance <http://globocan.iarc.fr>. (30/07/2018).

En México, el cáncer pulmonar presenta el cuarto lugar en mortalidad y quinto en incidencia de cáncer en ambos géneros (Figura II).

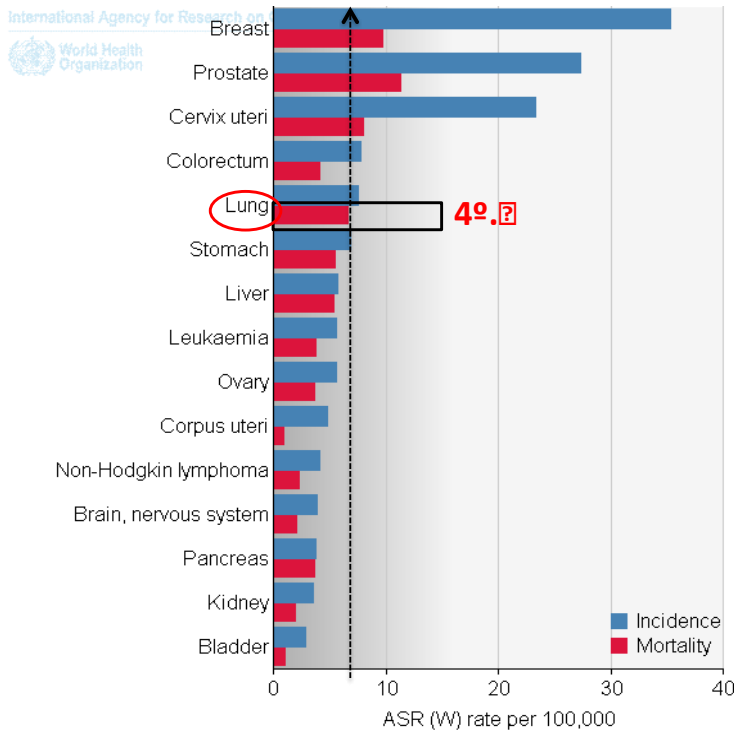


Figura II. Índice de incidencia y mortalidad del cáncer en México, ambos géneros. GLOBOCAN 2012 (IARC) Section of Cancer Surveillance <http://globocan.iarc.fr>. (30/07/2018).

El fumar (tabaco) es el factor de riesgo número uno asociado al cáncer pulmonar, y se le atribuye el 80% y 90% de las muertes por este tipo de cáncer en mujeres y hombres, respectivamente (6). La exposición pasiva al humo de tabaco causa aproximadamente 7,330 muertes por cáncer de pulmón entre los no fumadores cada año (6).

Al uso de tabaco se ha asociado la muerte de 6 millones de personas anualmente debido al cáncer y otras enfermedades relacionadas. Al menos 1.3 billones de personas usan algún tipo de tabaco (7). Entre 2005 y 2010, un promedio de 130,659 estadounidenses (74,300 hombres y 56,359 mujeres) murieron de cáncer de pulmón atribuible al tabaco cada año.

En México, el cáncer pulmonar ha incrementado su incidencia en las últimas décadas (8).

El principal mecanismo mediante el cual el tabaco produce carcinogénesis es a través de los múltiples compuestos genotóxicos presentes en el humo del tabaco, que provocan daño en el DNA produciendo mutaciones en genes críticos (10).

El humo de tabaco contiene más de 7000 compuestos químicos y al menos 62 de éstos pueden causar cáncer, destacando a los hidrocarburos policíclicos aromáticos, nitrosaminas específicas del tabaco, aminas aromáticas y otros carcinógenos volátiles como formaldehído, acetaldehído, 1,3-butadieno y benceno (9).

Diversos compuestos del humo del tabaco son procesados por enzimas como el citocromo P-450 y la glutatión S-transferasa que los transforma en sustancias más hidrosolubles para ser excretadas por el cuerpo. Durante este proceso se pueden formar compuestos reactivos como intermediarios que se pueden unir a sitios nucleofílicos en el DNA, lo que puede ocasionar una mutación permanente(10).

Entre los compuestos que se pueden encontrar en el humo del tabaco están nitrosaminas 4-(Metil Nitrosamina)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y la N-nitrosonornicotina (NNN), que son más potentes en el humo de tabaco, NNK es un cancerígeno pulmonar potente que también puede inducir cáncer de hígado y nasal. NNN ha sido demostrado como un cancerígeno de esófago, cavidad nasal y tracto respiratorio en animales de laboratorio(11).

Adicionalmente se ha observado que otros componentes del humo del tabaco se pueden unir directamente a receptores celulares produciendo la activación de protein cinasas y receptores de crecimiento, y de esta manera contribuir al desarrollo de cáncer(10).

2.2 CLASIFICACIÓN HISTOLÓGICA DEL CANCER PULMONAR

El cáncer pulmonar se clasifica histológicamente en Cáncer de células pequeñas (SCLC, siglas en inglés) y Cáncer de células no pequeñas (NSCLC, siglas en inglés) (7). El NSCLC con 85% de los casos de cáncer pulmonar y el SCLC con 15 % (12).

El cáncer pulmonar de células no pequeñas, se subclasifica en cáncer escamoso (también conocido como epidermoide), adenocarcinoma y cáncer de células gigantes (5).

En México, el más frecuente es el adenocarcinoma con 76 %. El resto se distribuye en carcinomas epidermoides 13.3%, indiferenciado y otro tipo de cáncer de pulmón de células no pequeñas 7.2 % y carcinoma de células grandes 3.3 % (8).

2.2.1 Cáncer Pulmonar de Células No-Pequeñas (NSCLC)

El NSCLC está clasificado en adenocarcinoma, cáncer epidermoide y cáncer pulmonar de células grandes (7). El cáncer pulmonar de células grandes está constituido por células poligonales grandes (6). Este es un grupo de neoplasias altamente anaplásicas, generalmente se asientan en la periferia del pulmón e invaden los bronquios subsegmentarios y las vías aéreas de gran calibre. Su pronóstico es desfavorable por la propensión a diseminarse a sitios distantes (6). Este representa de 5-10 % de cáncer pulmonar (7). El cáncer de células grandes se distribuye de forma homogénea a lo largo del pulmón, a diferencia del cáncer escamoso que se desarrolla en la zona central del pulmón y del adenocarcinoma que se desarrolla de forma periférica (13).

El cáncer epidermoide está estrechamente correlacionado con antecedentes de tabaquismo y es el más común en los hombres (14). Tiende a originarse en los bronquios centrales como un crecimiento intraluminal, por lo que se puede detectar más tempranamente en comparación con otras neoplasias pulmonares mediante examen citológico de esputo (15). Generalmente se disemina centralmente hacia los bronquios mayores y los ganglios linfáticos hiliares y se propaga a otras partes del tórax de manera tardía (15).

El adenocarcinoma es el subtipo más común de cáncer pulmonar mundialmente, con un estimado del 41% (16). Está definido como un cáncer con diferenciación glandular, un fenotipo de neumocito o de producción de moco (17). El Adenocarcinoma está asociado con el tabaquismo en menor medida que el carcinoma epidermoide (14). Los adenocarcinomas pueden tener su origen en los

tejidos bronquiolares o alveolares se localizan generalmente en sitios más periféricos que el carcinoma epidermoide, en ocasiones están asociados con áreas de cicatrización.

2.2.2 Cáncer Pulmonar de Células Pequeñas (SCLC)

El SCLC se caracteriza por células que pueden ser redondas, ovales u fusiformes, con citoplasma escaso, gránulos finos de cromatina, límites indefinidos y tienen un nucléolo ausente o poco notable. Hay presencia de necrosis y el conteo de mitosis es alto (17).

Las células crecen en grupos sin una organización glandular. En microscopia electrónica demuestran la presencia de gránulos neurosecretorios en algunas células tumorales similares a las halladas en epitelio bronquial de los neonatos (15). La presencia de esos gránulos y la capacidad de los tumores de secretar hormonas polipeptídicas y la presencia de marcadores neuroendocrinos como la enolasa y otros productos semejantes a la paratormona y otros productos hormonalmente activos sugieren que estos tumores pueden surgir de células neuroendocrinas del epitelio bronquial (15).

En este tipo de cáncer pulmonar el agente causal principal es el tabaquismo con un 95% de los casos ya que rara vez se observa en no fumadores (18).

2.3 DIAGNOSTICO DEL CANCER PULMONAR

La posibilidad de sobrevivir al cáncer pulmonar es muy baja cuando se diagnostica en etapas tardías, como fase III y IV. Sin embargo, cuando el cáncer pulmonar está en su fase IA el paciente tiene una posibilidad del 75% de sobrevivir más de 5 años (19).

Todos los pacientes con sospecha carcinoma pulmonar deben tener una evaluación clínica completa, esto incluye historia clínica con antecedentes personales, familiares, posibles síndromes paraneoplásicos, y examen físico completo (15).

En los exámenes de laboratorio se debe contar con biimetría hemática completa, química sanguínea que incluye pruebas de función renal y hepática, ácido úrico,

calcio, fósforo, Deshidrogenasa láctica, Fosfatasa Alcalina, y prueba cutánea de derivado proteico purificado (PPD) (15).

Los estudios citológicos de esputo, son el método menos invasivo para diagnosticar cáncer de pulmón(20). Para obtener muestra de esputo puede ser obtenida de forma espontánea después de que el paciente despierta, o puede ser inducida(21).

Este método depende un muestreo riguroso, (de al menos 3 muestras) para obtener un diagnóstico correcto (22). Debido a que su sensibilidad varía dependiendo de la localización del cáncer de pulmón, la sensibilidad de este estudio disminuye a medida que se hace periférica la etiología, debido a esto se recomienda hacer otras pruebas para comprobar la presencia de cáncer pulmonar (20, 23).

La broncoscopia flexible es un procedimiento de diagnóstico preciso en cáncer de pulmón endoscópicamente visible, su sensibilidad aumenta cuando se combina con técnicas como lavado bronquial, cepillado bronquial, biopsia endobronquial y la biopsia por aspiración con aguja fina(24).

La biopsia por aspiración con agua fina es un método sencillo que no requiere un equipo especial, se utiliza una aguja unida a una jeringa, y se aspira una muestra de una zona donde se sospecha la presencia de metástasis, posteriormente la muestra se analiza, este método tiene alta sensibilidad y especificidad diagnóstica las complicaciones que se pueden presentar tras el procedimiento son neumotórax, el dolor torácico y la hemoptisis(25, 26).

Los estudios de imágenes mediante tomografía computarizada (CT), resonancia magnética nuclear (RMN), la tomografía por emisión de positrones(PET) y ecografía se realizan para detectar lesiones y evaluar el estadio de la enfermedad(27).

La tomografía por emisión de positrones (PET) es un estudio no invasivo usado para identificar lesiones metastásicas. La PET depende principalmente de las características metabólicas del tejido que se quiere diagnosticar, y toma ventaja del aumento de absorción de glucosa observado en células neoplásicas, utilizando

el análogo 2-fluoro-2-deoxi-D-glucosa (FDG), su sensibilidad puede ser de hasta un 90%. Este estudio es de mucha utilidad en la evaluación de masas pulmonares, ganglios y metástasis a distancia. (28).

La tomografía computarizada tiene un rol importante en la estadificación del cáncer de pulmón, ya que provee de información morfológica existente y del grado de diseminación del tumor, pero tiene una habilidad limitada para diferenciar lesiones malignas de lesiones benignas en los órganos o en los ganglios linfáticos(29).

La RMN es de alta sensibilidad y especificidad para diagnóstico y estadificación del cáncer pulmonar, además permiten descartar metástasis a otros órganos. RMN, este método tiene mayor sensibilidad para diferenciar entre: grasa, músculo, coágulos flujo sanguíneo, tumor, así mismo la infiltración a pared torácica se define mejor con la RMN en comparación con otros estudios de imagen(30).

La angiografía digital tiene utilidad en casos seleccionados de hemoptisis masivas y con la finalidad de realizar embolización de tumores que han producido sangrados (26).

2.4 CUADRO CLÍNICO DEL CANCER PULMONAR

Las manifestaciones clínicas del cáncer primario son muy variables en relación con la localización del tumor, la existencia de metástasis y la respuesta al tratamiento(31). Los síntomas clínicos no son específicos y tienden a desarrollarse de manera silenciosa y con síntomas sistémicos no específicos como fatiga, anorexia y pérdida de peso, los pacientes también pueden presentar síndromes paraneoplásicos(27).

Las manifestaciones principales de un tumor primario son tos asociada a una masa endobronquial o una neumonía postobstructiva, disnea que puede ser causada por que el tumor está ocluyendo las vías respiratorias, dolor intermitente en el pecho y hemoptisis(32).

Las receptores de dolor en el tórax se encuentran en la pleura parietal, el mediastino, los vasos sanguíneos de mayor tamaño y las fibras vagales eferentes peribronquiales. Cuando la pleura es invadida el dolor se torna persistente localizado y de mayor intensidad. Si invaden el mediastino ocasionan ronquera por

el compromiso del nervio laríngeo recurrente y pueden ocasionar dificultad en la deglución debida a la compresión del esófago. Cuando están adyacentes a la pleura visceral a menudo producen derrame pleural lo que origina fiebre, dolor y frote pleural (15).

La metástasis del cáncer pulmonar puede ocurrir en cualquier órgano, los paciente con cáncer pulmonar de células no pequeñas tienden a presentar la metástasis en las glándulas adrenales, en los nódulos linfáticos, en el cerebro, hueso y el hígado(33).

Aproximadamente un 10% de pacientes desarrollan síntomas sistémicos relacionados con síndromes paraneoplásicos. Los síndromes paraneoplásicos son causados por sustancias bioactivas producidas por el tumor o por la respuesta del cuerpo a la presencia del tumor no relacionados con la metástasis(27).

Los principales síndromes paraneoplásicos endocrinos son la hipercalcemia, la secreción del péptido similar a la hormona paratiroidea y síndrome de Cushing, hipoglicemia, acromegalia, ginecomastia e hipertiroidismo, otros trastornos hematológicos se pueden presentar, como endocarditis no bacteriana y coagulación intravascular diseminada (15, 34).

2.5 TRATAMIENTO DEL CANCER PULMONAR

La cirugía sigue siendo la opción más exitosa para curar pacientes diagnosticados con cáncer de pulmón. Para esta opción el cáncer debe ser resecable y el paciente debe ser capaz de tolerar la intervención (35).

La quimioterapia auxiliar es generalmente indicada en los estadios de IIIA cuando el tumor no es resecable, en estadio IVA la quimioterapia prolonga la supervivencia del paciente(36).

2.6 MICRORNAS (miRNAs)

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificantes de doble cadena de 19-25 pb de largo generadas con forma de horquilla. Estos actúan como reguladores de la expresión genética y tienen un rol importante los procesos fisiológicos debidos que pueden modular diversos procesos, como reparación de DNA, apoptosis, proliferación celular diferenciación celular (37-39). Los miRNAs se expresan de

forma específica en células, tejido y se encuentran en fluidos corporales en condiciones fisiológicas normales, pero su expresión se altera en presencia de neoplasias malignas. Las evidencias indican que los patrones de expresión alterados de miRNAs en tejido y fluidos corporales pueden ser asociados al diagnóstico, pronóstico y clasificación histológicas de varios tipos de cánceres, entre ellos el cáncer pulmonar (40-43). En particular, los miRNAs secretados a fluidos corporales han demostrado ser resistentes a condiciones externas agresivas como pH extremos y ciclos de congelamiento y descongelamiento de las muestras biológicas que los contienen. Estas muestras biológicas incluyen sangre periférica (suero y plasma), orina, saliva, lágrimas, líquido pleural entre otros fluidos corporales (43).

2.7 BIOGENESIS DE miRNAs

Las secuencias que codifican a los miRNAs se encuentran distribuidas por todo el genoma, en regiones intrónicas, exómicas y en intergénicas. La síntesis de los miRNAs es iniciada por la transcripción vía RNA polimerasa II, aunque algunos miRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa III (44). El transcrito primario producido por el proceso anterior se llama pri-miRNA, el cual consta de una horquilla de 33 pb y puede estar constituida por cientos o varios miles de pares de bases conteniendo en el extremo 5' un casquete y una cola de poli A en el extremo 3' (45). Los pri-miRNAs son escindidos por un microprocesador, compuesto por la enzima DROSHA (RNAsa III, que es específica para RNA de doble hebra), y la proteína DGCR8 (binding protein DiGeorge syndrome critical region, por sus siglas en inglés) (8).

Drosha contiene dos dominios RNAsa III, cada uno escinde una cadena de dsRNA en dirección a la base de la horquilla contenida en el pri-miRNA para liberar los precursores del miRNA 60-70 nucleótidos conocidos como pre-miRNA (46, 47).

Una vez producidos los pre-miRNAs, éstos son exportados del núcleo al citoplasma por la exportina 5 (XPO5). En el citoplasma, los pre-miRNAs son procesados por DICER1, una RNAsa III que escinde de forma asimétrica a los pre-miRNA (48) para generar el dúplex de 22 pb que es el miRNA maduro (Figura III).

Una de las hebras del miRNA maduro es reclutada por el complejo proteico nombre completo (RISC) mientras que la otra hebra es degradada. RISC interactúa con el complejo proteínico Argonauta_GW182 para regular la función del RNA mensajero (mRNA) blanco, esto se logra cuando reconoce el mRNA blanco por medio de la secuencia del extremo 5' de la hebra guía del miRNA maduro, conocida como secuencia semilla que es complementaria al extremo 3' del mRNA blanco(49).

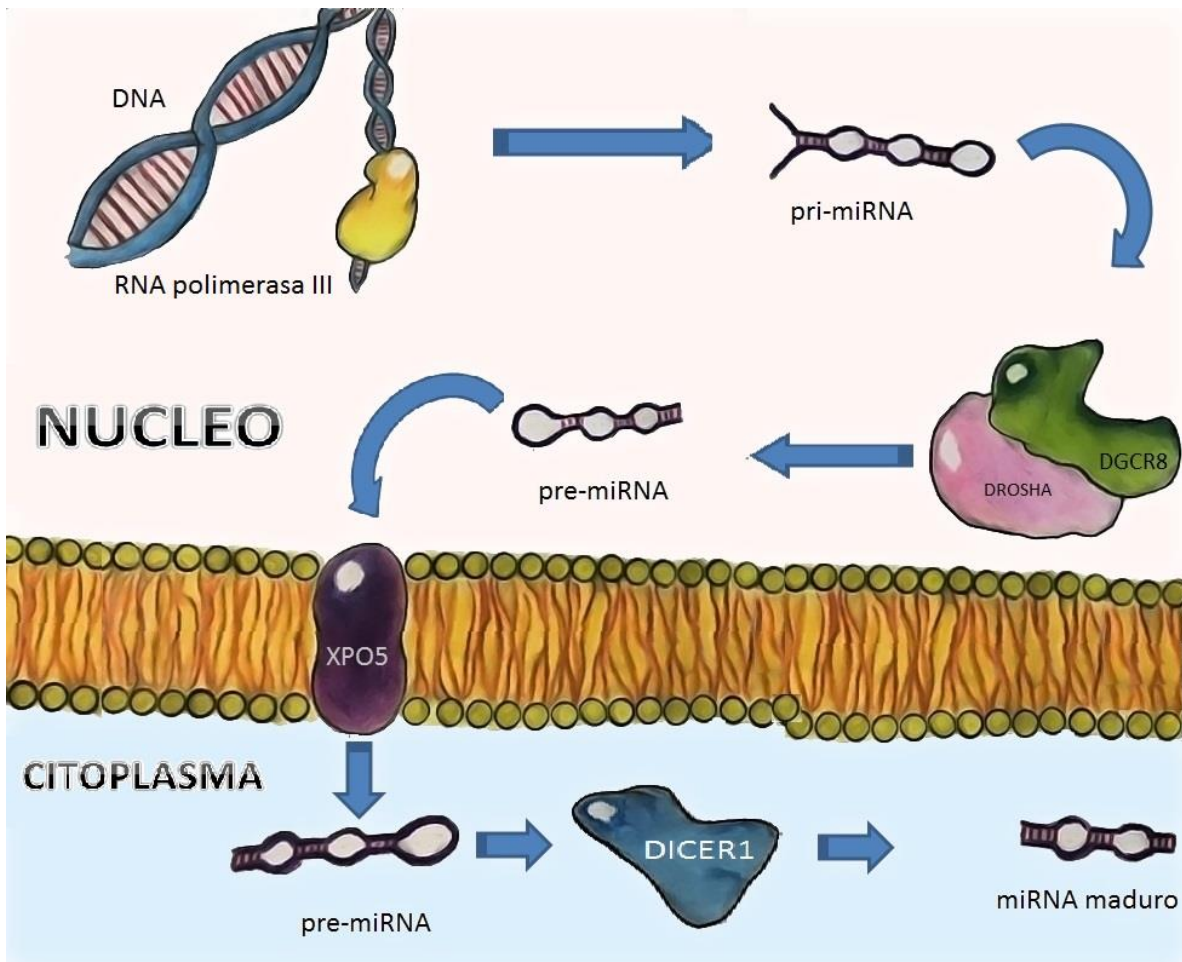


Figura III. Mecanismo de biogénesis de los miRNAs

Las evidencias indican que existen tres posibles mecanismos para la regulación de la traducción (Figura IV):

- a) La represión de la traducción, en este mecanismo los miRNAs previenen la unión de la subunidad 60S a los mRNAs blanco a la unidad 40S(50).
- b) La desestabilización del mRNA el cual involucra la eliminación de la cola de Poli-A de los miRNAs blancos y por consecuencia la degradación del mRNA blanco(51).
- c) La degradación del mRNA blanco catalizada por la proteína AGO unida al miRNA(52).

2.8 MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LOS miRNAs

Los miRNAs pueden ser secretados a los fluidos corporales mediante 4 mecanismos conocidos a la fecha: a) Transportados en exosomas, b) Unidos a la proteína argonauta (Ago2), c) Unidos a la proteína de alta densidad (HDL), d) Asociados a la nucleofosmina 1 (NPM1) (Figura IV).

a)Exosomas: Un exosoma es un tipo de vesícula extracelular con un diámetro menor a 100 nm que se genera en el compartimiento endosomal por la fusión de cuerpos multivesiculares (MVB) con la membrana plasmática [17-18].

Li reportó en el 2010 la presencia de miRNAs en exosomas y que estos miRNAs están unidos en complejos con la proteína Argonauta2 (Ago2). La resistencia a RNAsa de los miRNA se ha asociado a la unión con Ago2 (53). Se demostró que los exosomas también están enriquecidos con GW182, el cual es necesario para la función de miRNA (54). Valadi y colaboradores demostraron que los miRNAs contenidos en exosomas son funcionales y transferibles (55, 56).

b) Argonauta 2 (AGO2): Jaso Arroyo y col. (57) reportó en su estudio que los miRNAs que circulan en plasma no siempre están asociados a vesículas. Observaron que el 95 % de miR-16 y miR-92 no estaban asociados con vesículas, mientras que del 40% al 75% de let-7a se encontraba dentro de vesículas. Lo que indicaba que existen miRNAs que se asocian mayoritariamente a vesículas pero otros que están libres de ellas. Para demostrar que let-7a no estaba asociado a proteínas, separaron los miRNAs por medio de cromatografía de exclusión por tamaño y se observó que let-7a eluía primero debido a que no formaba un complejo con una proteína. De acuerdo al estudio hasta el 43% de miRNA en plasma y el 27% de miRNA en suero se eluía en las últimas fracciones, lo que

ellos suponen se debe a la formación de complejos ribonucleoproteicos con Ago2(51).

En otro estudio se encontró que más del 97% de los miRNAs estudiados (hsa-miR-16, hsa-miR-21 and hsa-miR-24) se encontraban en plasma sin estar asociados a exosomas unidos en complejos proteicos con Ago2 (58).

c) NPM1: La nucleofosmina 1 (NPM1) es una proteína que se encontró en cantidades importantes en sobrenadantes de fibroblastos libres de exosomas, estos sobrenadantes contenían simultáneamente la mayor concentración de miRNA y de NPM1. La lisis celular no fue significativa durante el desarrollo de este experimento por lo que no se consideró que esta tuviera repercusión en los resultados, se concluyó que la mayor parte del miRNA unido a proteínas en este estudio esta unido a NPM1 [39].

d) Proteínas de alta densidad (HDL): Las lipoproteínas de alta densidad se pueden asociar con miRNA, esto se ha demostrado en pacientes sanos y con arterosclerosis. Fatiha Tabet y colaboradores demostraron que el miRNA asociado a HDL tiene capacidad funcional, se demostró miRNA-223 suprime la expresión de la molécula intercelular de adhesión (ICAM-1), a través de la transferencia de miRNA-223 de células endoteliales 43].

El proceso exacto mediante el cual HDL se asocia con miRNA, no es conocido pero se ha formulado la hipótesis de que HDL se puede unir con miRNA extracelular a través de un enlace catiónico divalente [45].

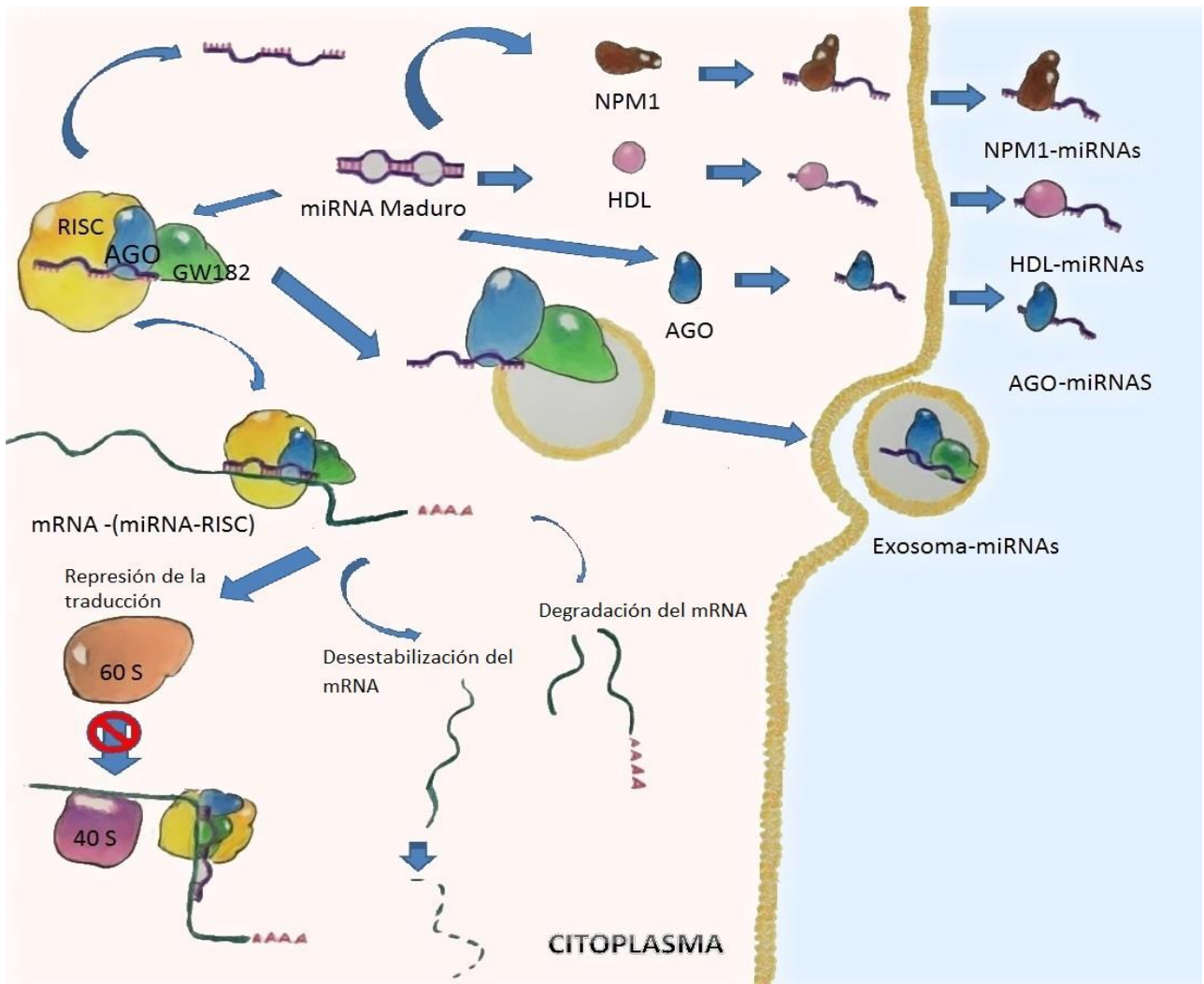


Figura IV. Mecanismos de secreción y de acción de los miRNAs.

2.9 miRNAs SECRETADOS EN SANGRE PERIFÉRICA COMO BIOMARCADORES DE DIAGNÓSTICO EN EL CÁNCER PULMONAR.

Los biomarcadores son moléculas que se miden objetivamente y son evaluadas como indicadores de procesos biológicos normales, procesos patológicos o respuestas farmacológicas a intervenciones terapéuticas (59). Pueden ser usados como herramientas para identificar pacientes enfermos o con condiciones anormales, para observar en que estadio de la enfermedad se encuentra un paciente, como indicadores en la prognosis de la enfermedad, para predecir eficacia terapéutica, monitorear la respuesta clínica a la remoción de un tumor primario y la terapia de cáncer en estadios avanzados (59, 60).

Los miRNAs son secretados en sangre periférica (llamados miRNAs circulantes) y en otros fluidos corporales. De forma similar a los miRNAs encontrados en tejido, los perfiles de expresión de los miRNAs circulantes se pueden alterar, siendo dicha alteración asociada a la presencia de varios tipos de cánceres, incluyendo el pulmonar (43). Debido a que las muestras biológicas que contienen los miRNAs circulantes (plasma y suero) son más fáciles de obtener que una muestra de tejido pulmonar por ejemplo, aunada a la resistencia a la degradación que estos miRNAs presentan durante la manipulación de las muestras biológicas, se consideran buenos candidatos para biomarcadores no-invasivos.

Existen varios estudios que han reportado evidencias de los miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores de diagnóstico del cáncer pulmonar (43, 61).

Shen y cols. realizaron un estudio donde se analizaron 12 miRNAs en plasma que se expresaban de forma aberrante en pacientes con NSCLC (miRNA-21, 126, 145, 139, 182, 200b, 205, 210, 375, 429, 486-5p y 708) (62). En este estudio se analizó una cohorte de 58 pacientes con NSCLC y 29 individuos sanos. Los resultados indicaron que el mejor modelo para diagnóstico se obtuvo de la determinación de los niveles de expresión simultánea de 4 miRNAs (miRNA-21, -126, 210 y 486-5p) con una sensibilidad del 86% y una especificidad del 96.55%. Los pacientes en Fase I presentaron una sensibilidad del 73.33% y una especificidad del 96.55% (62).

Hennessey y cols. realizaron un estudio de dos etapas, en la primera etapa se examinó por medio de qRT-PCR la presencia de 180 miRNA en el suero de 30 pacientes sin tratamiento previo con NSCLC y 20 controles, posteriormente los miRNA seleccionados en la primera etapa fueron validados en el suero de 55 pacientes de NSCLC y 75 controles, todos los controles eran fumadores con alto riesgo de contraer cáncer de pulmón, encontraron que el par miRNA-15b y miRNA-27B tuvo una especificidad del 80% y una sensibilidad del 100% (63).

Chen y cols. analizaron los niveles de los miRNA en el suero de 400 pacientes con NSCLC y 200 controles. Posteriormente escogió los miRNAs con un nivel estadístico significativo de diferencia de expresión entre las muestras y los controles $p < 0.05$ (64). De esta manera se obtuvo un panel con 10 miRNAs

(miRNA-209, miRNA-24, miRNA-25, miRNA-145, miRNA-152, miRNA-199-5p, miRNA-221, miRNA-222, miRNA-223 y miRNA-320), este era capaz de distinguir entre los pacientes con NSCLC y los controles con una sensibilidad de 96% y una especificidad de 97% (64).

En el estudio de Sanfiorenzo y cols. se obtuvo un panel de 12 miRNAs, obtenido por qRT-PCR en el plasma de una población de 52 pacientes con NSCLS (Etapas I-III A) y 30 controles, 10 con enfermedad pulmonar obstructiva crónica y 20 pacientes sanos (65). Ese panel podía diferenciar los pacientes con NSCLC de los pacientes sanos con una sensibilidad y una especificidad clínicas del 85 % y 75% respectivamente, el panel contenía los siguientes miRNAs miRNA-155-5p, miRNA-20a-5p, miRNA-25-3p, miRNA-296-5p, miRNA-191-5p, miRNA-126-3p, miRNA-223-3p, miRNA-152-3p, miRNA-145-5p, miRNA-199a-5p, miRNA-24-3p, y miRNA-let-7f-5p (65).

Sin embargo, siendo el tabaquismo un factor de riesgo relevante en el cáncer pulmonar, es necesario incluir el análisis del efecto del mismo en la identificación de miRNAs circulantes como biomarcadores, lo cual en México no había sido realizado sistemáticamente a la fecha.

Lo anterior sucedió probablemente porque no fue hasta el 2012 cuando se reportó la alteración del perfil de miRNAs en circulación sanguínea de ratones C57 expuestos al humo de tabaco que habían desarrollado fibrosis intersticial (66). En ese mismo año se reportaron alteraciones en la expresión de miRNAs en células epiteliales bronquiales y macrófagos debido al humo de tabaco (67, 68), siendo estas alteraciones en miRNAs celulares asociadas con carcinogénesis.

3. JUSTIFICACIÓN

Los miRNAs han sido señalados como biomarcadores potenciales de diagnóstico en el cáncer pulmonar en varios estudios publicados; en particular, los miRNAs en circulación sanguínea (suero y plasma) son considerados biomarcadores potenciales no-invasivos de esta enfermedad para detección, pronóstico y monitoreo. Sin embargo, siendo el tabaquismo un factor de riesgo relevante en el cáncer pulmonar, es necesario analizar el efecto del mismo en los niveles de los miRNAs circulantes para su validación como biomarcadores de diagnóstico, lo cual no se ha realizado sistemáticamente a la fecha.

4. HIPOTESIS

Los niveles de la concentración de los miRNAs circulantes son alterados por el tabaquismo, afectando el valor de diagnóstico de los miRNAs asociados al cáncer pulmonar.

5. OBJETIVO GENERAL

Determinar los niveles de la concentración de miRNAs en el suero de individuos aparentemente sanos y de pacientes con cáncer pulmonar (fumadores y no fumadores) todos de población mexicana adultos con una edad de 45 a 75 años, e identificar aquéllos miRNAs cuyos niveles de expresión estén asociados al tabaquismo o bien al diagnóstico de la enfermedad.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES

1. Determinar el perfil de expresión de miRNAs en suero de individuos aparentemente sanos (fumadores y no fumadores) y pacientes con cáncer pulmonar, mediante la prueba de tamizaje de PCRArray.
2. Identificar los miRNAs diferencialmente expresados en individuos sanos fumadores comparados con no fumadores, mediante herramientas de bioestadística (estadísticamente significativo: $p \leq 0.05$, valor de cambio ≥ 2).
3. Identificar los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con cáncer pulmonar comparados con individuos sanos, mediante herramientas de bioestadística (estadísticamente significativo: $p \leq 0.05$, valor de cambio ≥ 2).
4. Identificar los miRNAs asociados al tabaquismo o bien al diagnóstico del cáncer pulmonar.

6. MATERIAL Y METODOS

6.1 SUJETOS SANOS, PACIENTES Y MUESTRAS BIOLÓGICAS

Individuos sanos: Se incluyeron individuos aparentemente sanos voluntarios reclutados de la clínica para dejar de fumar y donadores del banco de sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) en la Ciudad de México. Todos los participantes fueron >45 años de edad, ambos géneros, con capacidad pulmonar normal verificada por espirometría (FEV1/FVC) y con datos normales de biometría hemática y química sanguínea. Los criterios de exclusión fueron: diagnóstico conocido de asma, enfermedad pulmonar obstructiva (EPOC), infección por VIH, cáncer pulmonar e infecciones respiratorias previas dentro de las 2 semanas previas a la toma de muestra (por interrogatorio). Los individuos fumadores se definieron como aquéllos fumadores activos al momento de participar en el estudio; y a los no-fumadores como individuos que nunca habían fumado ni habían sido expuestos pasivamente al humo de cigarro ni de leña. Los fumadores incluidos presentaron una exposición crónica al humo de tabaco determinado por un índice tabáquico (IT) > 10 paquetes/año; siendo $IT = (\# \text{ cigarros por día}) \times (\text{años fumando de forma continua}) \text{ dividido entre } 20$ (que son los números de cigarros por cajetilla o paquete).

Pacientes. Se incluyeron pacientes con diagnóstico histopatológico confirmado de cáncer pulmonar primario subtipo adenocarcinoma provenientes del Servicio de Neumología Oncológica del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias “Ismael Cosío Villegas” (INER) en la Ciudad de México. Los pacientes incluidos en el estudio no recibieron terapia adyuvante previo a la toma de la muestra (tratamiento oncológico), fueron mayores de 35 años, ambos géneros, fumadores y no fumadores

Se obtuvieron las cartas de consentimiento informado de todos los participantes en el protocolo de investigación anexado como la figura V. El protocolo de investigación fue aprobado por el comité de ciencia y ética en investigación, así como por el comité de bioseguridad del INER.

Criterios de Inclusión

- Confirmación por histopatología de NSCLC
- Todos los estadios (clasificación TNM)

- Ambos género
- Edad mayor a 35 años.
- Nacidos en México, de padres mexicanos.

Criterios de Exclusión

- Infecciones activas
- Neoplasias de Origen No Pulmonar
- Tratamiento Oncológico previo a la toma de la muestra

6.2 GRUPOS DE ESTUDIO Y NÚMERO DE MUESTRAS ANALIZADAS

Individuos sanos no fumadores: 25 (15 femeninos, 10 masculinos)

Individuos sanos fumadores: 25 (15 femeninos, 10 masculinos)

Pacientes cáncer pulmonar no fumadores: 20 (10 femeninos, 10 masculinos)

Pacientes cáncer pulmonar fumadores: 20 (10 femeninos, 10 masculinos)

6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS Y EXTRACCIÓN DE RNA

Se obtuvo suero a partir de muestras de sangre periférica por centrifugación a 1600 g (4000 rpm) a 4°C durante 20 min. El suero se separó y se almacenó a -80 °C hasta la realización del análisis.

Para estudiar el perfil de microRNAs, se usaron mezclas (“pools”) del suero de 5 individuos de cada grupo de estudio a volúmenes iguales de 120 µl (volumen final 600 µl). El RNA se extrajo utilizando mirVana PARIS (Ambion, Gran Island, NY, EUA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante, excepto que el ARN resultante se diluyó en 50 µl de agua libre de RNAasa. El protocolo consistió en los pasos descritos a continuación:

Protocolo de extracción de RNA: Con 600 µL suero Kit mirVana PARIS (AM1556)

1	Descongelar los sueros en un baño de hielo. Preparar las mezclas de sueros ("pools") con volúmenes iguales de cada suero para un total de 600 µL.
2	Alicuotar 300 µL del pool de sueros en un microtubo de 1.5 mL (2 tubos para 600 µL)
3	Adicionar a cada microtubo (300 µL mezcla de suero), 300 µL de 2X Denaturing Solution a T.A. y mezclar con vortex inmediatamente. Adicional la misma cantidad al otro microtubo y mezclar con vortex inmediatamente.
4	Incubar en baño de hielo x 20 minutos.
5	Adicionar un volumen total (600 µL) de Acido-Fenol-Cloroformo a cada microtubo.
6	Mezclar con vortex de 30 a 60 segundos.
7	Centrifugar x 5 minutos a 10,000 g a T.A.
8	Remover la fase acuosa de cada tubo y transferirla a un tubo nuevo.
9	Adicionar 1.25 volumen a Etanol al 100% T.A. y mezclar. _____ µL (fase acuosa) x 1.25 volumen =
10	Adicionar 700 µL de la fase acuosa-etanol a la columna.
11	Centrifugar x 30 segundos a 10,000 g a T.A. Retirar SND. Repetir paso 10 y 11 con la demás fase acuosa-etanol, hasta terminar.
12	Adicionar 700 µL de miRNA Wash Solution 1.
13	Centrifugar x 15 segundos a 10,000 g a T.A. Retirar SND.
14	Adicionar 500 µL de Wash Solution 2/3.
15	Centrifugar x 15 segundos a 10,000 g a T.A. Retirar SND.
16	Adicionar 500 µL de Wash Solution 2/3.
17	Centrifugar x 1 minuto a 10,000 g a T.A. Retirar SND.
18	Cambiarle a la columna el tubo colector por uno nuevo.
19	Eluir con 50 µL de agua libre de RNAsas con previo calentamiento a 95 °C.
20	Centrifugar x 30 segundos a 10,000 g a T.A.
21	Guardar a -80 °C hasta su uso.

6.4 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE miRNAs MEDIANTE LA PRUEBA DE TAMIZAJE BASADA EN LA REACCIÓN EN CADENA DE POLIMERASA O "PCRARRAY".

El perfil global cuantitativo de los miRNA séricos se realizó utilizando el TaqMan Array Human MicroRNA Panel v2.0, Card A y B (Applied Biosystems, CA, EE.UU.). Las Tarjeta A y B contienen los Ensayos MicroRNA TaqMan que permiten la cuantificación simultánea de 677 miRNAs maduros más 4 controles endógenos. Se realizaron reacciones cuantitativas en cadena de polimerasa de transcripción inversa (RT-qPCR) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El protocolo consistió en los pasos descritos a continuación:

6.4.1) Transcripción Reversa (RT)

- Se descongelaron los reactivos y las muestras de ARN total en hielo.

- Se preparó una mezcla por separado para la reacción (para cada muestra) con los siguientes reactivos y cantidades:

Componentes de la Mezcla para la Reacción RT	Volumen por muestra (μL)
Agua libre de nucleasas	0.20
10X RT Buffer	0.80
MgCl ₂ (25 mM)	0.90
dNTPs with dTTP (100mM)	0.20
RNase Inhibitor (20 U/ μL)	0.10
MultiScribe Reverse Transcriptase (50 U/ μL)	1.50
Megaplex RT Primers A o B (10X)	0.80
Total	4.50

- Se mezclaron invirtiendo los tubos (A y B).
- Se agregó a cada tubo (tubo A y tubo B, por muestra) de mezcla de la reacción RT, 3 μL de ARN total de cada muestra con una concentración de 25 $\eta\text{g}/\mu\text{L}$, para un volumen final de 7.5 μL en cada tubo (tubo A y tubo B).
- Posteriormente, se realizó la reacción en un Termociclador bajo los siguientes parámetros:
 - Volumen de reacción: 7.5 μL .
 - Condiciones del termociclador:

Fase	Temperatura	Tiempo
Ciclado (40 Ciclos)	16°C	2 min
	42°C	1 min
	50°C	1 seg
Hold	85°C	5 min
Hold	4°C	∞

- Los productos de la RT (cDNA o ADN copia) se pueden almacenar a una temperatura de -20°C.

6.4.2) Pre-amplificación

- Se descongelaron las muestras de cDNA y los reactivos en hielo.
- Se realizó la mezcla con los reactivos como sigue:

Componentes de la Mezcla para Reacción de PreAmp	Volumen por muestra (µL)
Agua Libre de Nucleasas	7.5
Taqman PreAmp Master Mix (2X)	12.5
Megaplex PreAmp Primers (10X)(Pool A y B)	2.5
Total	22.5

- Se homogeneizó la mezcla por pipeteo.
- Se agregaron 2.5 µL de cDNA (por muestra) a la mezcla correspondiente a cada tubo (tubo A y tubo B), se mezcló por pipeteo, para un volumen final de 25 µL.
- Se centrifugó brevemente para mandar al fondo del tubo toda la mezcla.
- Se incubó en hielo por 5 minutos.
- Se llevó a cabo la reacción en un Termociclador con los siguientes parámetros:
 - Volumen final: 25 µL
 - Condiciones del termociclador:

Fase	Temperatura	Tiempo
Hold	95°C	10 min
Hold	55°C	2 min
Hold	72°C	2 min
Ciclado (12 Ciclos)	95°C	15 seg
	60°C	4 min
Hold	99.9°C	10 min
Hold	4°C	∞

- Finalmente, se diluyó el producto de la Pre-amplificación 1:4 (agregar 75 μL) con agua libre de nucleasas, homogeneizando la muestra.
- Las muestras se almacenaron a -20°C .

6.4.3) Mezcla PCR

- Se descongelaron los componentes de la mezcla y las muestras en hielo.
- Se realizó la mezcla en tubos de 1.5ml con los siguientes volúmenes para cada muestra (placas A y B):

Componentes de la Reacción de PCR	Volumen por Muestra (μL)
Agua libre de nucleasas	441
TaqMan Universal Master Mix, No AmpErase UNG, 2X	450
Producto de PreAmp diluido	9
Total	900

- Se homogeneizó la mezcla por pipeteo; posteriormente, se comenzó con la carga de las placas TaqMan microRNA Array (Arreglo de microRNA TaqMan).

6.4.4) Cargado de las muestras en las placas de TaqMan microRNA Array (Placa A y B)

- Teniendo las mezclas de reacción de PCR listas de cada muestra (A y B), se comenzó con la carga de las placas, se agregó a cada placa 800 μL en los depósitos de llenado la mezcla correspondiente (100 μL por depósito, 8 en total).
- Posteriormente, se centrifugaron a 480 g (1200 rpm) por 1 minuto, con la finalidad de que la muestra se irrigue en todos los pozos de cada depósito.
- Se sellaron las placas, con la finalidad de aislar la muestra en los pozos, se colocó el carro en la posición inicial, se insertó la placa haciendo que

coincidieran las perforaciones en la placa con los clips del carro y se deslizó el carro.

- Con las placas selladas se recortaron los depósitos de llenado; listos para ingresar en el equipo “7900HT Fast Real-Time PCR” (Applied Biosystems).

6.4.5) Análisis de las muestras en las placas TaqMan microRNA Array

Todas las reacciones se realizaron en el equipo 7900 HT (Applied Biosystems). Los datos crudos provenientes del aparato se colectaron y procesaron mediante el sistema de detección de secuencias versión 2.3 (SDS software, de Applied Biosystems). Los valores crudos de los ciclos cuantificados (Cq) se calcularon usando el software SDS aplicando parámetros y umbral de línea de base automáticos. Sólo los miRNAs con un valor de Cq < 35 se consideraron detectables. El valor de la expresión media global de todos los miRNAs se utilizó como el factor de normalización (Mestdagh et al., 2009). La cuantificación relativa (Rq) de cada miRNA se calculó usando la ecuación $2^{-\Delta CT}$ y el valor de cambio (“Fold Change”) se calculó con la fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Dónde:

$\Delta CT = CT$ promedio del grupo de muestras para el gen de interés – CT promedio del grupo de muestras para el gen referencia

$-\Delta\Delta CT = -(\Delta CT$ grupo de interés- ΔCT grupo calibrador)

$2^{-(1+E0)}$ donde $E0=Es$ la eficiencia de amplificación.

6.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La expresión diferencial de miRNAs entre los grupos se evaluó mediante la prueba t de Student. Estadísticamente significativo: $p \leq 0.05$, valor de cambio (“FoldChange”) ≥ 2 , utilizando el software *Expression Suite v1.0 (Life Technologies)*.

6.6 ANÁLISIS DE GENES BLANCO Y VÍAS DE SEÑALIZACIÓN REGULADAS POR LOS miRNAs

Los análisis de predicción de genes blanco y de enriquecimiento de vías de señalización se llevaron a cabo utilizando el miRSystem, un Sistema Integrado para Caracterizar Vías y Funciones enriquecidas de Blancos de microRNAs (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>).

El MiRSystem incluye siete algoritmos que predicen los blancos de miRNAs: DIANA-microT, miRanda, mirBridge, PicTar, PITA, rna22 y TargetScan. La información de la vía se generó a partir de la enciclopedia de base de datos Kyoto para genes y genomas (KEGG). Las vías enriquecidas que mostraron diferencias significativas ($p \leq 0.01$) se sometieron a análisis molecular adicional y la construcción de redes *interactome*. Estas redes se construyeron para conectar los miRNAs (diferencialmente expresados) a sus probables genes objetivo (o para el enriquecimiento vías) dentro de las vías enriquecidas seleccionadas; Las redes resultantes se exportaron a Cytoscape v3.1.0 (<http://cytoscape.org/index.php>) para su visualización.

CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA PARTICIPAR EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACION MÉDICA

Título del protocolo: Efecto del grado de tabaquismo y del género en la expresión de miRNAs circulantes: implicaciones en su valor diagnóstico.

Investigador principal: Dra. Blanca Ortiz Quintero

Sede del estudio: Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias "Ismael Cosío Villegas" (INER)

Nombre del participante: _____

Fecha _____ **No. Expediente INER** _____ **No. Folio** _____

Estimado participante (a)

Esta es **una invitación VOLUNTARIA para participar en un estudio de investigación biomédica**. Usted debe ser informado acerca del objetivo del estudio, de los procedimientos que Usted estará consintiendo (en caso de aceptar), de los beneficios del estudio, de la confidencialidad de su identidad y de la libertad de retirar su consentimiento en cualquier momento. Lo anterior para resguardar los derechos de bienestar y privacidad de todo ser humano que sea sujeto a cualquier investigación biomédica.

OBJETIVO DEL ESTUDIO: (Lo que deseamos lograr al final del estudio)

Investigar el efecto del tabaquismo y el género en la expresión de microRNAs, que son moléculas que pueden usarse para el diagnóstico de enfermedades que pueden desarrollarse por el tabaquismo, como el cáncer pulmonar y la enfermedad crónica obstructiva.

JUSTIFICACION DEL ESTUDIO (¿Porqué hacemos este estudio?):

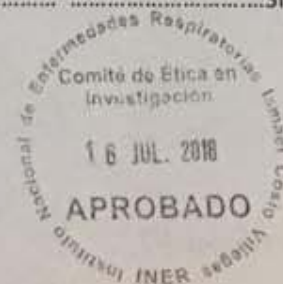
Es importante desarrollar métodos de diagnóstico que ayuden a detectar enfermedades asociadas al tabaquismo, y los microRNAs son moléculas en la sangre que pueden usarse para dicho diagnóstico. Sin embargo, el tabaquismo puede afectar la determinación de estas moléculas, por lo que debe analizarse el efecto del tabaquismo sobre ellas para poder desarrollar un método diagnóstico confiable.

PROCEDIMIENTOS DEL ESTUDIO (lo que Usted accede, en caso de aceptar)

MUESTRAS BIOLÓGICAS: Marque SI o NO a lo que usted accede a donar

1. Su autorización para la donación de sangre venosa frescaSI _____
NO _____
2. Su autorización para la donación de **muestras SOBRANTES** de sangre venosa y tejido que obtengan en el Instituto para su diagnóstico. ***En este caso Usted NO SERA SOMETIDO A NINGÚN PROCEDIMIENTO EXTRA para este propósito.***SI _____
NO _____

OTROS (que accede en caso de firmar el consentimiento)



3. Su autorización para que la muestra almacenada pueda ser utilizada en protocolos de investigación asociados.

RIESGOS Y MOLESTIAS DEL PROCEDIMIENTO:

1. La toma de muestra de sangre venosa implica molestias tales como el dolor de la picadura de aguja. En algunas ocasiones, se forma un pequeño moretón en el lugar de la picadura. El procedimiento implica una picadura para extraer la sangre venosa en dos tubos de 6 mL cada uno.
2. En caso de sólo aceptar que se use los sobrantes de muestra biológica, Usted no será sometido a NINGUN PROCEDIMIENTO EXTRA para este fin. Nosotros recogeremos lo que sobre de sus muestras biológicas al laboratorio de análisis clínicos del INER.

Contacto .-El estudio requiere el registro de la evolución de su enfermedad, por lo que solicitamos su consentimiento para comunicarnos con Usted o algún familiar cercano a lo largo de su tratamiento y evolución de la enfermedad, aún fuera del INER.

COSTOS:

Usted no requiere pagar nada por aceptar participar. Así mismo, usted no recibirá ningún pago por su participación. Este estudio es independiente de los gastos generados por su atención médica en el INER.

PARTICIPACIÓN VOLUNTARIA Y RETIRO:

Su decisión de participar en este estudio es VOLUNTARIA. No habrá ninguna consecuencia desfavorable para usted, en caso de no aceptar la invitación. Si decide participar en el estudio puede retirarse en el momento que lo desee. Su decisión será respetada sin pedir ninguna explicación. ESTA DECISIÓN NO TENDRÁ NINGUNA INFLUENCIA EN SUS DERECHOS COMO PACIENTE EN EL INER.

CONFIDENCIALIDAD:

La información personal obtenida en este estudio será mantenida con estricta confidencialidad por el grupo de investigadores. Bajo ninguna circunstancia usted será identificado (a) si los resultados de este estudio de investigación se presentan en reuniones científicas o en publicaciones médicas.

BENEFICIOS DEL ESTUDIO:

Este estudio permitirá que en un futuro se desarrolle una prueba diagnóstica confiable usando los marcadores llamados miRNAs en la sangre para el diagnóstico de enfermedades como el cáncer pulmonar.

ACLARACIONES Y SOLICITUD DE INFORMACIÓN ACERCA DEL PROTOCOLO O RESULTADOS DEL MISMO:

1.- En el transcurso del estudio usted podrá solicitar información actualizada sobre el mismo, al investigador responsable: **Dra. Blanca Ortiz Quintero**, Investigador principal, Departamento de Bioquímica, Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias. Calzada de Tlalpan 4502, colonia Sección XVI, México DF, 14080. Tel: **54871705**. Correo electrónico: **boq@iner.gob.mx**.

2.-En caso de tener alguna duda sobre sus derechos como participante del estudio, puede ponerme en contacto con el Presidente del Comité de Ética en Investigación del INER, al teléfono **54 87 17 00** extensiones **5110 y 5254**.



SI CONSIDERA QUE NO HAY DUDAS NI PREGUNTAS ACERCA DE SU PARTICIPACIÓN, SI ASÍ USTED LO DESEA, PUEDE FIRMAR LA CARTA DE CONSENTIMIENTO ABAJO.

He leído y comprendido la información anterior y mis preguntas fueron respondidas de manera satisfactoria. He sido informado y entiendo que los datos obtenidos en el estudio pueden ser publicados con fines científicos. Al firmar este consentimiento, doy mi autorización para que utilicen las muestras biológicas señaladas y el material genético que se obtenga para fines de investigación científico-médica y en investigaciones posteriores asociadas.

Al firmar este consentimiento, no he renunciado a alguno de mis derechos legales a los que tendría como paciente en un estudio de investigación. Recibiré una copia firmada y fechada de esta carta de consentimiento informado.

NOMBRE DEL PARTICIPANTE: _____

FIRMA DEL PARTICIPANTE: _____ Fecha: _____

Esta parte debe ser completada por el Investigador (o quien colecta la carta de consentimiento):

He explicado al Sr(a). _____ la naturaleza y los propósitos de la investigación; le he explicado acerca de los riesgos y beneficios que implica su participación. He contestado a las preguntas y he preguntado si tiene alguna duda. Acepto que he leído y conozco la normatividad correspondiente para realizar investigación con seres humanos y me apego a ella. Una vez concluida la sesión de preguntas y respuestas, se procedió a firmar el presente documento.

Nombre y Firma del investigador

Fecha



Figura V. Consentimiento informado del protocolo de investigación.

7. RESULTADOS

7.1 DESCRIPCIÓN DE LOS GRUPOS DE ESTUDIO

7.1.1) Sujetos sanos

El grupo de sujetos aparentemente sanos no-fumadores (**S-NFu**) se formó con un total de 25 individuos, 15 del género femenino y 10 del género masculino. El promedio de edad fue de 54.6 ± 6 años, nunca fueron fumadores (tabaquismo negativo) y nunca tuvieron exposición pasiva al humo de tabaco (fumador pasivo). El grupo de sujetos aparentemente sanos fumadores (**S-Fu**) se formó con un total de 25 individuos, 15 del género femenino y 10 del género masculino. El promedio de edad fue de 51.2 ± 5.7 , todos fumadores activos al momento del estudio con exposición crónica al humo de tabaco indicado por el índice tabáquico de 33.4 ± 9.7 paquetes/año.

7.1.2) Pacientes con adenocarcinoma pulmonar

El grupo de sujetos diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar no-fumadores (**AD-NFu**) se formó con un total de 20 individuos, 10 del género femenino y 10 del género masculino. El promedio de edad fue de 61.7 ± 12.6 , nunca fueron fumadores (tabaquismo negativo) y fueron diagnosticados histopatológicamente con cáncer pulmonar de células no-pequeñas primario subtipo histológico adenocarcinoma.

El grupo de sujetos diagnosticados con adenocarcinoma pulmonar fumadores (**AD-Fu**) se formó con un total de 20 individuos, 10 del género femenino y 10 del género masculino. El promedio de edad fue de 62.9 ± 11.7 , todos fumadores con un índice tabáquico de 21.6 ± 10.5 paquetes/año, y fueron diagnosticados histopatológicamente con cáncer pulmonar de células no-pequeñas primario subtipo histológico adenocarcinoma.

Los datos epidemiológicos de los grupos de estudio se resumen en las **tablas 1 y 2**.

Tabla 1. Datos epidemiológicos del grupo de estudio de individuos sanos

GRUPO DE ESTUDIO	Número	Género	Edad (años)	Tabaquismo	Fumador activo	Fumador pasivo	Índice tabáquico (IT)
Sanos No-Fumadores (S-NFu)	25	15 (F), 10 (M)	54.6 ± 5.6	Negativo	No	No	NA
Sanos Fumadores (S-Fu)	25	15 (F), 10 (M)	51.2 ± 5.7	Positivo	Si	NA	33.4 ± 9.7

F= Femenino. M= Masculino. NA= No Aplica

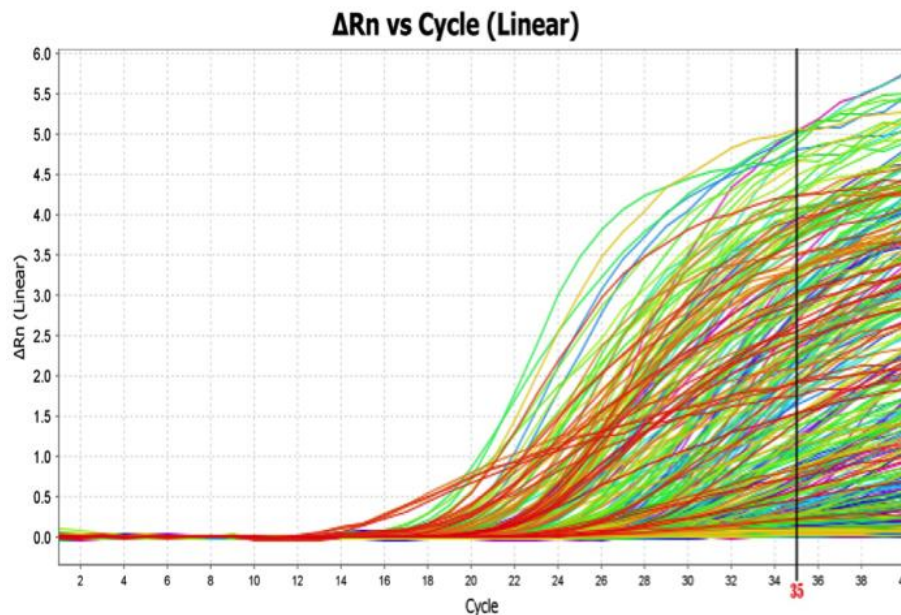
Tabla 2. Datos epidemiológicos del grupo de estudio de pacientes con adenocarcinoma pulmonar

GRUPO DE ESTUDIO	Número	Género	Edad (años)	Tabaquismo	Índice tabáquico (IT)	DIAGNOSTICO HISTOPATOLOGICO	ESTADIO
Adenocarcinoma No-fumadores (AD-NFu)	20	10 (F), 10 (M)	61.7 ± 12.6	Negativo	NA	Adenocarcinoma pulmonar	4
Adenocarcinoma Fumadores (AD-Fu)	20	10 (F), 10 (M)	62.9 ± 11.7	Positivo	21.6 ± 10.5	Adenocarcinoma pulmonar	4

F= Femenino. M= Masculino. NA= No Aplica

7.2 DETECCIÓN DE miRNAs MEDIANTE PCR-ARRAY

7.2.1) Detección.- La figura 1 muestra una gráfica de amplificación de los miRNAs en una de las placas de PCR-Array. Los datos se normalizaron con la media de la expresión global de los miRNAs en cada placa y se procedió a realizar el análisis estadístico para identificar los miRNAs diferencialmente expresados en el grupo de estudio de interés. Para identificar los miRNAs expresados diferencialmente en fumadores, se analizaron los niveles de expresión de los miRNAs expresados en los individuos sanos fumadores (**S-Fu**) y se compararon los niveles de expresión de los miRNAs expresados en los individuos sanos no-fumadores (**S-NFu**). Se consideraron miRNAs diferencialmente expresados aquellos cuyos niveles de expresión presentaran una diferencia estadística con una $p \leq 0.05$ y un valor de cambio > 2 con relación al grupo de comparación.



ΔRn = Diferencia de la señal de fluorescencia.

Figura VI. Gráfica representativa de amplificación de miRNAs mediante PCR-Array.

7.2.2) MicroRNAs diferencialmente expresados en sanos fumadores (S-Fu) versus Sanos no-fumadores (S-NFu).

Para identificar los miRNAs cuya expresión pueda ser alterada debida al tabaquismo en individuos sanos, se analizó el nivel de expresión de los miRNAs en individuos sanos fumadores comparados con individuos sanos no fumadores como control.

La **figura VII** muestra una gráfica “de volcán” que representa los miRNAs detectados en **S-Fu** comparados con **S-NFu** en la placa A y B, respectivamente. El eje de la “Y” representa el valor de “p” en el sistema logarítmico; y la línea divisoria en 1.301 ($\log 0.05 = 1.3$) representa el punto de corte por arriba del cual la $p \leq 0.05$. El eje “X” muestra los valores de cambio en escala logarítmica (\log_2) donde se señalan los valores -2 y 2 ($\log_2 4 = 2$) que representan el punto de corte donde el valor de cambio es mayor de 4 (valor + o -). En el cuadrante superior izquierdo (puntos en color verde) de la **figura VII** se encuentran representados los miRNAs sub-expresados en **S-Fu** con relación a los **S-NFu** de la placa A y en la placa B.

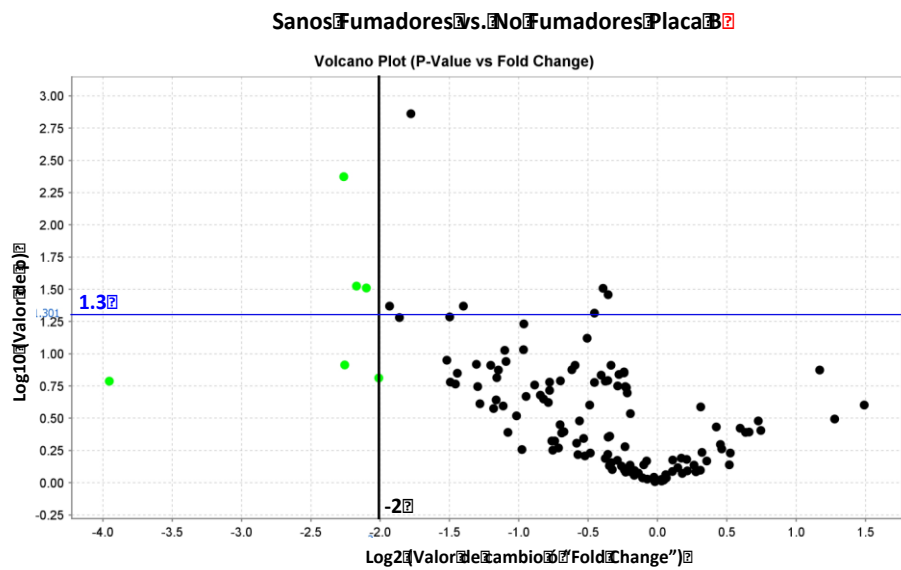
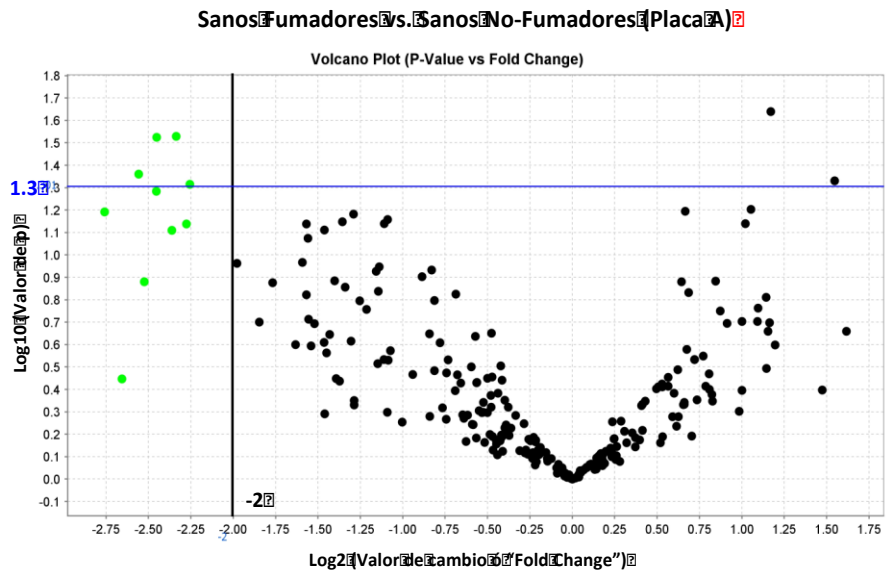


Figura VII. Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en los individuos sanos fumadores (**S-Fu**) comparados con los individuos sanos no-fumadores (**S-NFu**) mediante PCR-Array (Placa A y Placa B). El eje de la “Y” representa el valor de “p” en el sistema logarítmico. El eje “X” muestra los valores de cambio en el sistema logarítmico (log₂). Los puntos de los valores de corte se muestran con una línea azul horizontal ($p \leq 0.05$), y el del valor de cambio como dos líneas negras verticales (valor de cambio ≥ 4). En el cuadrante superior del lado izquierdo se encuentran los miRNA sub-expresados en S-Fu (verde).

La **tabla 3** muestra la identidad del total de los miRNAs diferencialmente expresados en los S-Fu comparados con los S-NFu. Siete miRNAs se encontraron sub-expresados en S-Fu comparados con S-NFu.

Tabla 3. MicroRNAs diferencialmente presentes en Sanos Fumadores (S-Fu) vs. Sanos No-Fumadores (S-NFu)		
MicroRNA	Valor de p	Valor de cambio "Fold Change" (Log2)
hsa-miR-130b-3p	0.044	-2.56
hsa-miR-411-5p	0.03	-2.45
<i>hsa-miR-134-5p</i>	0.03	-2.34
hsa-miR-142-5p	0.048	-2.26
hsa-miR-645	0.004	-2.26
hsa-miR-1285-3p	0.03	-2.17
hsa-miR-661	0.031	-2.10

Valores de corte: $p \leq 0.05$ y valor de cambio ≥ 4 ($\log_2 \geq 2$)

7.2.3) MicroRNAs diferencialmente expresados en pacientes con adenocarcinoma no-fumadores (AD-NFu) versus Sanos no-fumadores (S-NFu).

Para identificar los miRNAs cuya expresión se altere debido a la presencia del cáncer pulmonar (AD) en pacientes que nunca hayan fumado, se analizó el nivel de expresión de los miRNAs en pacientes con adenocarcinoma pulmonar no fumadores comparados con individuos sanos no fumadores como control.

La **figura VIII** muestra una gráfica "de volcán" que representa los miRNAs detectados en **AD-Fu** comparados con **S-NFu** en la placa A y placa B, respectivamente.

En este análisis se encontraron 35 miRNAs sobre-expresados y 3 miRNAs sub-expresados totales en AD-NFu comparado con S-NFu, los cuales se muestran en la **tabla 4**.

7.2.4) MicroRNAs diferencialmente expresados en pacientes con adenocarcinoma fumadores (AD-Fu) versus Sanos fumadores (S-Fu).

Para identificar los miRNAs cuya expresión se altere debido a la presencia del cáncer pulmonar (AD) en pacientes fumadores, se analizó el nivel de expresión de los miRNAs en pacientes con adenocarcinoma pulmonar fumadores comparados con individuos sanos fumadores como control.

La **figura IX** muestra una gráfica “de volcán” que representa los miRNAs detectados en **AD-Fu** comparados con **S-Fu** en la placa A y placa B, respectivamente. Se identificaron 36 miRNAs sobre-expresados y 3 miRNAs sub-expresados totales en AD-Fu comparado con S-Fu, los cuales se muestran en la **tabla 5**.

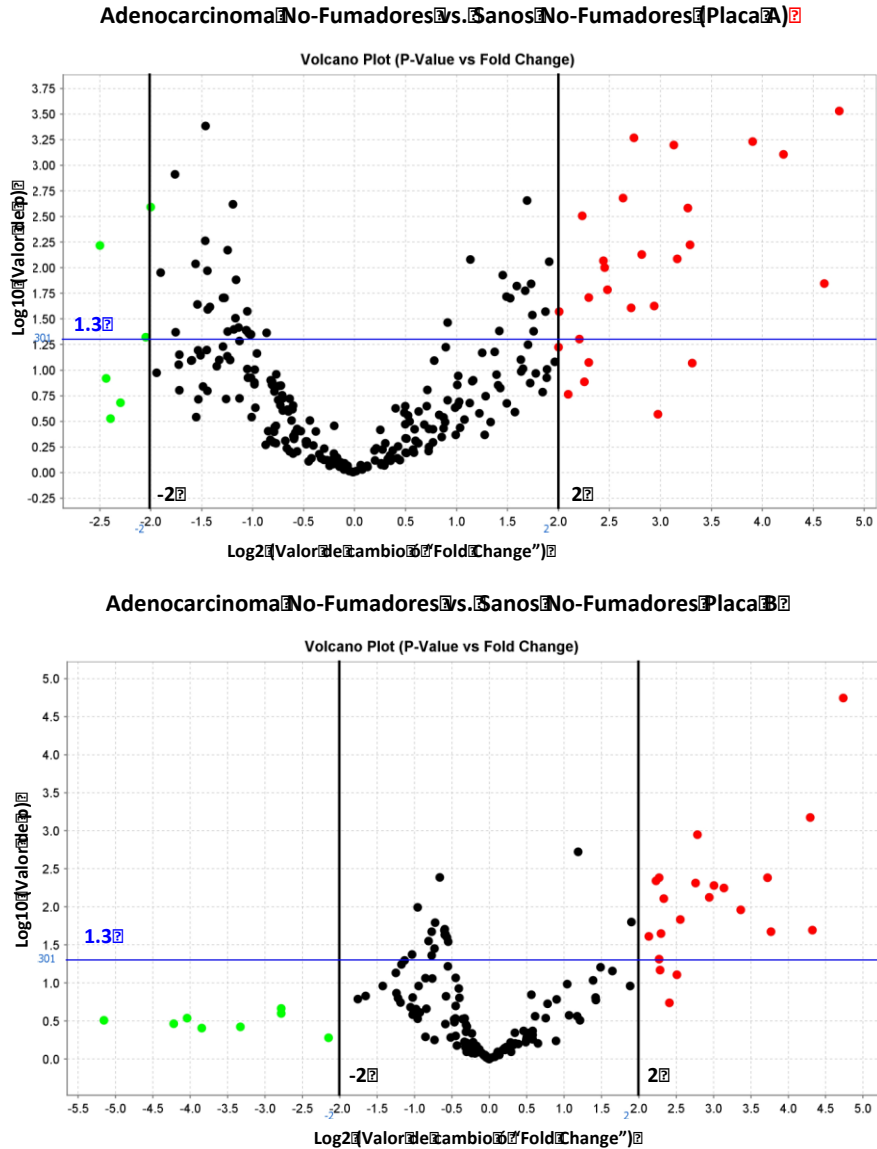


Figura VIII. Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en pacientes con adenocarcinoma pulmonar no-fumadores (**AD-NFu**) comparados con los individuos sanos no-fumadores (**S-NFu**) mediante PCR-Array (Placa A y Placa B). El eje de la “Y” representa el valor de “p” en el sistema logarítmico. El eje “X” muestra los valores de cambio (\log_2). Los puntos de los valores de corte se muestran con una línea azul horizontal ($p \leq 0.05$), y el del valor de cambio como dos líneas negras verticales (valor de cambio ≥ 4). En el cuadrante superior de la derecha se encuentran los miRNA sobre-expresados en AD (rojos). En el cuadrante superior del lado izquierdo se encuentran los miRNA sub-expresados en S-Fu (verde).

Tabla 4. MiRNAs diferencialmente detectados en suero de pacientes con Adenocarcinoma No-Fumadores (AD-NFu) vs. Sanos No-Fumadores (S-NFu).

MicroRNA	Valor de p	Valor de cambio "Fold Change" (Log2)
hsa-miR-210-3p	0	4.75
hsa-miR-660-5p	0.014	4.61
hsa-miR-663b	0.02	4.32
hsa-miR-629-3p	0.001	4.29
hsa-miR-532-5p	0.001	3.90
hsa-miR-106b-3p	0.021	3.77
hsa-miR-942-5p	0.004	3.72
hsa-miR-93-3p	0.011	3.36
hsa-miR-361-5p	0.006	3.29
hsa-miR-324-3p	0.003	3.27
hsa-miR-193a-5p	0.008	3.17
hsa-miR-7-1-3p	0.006	3.14
hsa-miR-25-3p	0.001	3.13
hsa-miR-30a-5p	0.005	3.01
hsa-miR-27a-5p	0.007	2.94
hsa-miR-200c-3p	0.024	2.94
hsa-miR-365a-3p	0.007	2.82
hsa-miR-1291	0.001	2.78
hsa-miR-30d-5p	0.005	2.76
hsa-miR-133a-3p	0.001	2.74
hsa-miR-143-3p	0.025	2.71
<i>hsa-miR-451a</i>	0.002	2.63
hsa-miR-769-5p	0.015	2.56
hsa-miR-642a-5p	0.016	2.48
hsa-miR-16-5p	0.01	2.45
hsa-miR-486-5p	0.009	2.44
hsa-miR-223-5p	0.008	2.34
hsa-miR-505-5p	0.022	2.30
hsa-miR-195-5p	0.02	2.30
hsa-miR-34a-3p	0.049	2.27
hsa-miR-345-5p	0.003	2.23
hsa-miR-320b	0.005	2.23
hsa-miR-423-5p	0.05	2.21
hsa-miR-628-3p	0.024	2.13
hsa-miR-223-3p	0.027	2.01
hsa-miR-517a-3p	0.003	-2.00
hsa-miR-654-3p	0.048	-2.05
hsa-miR-411-5p	0.006	-2.50

Valores de corte: $p \leq 0.05$ y valor de cambio ≥ 4 ($\log_2 \geq 2$)

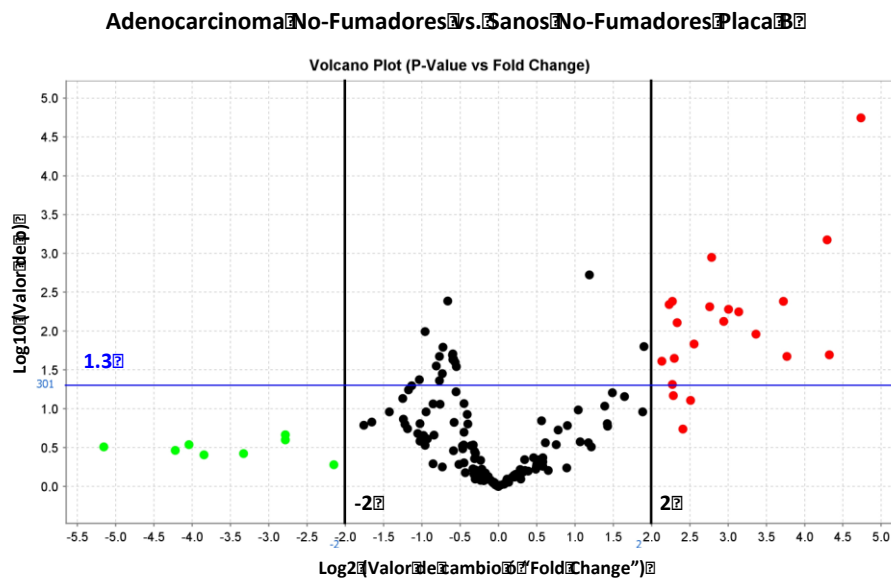
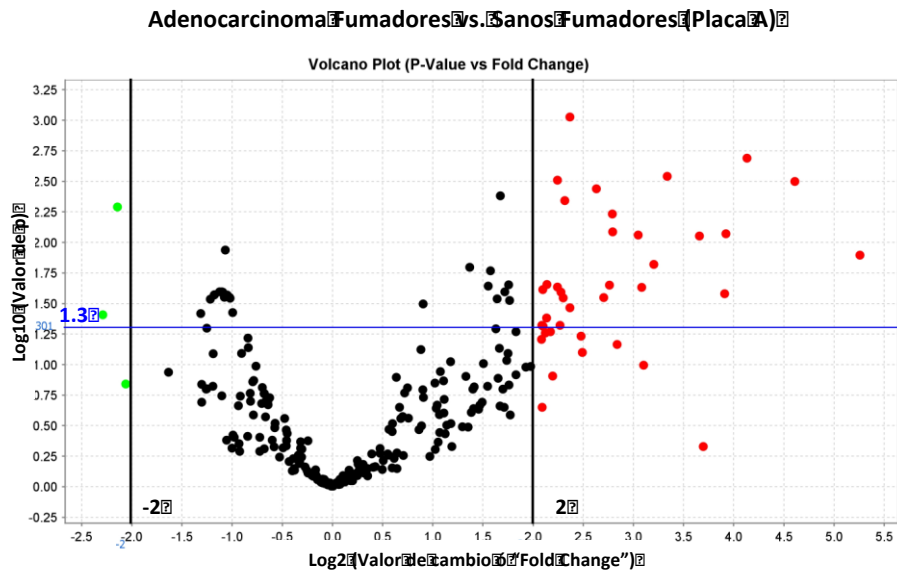


Figura IX. Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar fumadores (**AD-Fu**) comparados con los individuos sanos fumadores (**S-Fu**) mediante PCR-Array (Placa A y Placa B). El eje de la “Y” representa el valor de “p” en el sistema logarítmico. El eje “X” muestra los valores de cambio (log₂). Los puntos de los valores de corte se muestran con una línea azul horizontal ($p \leq 0.05$), y el del valor de cambio como dos líneas negras verticales (valor de cambio ≥ 4). En el cuadrante superior de la derecha se encuentran los miRNA sobre-expresados en AD (rojos). En el cuadrante superior del lado izquierdo se encuentran los miRNA sub-expresados en S-Fu (verde).

Tabla 5. MicroRNAs diferencialmente detectados en suero de pacientes con Adenocarcinoma Fumadores (AD-Fu) vs. Sanos Fumadores (S-Fu)

MicroRNA	Valor de p	Valor de cambio "Fold Change" (Log2)
hsa-miR-193a-5p	0.013	5.26
hsa-miR-200c-3p	0.003	4.61
hsa-miR-210-3p	0.002	4.13
hsa-miR-130b-3p	0.008	3.92
hsa-miR-660-5p	0.026	3.91
hsa-miR-532-5p	0.009	3.66
hsa-miR-200b-3p	0.003	3.34
hsa-miR-223-5p	0.042	3.28
hsa-miR-939-5p	0.036	3.26
hsa-miR-661	0	3.26
hsa-miR-365a-3p	0.023	3.08
hsa-miR-25-3p	0.009	3.05
<i>hsa-miR-451a</i>	0.008	2.79
hsa-miR-423-5p	0.006	2.79
hsa-miR-31-5p	0.022	2.76
hsa-miR-1291	0.018	2.75
hsa-miR-195-5p	0.028	2.70
hsa-miR-486-5p	0.004	2.63
hsa-miR-942-5p	0.019	2.55
hsa-miR-1303	0.005	2.54
hsa-miR-30d-5p	0.023	2.46
hsa-miR-29c-3p	0.001	2.37
hsa-miR-212-3p	0.034	2.37
hsa-miR-296-5p	0.005	2.32
hsa-miR-1180-3p	0.016	2.31
hsa-miR-324-3p	0.028	2.30
hsa-miR-125a-3p	0.026	2.28
hsa-miR-629-5p	0.048	2.27
hsa-miR-1285-3p	0.01	2.27
hsa-miR-345-5p	0.003	2.24
<i>hsa-miR-93-5p</i>	0.023	2.24
hsa-miR-30a-5p	0.05	2.15
hsa-miR-422a	0.022	2.14
hsa-miR-597-5p	0.042	2.13
<i>hsa-miR-140-5p</i>	0.049	2.10
<i>hsa-miR-134-5p</i>	0.048	2.09
hsa-miR-489-3p	0.005	-2.15
hsa-miR-518f-3p	0.039	-2.29
hsa-miR-148b-5p	0.027	-2.31

Valores de corte: p≤0.05 y valor de cambio ≥ 4 (log2 ≥ 2)

7.2.5) MicroRNAs diferencialmente expresados en pacientes con adenocarcinoma (AD) versus individuos sanos (S).

Para identificar los miRNAs cuya expresión se altere debido a la presencia del cáncer pulmonar (AD), sin considerar al tabaquismo como un factor en el análisis, se analizó el nivel de expresión de los miRNAs en pacientes con adenocarcinoma

pulmonar totales (fumadores y no fumadores) comparados con individuos sanos totales (fumadores y no fumadores) como control.

La **figura X** muestra una gráfica “de volcán” que representa los miRNAs detectados en **AD** comparados con **S** en la placa A y placa B, respectivamente. Los resultados mostraron 43 miRNAs sobre-expresados y 1 miRNA sub-expresado totales en AD comparado con S, los cuales se muestran en la **tabla 6**.

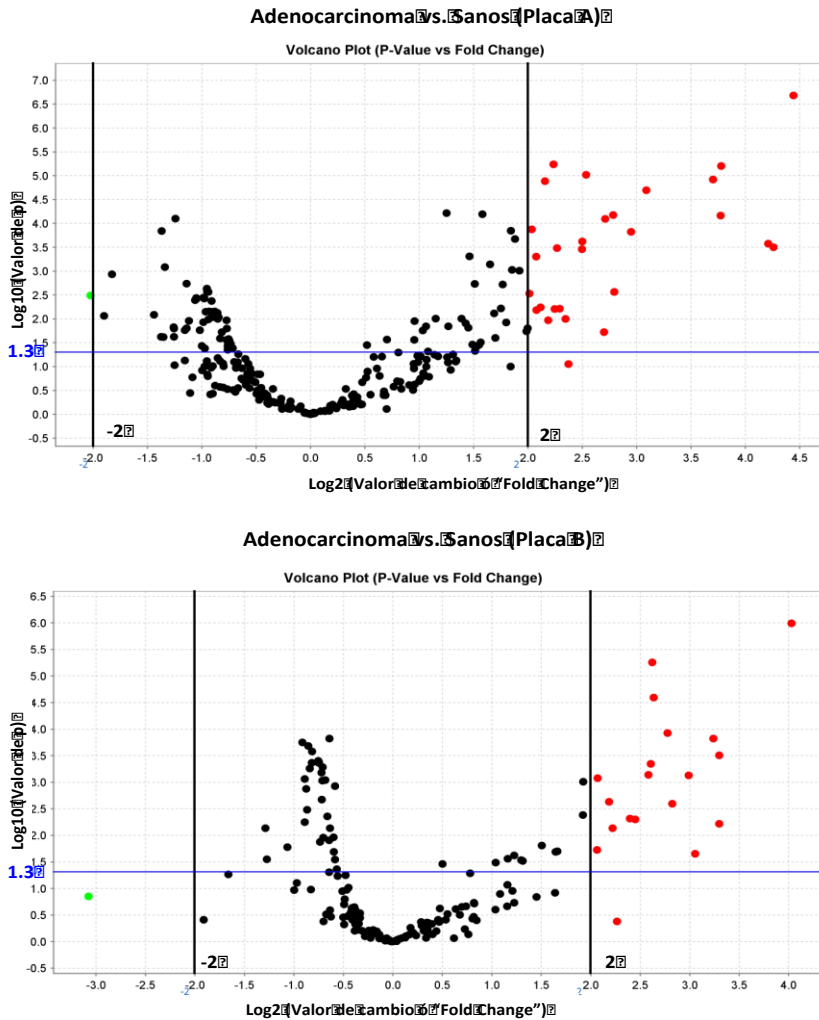


Figura X. Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar (**AD**) comparados con los individuos sanos (**S**) mediante PCR-Array (Placa A y B). El eje de la “Y” representa el valor de “p” en el sistema logarítmico. El eje “X” muestra los valores de cambio (log2). Los puntos de los valores de corte se muestran con una línea azul horizontal ($p \leq 0.05$), y el del valor de cambio como dos líneas negras

verticales (valor de cambio ≥ 4). En el cuadrante superior de la derecha se encuentran los miRNA sobre-expresados en AD (rojos).

Tabla 6. MicroRNAs diferencialmente detectados en suero de pacientes con Adenocarcinoma (AD) vs. Individuos Sanos (S)(todos).

MicroRNA	Valor de p	Valor de cambio "Fold Change" (Log2)
hsa-miR-210-3p	0	4.44
hsa-miR-660-5p	0	4.26
hsa-miR-193a-5p	0	4.21
hsa-miR-532-5p	0	3.78
hsa-miR-200c-3p	0	3.77
hsa-miR-661	0	3.30
hsa-miR-106b-3p	0.006	3.30
hsa-miR-942-5p	0	3.24
hsa-miR-25-3p	0	3.09
hsa-miR-663b	0.022	3.05
hsa-miR-629-3p	0.001	2.99
hsa-miR-365a-3p	0	2.95
hsa-miR-223-5p	0.003	2.82
hsa-miR-200b-3p	0.003	2.80
hsa-miR-324-3p	0	2.78
hsa-miR-1291	0	2.78
<i>hsa-miR-451a</i>	0	2.71
hsa-miR-486-3p	0.019	2.70
hsa-miR-27a-5p	0	2.63
hsa-miR-30d-5p	0	2.61
hsa-miR-30a-5p	0.001	2.58
hsa-miR-486-5p	0	2.53
hsa-miR-195-5p	0	2.50
hsa-miR-423-5p	0	2.50
hsa-miR-939-5p	0.005	2.45
rno-miR-7-1-3p	0.005	2.40
hsa-miR-130b-3p	0.01	2.35
hsa-miR-361-5p	0.006	2.29
hsa-miR-16-5p	0	2.27
hsa-miR-132-3p	0.006	2.25
hsa-miR-345-5p	0	2.24
hsa-miR-1180-3p	0.007	2.22
hsa-miR-324-5p	0.011	2.19
hsa-miR-93-3p	0.002	2.18
hsa-miR-133a-3p	0	2.16
hsa-miR-185-5p	0.006	2.12
hsa-miR-629-5p	0.007	2.08
<i>hsa-miR-93-5p</i>	0	2.08
hsa-miR-320b	0.001	2.07
hsa-miR-769-5p	0.019	2.06
hsa-miR-29c-3p	0	2.03
hsa-miR-642a-5p	0.003	2.01
hsa-miR-148a-3p	0.016	2.00
hsa-miR-518f-3f	0.003	-2.02

Valores de corte: $p \leq 0.05$ y valor de cambio ≥ 4 ($\log_2 \geq 2$)

7.2.6) Análisis comparativo entre los miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de estudio de individuos sanos fumadores y adenocarcinoma fumadores.

Para analizar si existen miRNAs alterados en los individuos fumadores sanos que sean comunes a los miRNAs encontrados en los pacientes con adenocarcinoma fumadores, se realizaron diagramas de Venn (Figura 6). Lo anterior con el propósito de identificar si los miRNAs cuya alteración se asocia al fumar en individuos sanos, podrían aparecer alterados también en pacientes con AD fumadores comparados con los fumadores sanos. El análisis de la figura 6 muestra la comparación de los miRNAs sub-expresados en el grupo de estudio S-Fu vs. S-NFu (todos los miRNAs) con los miRNAs encontrados sub-expresados en el grupo de estudio AD-Fu vs. S-Fu (tres miRNAs). Los datos mostraron que no hay miRNAs en común.

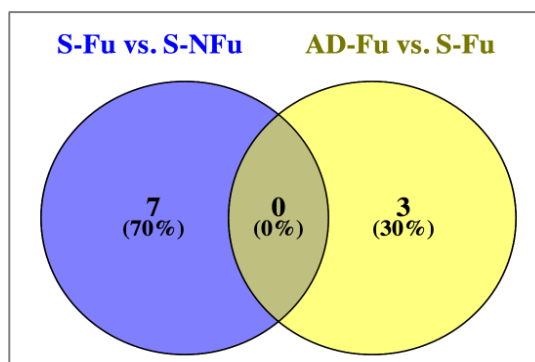


Figura XI. Diagrama de Venn donde se comparan los miRNAs diferencialmente expresados (sub-expresados) en los grupos de estudio de adenocarcinoma: S-Fu vs. S-NFu y AD-Fu vs. S-Fu.

7.2.7) Análisis comparativo entre los miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de estudio pacientes con adenocarcinoma fumadores y no-fumadores.

Para analizar si existen miRNAs alterados comunes en los grupos de estudios de pacientes con adenocarcinoma que nunca fumaron, los pacientes con adenocarcinoma fumadores y el grupo de pacientes con adenocarcinoma totales (que incluye tanto fumadores como no fumadores), se realizaron diagramas de Venn (Figura XI).

Lo anterior para identificar cuáles miRNAs alterados pueden ser detectados en todos los grupos de pacientes sin importar si el análisis incluye fumadores, no fumadores o todos, o bien si existen miRNAs alterados que sólo puedan detectarse como alterados si el análisis incluye sólo a fumadores o sólo a no fumadores.

La **Figura XII** muestra el análisis comparativo de los miRNAs sobre-expresados y sub-expresados encontrados en los grupos de estudio de adenocarcinomas: AD-NFu vs. S-NFu, AD-Fu vs. S-Fu y AD vs. S. Este análisis mostró 18 miRNAs sobre-expresados comunes en los tres grupos de estudio, 11 miRNAs comunes en dos grupos de estudio de no fumadores (AD-NFu vs. S-NFu), ocho miRNAs comunes en los grupos de estudio de fumadores (AD-Fu vs. S-Fu); mientras que se encontraron seis miRNAs exclusivos del grupo de estudio AD-NFu vs. S-NFu y 10 miRNAs exclusivos en el grupo de estudio AD-Fu vs. S-Fu (**Tabla 7**). No se encontraron miRNAs sub-expresados comunes en el análisis comparativo.

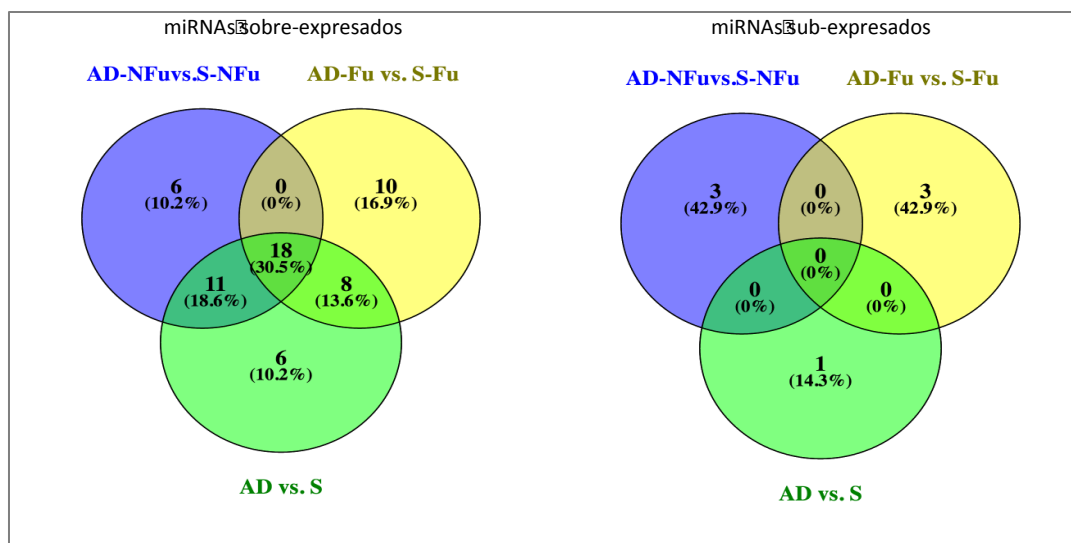


Figura XII. Diagrama de Venn donde se comparan los miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de estudio de adenocarcinoma: ADFu vs. SFu, ADN Fu vs. SNF y AD vs. S.

Tabla 7. Análisis comparativo entre los miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de estudio: pacientes con adenocarcinoma fumadores y no-fumadores.

MiRNAs comunes en los grupos de estudio AD-NFu vs. S-NFu, AD-Fu vs. S-Fu y "AD vs. S"	MiRNAs exclusivos del grupo de estudio AD-NFu vs. S-NFu	MiRNAs exclusivos del grupo de estudio AD-Fu vs. S-Fu
SOBRE-EXPRESADOS hsa-miR-210-3p hsa-miR-660-5p hsa-miR-532-5p hsa-miR-942-5p hsa-miR-324-3p hsa-miR-193a-5p hsa-miR-25-3p hsa-miR-30a-5p hsa-miR-200c-3p hsa-miR-365a-3p hsa-miR-1291 hsa-miR-30d-5p hsa-miR-451a hsa-miR-486-5p hsa-miR-223-5p hsa-miR-195-5p hsa-miR-345-5p hsa-miR-423-5p	SOBRE-EXPRESADOS hsa-miR-7-1-3p hsa-miR-143-3p hsa-miR-505-5p hsa-miR-34a-3p hsa-miR-628-3p hsa-miR-223-3p	SOBRE-EXPRESADOS hsa-miR-31-5p hsa-miR-1303 hsa-miR-212-3p hsa-miR-296-5p hsa-miR-125a-3p hsa-miR-1285-3p hsa-miR-422a hsa-miR-597-5p hsa-miR-140-5p hsa-miR-134-5p
SUB-EXPRESADOS NINGUNO	SUB-EXPRESADOS hsa-miR-517a-3p hsa-miR-654-3p hsa-miR-411-5p	SUB-EXPRESADOS hsa-miR-489-3p hsa-miR-518f-3p hsa-miR-148b-5p

Análisis mediante diagramas de Venn (Figura 7). La tabla muestra los miRNAs sobre-expresados.

7.3 ASOCIACION PREDICTIVA DE LOS miRNAs CON PROCESOS DE CARCINOGENESIS

Para determinar la posible relevancia biológica de los miRNAs identificados en este estudio, se realizó el análisis de predicción de los genes blanco de los miRNAs de interés y se analizó en cuáles vías de señalización se encuentra asociados estadísticamente tales genes blanco (llamado también enriquecimiento de vías de señalización) mediante el MiRsystem, como se indica en Material y Métodos. Debido a que nuestro interés particular es conocer si los miRNAs identificados regulan genes blancos involucrados en mecanismos de carcinogénesis, se identificaron cuáles miRNAs se asocian con la vía "PATHWAYS IN CANCER", la cual involucra las vías de señalización conocidas asociadas al cáncer.

7.3.1) miRNAs alterados en individuos aparentemente sanos fumadores y su asociación predictiva a carcinogénesis

Primero se analizaron los miRNAs asociados al tabaquismo, es decir, los miRNAs alterados en Sanos Fumadores. Los resultados mostraron que tres de los miRNAs sub-expresados en Sanos Fumadores presentan una asociación estadística con "PATHWAYS IN CANCER" (hsa-miR-130b, hsa-miR-411-5p, y hsa-miR-142-5p) (Tabla 8).

Tabla 8. Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en Sanos Fumadores (S-Fu) vs. Sanos No-Fumadores (S-NFu) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.

MicroRNA	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" (KEGG)	Valor de p (asociación)	No. miRNAs ("Si")
hsa-miR-130b-3p	Si	1.70E-04	1
hsa-miR-411-5p	Si	1.65E-04	2
hsa-miR-134-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-142-5p	Si	2.61E-06	3
hsa-miR-645	No	> 0.01	
hsa-miR-1285-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-661	No	> 0.01	

Análisis: MirSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>). Vías de señalización: enciclopedia de base de datos Kyoto para genes y genomas (KEGG). MiRNAs en verde = sub-expresados.

7.3.2) miRNAs alterados en AD-NFu vs. S-NFu y su asociación predictiva a carcinogénesis

Posteriormente se analizaron los miRNAs asociados al diagnóstico del cáncer pulmonar (AD). Los resultados mostraron que en el grupo de estudio AD-NFu vs. S-NFu, 16 miRNAs sobre-expresados presentan una asociación estadística con "PATHWAYS IN CANCER" (Tabla 9).

Tabla 9. Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma No-Fumadores (AD-NFu) vs. Sanos No-Fumadores (S-NFu) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.

MicroRNA	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" (KEGG)	Valor de p (asociación)	No. miRNAs ("Si")
hsa-miR-210-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-660-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-663b	No	> 0.01	
hsa-miR-629-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-532-5p	Si	5.97E-03	1
hsa-miR-106b-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-942-5p	Si	3.18E-05	2
hsa-miR-93-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-361-5p	Si	3.84E-04	3
hsa-miR-324-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-193a-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-7-1-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-25-3p	Si	3.08E-03	4
hsa-miR-30a-5p	Si	5.31E-03	5
hsa-miR-27a-5p	No	NINGUNO	
hsa-miR-200c-3p	Si	5.65E-08	6
hsa-miR-365a-3p	Si	6.49E-06	7
hsa-miR-1291	No	NINGUNO	
hsa-miR-30d-5p	Si	4.65E-03	8
hsa-miR-133a-3p	Si	1.80E-04	9
hsa-miR-143-3p	Si	2.67E-03	10
<i>hsa-miR-451a</i>	No	> 0.01	
hsa-miR-769-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-642a-5p	No	1.96E-03	
hsa-miR-16-5p	Si	2.25E-10	11
hsa-miR-486-5p	Si	8.68E-04	12
hsa-miR-223-5p	No	NINGUNO	
hsa-miR-505-5p	No	NINGUNO	
hsa-miR-195-5p	Si	1.08E-09	13
hsa-miR-34a-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-345-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-320b	Si	8.73E-03	14
hsa-miR-423-5p	No	5.14E-03	
hsa-miR-628-3p	Si	5.44E-04	15
hsa-miR-223-3p	Si	8.20E-04	16
hsa-miR-517a-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-654-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-411-5p	No	1.65E-04	

Análisis: MirSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>). Vías de señalización: enciclopedia de base de datos Kyoto para genes y genomas (KEGG). MiRNAs en verde = sub-expresados.

7.3.3) miRNAs alterados en AD-Fu vs. S-Fu y su asociación predictiva a carcinogénesis

En el grupo de estudio de AD-Fu vs. S-Fu se identificaron 15 miRNAs sobreexpresados asociados estadísticamente a "PATHWAYS IN CANCER" (Tabla 10).

Tabla 10. Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma Fumadores (AD-Fu) vs. Sanos Fumadores (S-Fu) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.

MicroRNA	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" (KEGG)	Valor de p (asociación)	No. miRNAs ("Si")
hsa-miR-193a-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-200c-3p	Si	5.65E-08	1
hsa-miR-210-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-130b-3p	Si	1.70E-04	2
hsa-miR-660-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-532-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-200b-3p	Si	4.99E-08	3
hsa-miR-223-5p	No	NINGUNO	
hsa-miR-939-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-661	No	> 0.01	
hsa-miR-365a-3p	Si	6.49E-06	4
hsa-miR-25-3p	Si	3.08E-03	5
<i>hsa-miR-451a</i>	No	> 0.01	
hsa-miR-423-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-31-5p	Si	1.00E-03	6
hsa-miR-1291	No	NINGUNO	
hsa-miR-195-5p	Si	1.08E-09	7
hsa-miR-486-5p	Si	8.68E-04	8
hsa-miR-942-5p	Si	3.18E-05	9
hsa-miR-1303	No	NINGUNO	
hsa-miR-30d-5p	Si	4.65E-03	10
hsa-miR-29c-3p	Si	2.24E-08	11
hsa-miR-212-3p	Si	5.36E-05	12
hsa-miR-296-5p	No	3.60E-04	
hsa-miR-1180-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-324-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-125a-3p	No	5.66E-03	
hsa-miR-629-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-1285-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-345-5p	No	> 0.01	
<i>hsa-miR-93-5p</i>	No	NINGUNO	
hsa-miR-30a-5p	Si	5.31E-03	13
hsa-miR-422a	Si	6.15E-04	14
hsa-miR-597-5p	No	> 0.01	
<i>hsa-miR-140-5p</i>	Si	5.92E-04	15
<i>hsa-miR-134-5p</i>	No	> 0.01	
hsa-miR-489-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-518f-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-148b-5p	No	NINGUNO	

Análisis: MirSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>). Vías de señalización: enciclopedia de base de datos Kyoto para genes y genomas (KEGG). MiRNAs en verde = sub-expresados.

7.3.4) miRNAs alterados en AD vs. S y su asociación predictiva a carcinogénesis

En el grupo de estudio de AD vs. S se identificaron 23 miRNAs sobre-expresados asociados estadísticamente a "PATHWAYS IN CANCER" (Tabla 11).

Tabla 11. Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma (AD) vs. Sanos (S) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.

MicroRNA	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" (KEGG)	Valor de p (asociación)	No. miRNAs ("Si")
hsa-miR-210-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-660-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-193a-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-532-5p	Si	5.97E-03	1
hsa-miR-200c-3p	Si	5.65E-08	2
hsa-miR-661	No	> 0.01	
hsa-miR-106b-3p	No		
hsa-miR-942-5p	Si	3.18E-05	3
hsa-miR-25-3p	Si	3.08E-03	4
hsa-miR-663b	No	> 0.01	
hsa-miR-629-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-365a-3p	Si	6.49E-06	5
hsa-miR-223-5p	No	NINGUNO	
hsa-miR-200b-3p	Si	4.99E-08	6
hsa-miR-324-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-1291	No	NINGUNO	
<i>hsa-miR-451a</i>	No	> 0.01	
hsa-miR-486-3p	No	> 0.01	
hsa-miR-27a-5p	No	NINGUNO	
hsa-miR-30d-5p	Si	4.65E-03	7
hsa-miR-30a-5p	Si	5.31E-03	8
hsa-miR-486-5p	Si	8.68E-04	9
hsa-miR-195-5p	Si	1.08E-09	10
hsa-miR-423-5p	Si	5.14E-03	11
hsa-miR-939-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-7-1-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-130b-3p	Si	1.70E-04	12
hsa-miR-361-5p	Si	3.84E-04	13
hsa-miR-16-5p	Si	2.25E-10	14
hsa-miR-132-3p	Si	2.27E-05	15
hsa-miR-345-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-1180-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-324-5p	Si	5.87E-03	16
hsa-miR-93-3p	No	NINGUNO	
hsa-miR-133a-3p	Si	1.80E-04	17
hsa-miR-185-5p	Si	9.18E-04	18
hsa-miR-629-5p	No	> 0.01	
<i>hsa-miR-93-5p</i>	Si	2.57E-07	19
hsa-miR-320b	Si	8.73E-03	20
hsa-miR-769-5p	No	> 0.01	
hsa-miR-29c-3p	Si	2.24E-08	21
hsa-miR-642a-5p	Si	1.96E-03	22
hsa-miR-148a-3p	Si	3.11E-08	23
hsa-miR-518f-3p	No	NINGUNO	

Análisis: MirSystem (<http://mirsystem.cgm.ntu.edu.tw/>). Vías de señalización: enciclopedia de base de datos Kyoto para genes y genomas (KEGG). NA= no aplica, no hubo ninguna asociación. MiRNAs en verde = sub-expresados.

7.3.5) miRNAs alterados que son comunes en todos los grupos de estudio de AD o bien exclusivos de AD fumadores o no-fumadores y su asociación predictiva a carcinogénesis

Con respecto a los miRNAs encontrados como comunes en los tres grupos de estudio de AD y los miRNAs hallados como exclusivos en AD no-fumadores y AD fumadores (Tabla 7), se encontró lo siguiente: a) De los 18 miRNAs comunes en los tres grupos de estudio, 9 están asociados predictivamente a “PATHWAYS IN CANCER” (hsa-miR-532-5p, hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-942-5p, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-365a-3p, hsa-miR-30d-5p, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-195-5p, hsa-miR-423-5p). b) De los nueve miRNAs exclusivos en AD-NFu, tres están asociados a “PATHWAYS IN CANCER” (hsa-miR-143-3p, hsa-miR-628-3p y hsa-miR-223-3p). c) De los 13 miRNAs exclusivos en AD-Fu, cuatro están asociados a “PATHWAYS IN CANCER” (hsa-miR-31-5p, hsa-miR-212-3p, hsa-miR-422a y hsa-miR-140-5p) (Figura 8).

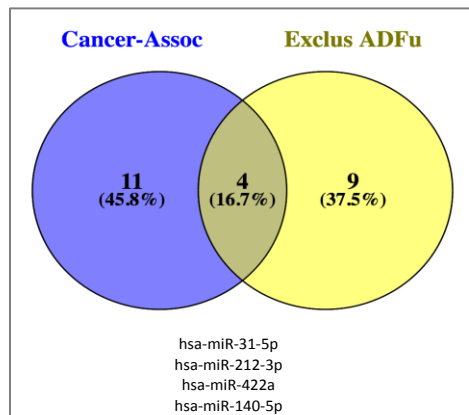


Figura XIII. Diagrama de Venn donde se comparan los miRNAs alterados en el grupo de estudio AD-Fu vs. S-Fu que se asocian a “PATHWAYS IN CANCER” y los que son detectados exclusivamente en ese grupo.

7.4 IDENTIFICACION DE LOS miRNAs ASOCIADOS AL TABAQUISMO Y AL DIAGNOSTICO DEL CANCER PULMONAR.

Los resultados reportados en las secciones anteriores nos permiten identificar los miRNAs cuya expresión alterada se asocia al tabaquismo y aquéllos miRNAs cuya expresión alterada se asocia al diagnóstico del cáncer pulmonar.

En el primer caso, la tabla 3 señala los 7 miRNAs sub-expresados en individuos sanos fumadores. Esta sub-expresión puede asociarse al tabaquismo únicamente, ya que los individuos no presentan ninguna enfermedad aparente.

Los miRNAs cuya expresión alterada puede asociarse a la presencia del adenocarcinoma se muestran en las tablas 4, 5 y 6. Los datos indicaron que la identidad de los mismos varía dependiendo de que se incluya en el análisis a pacientes fumadores o no-fumadores, indicando la relevancia de la determinación de este factor de riesgo en el análisis. Los resultados también señalaron que 18 miRNAs son identificados como alterados en los tres análisis (Tabla 7), mientras que 9 miRNAs y 13 miRNAs se detectaron como alterados exclusivamente en el análisis de AD no fumadores y AD fumadores respectivamente (Tabla 7).

7.5 miRNAs ASOCIADOS PATHWAYS IN CANCER Y SUS BLANCOS PREDICTIVOS.

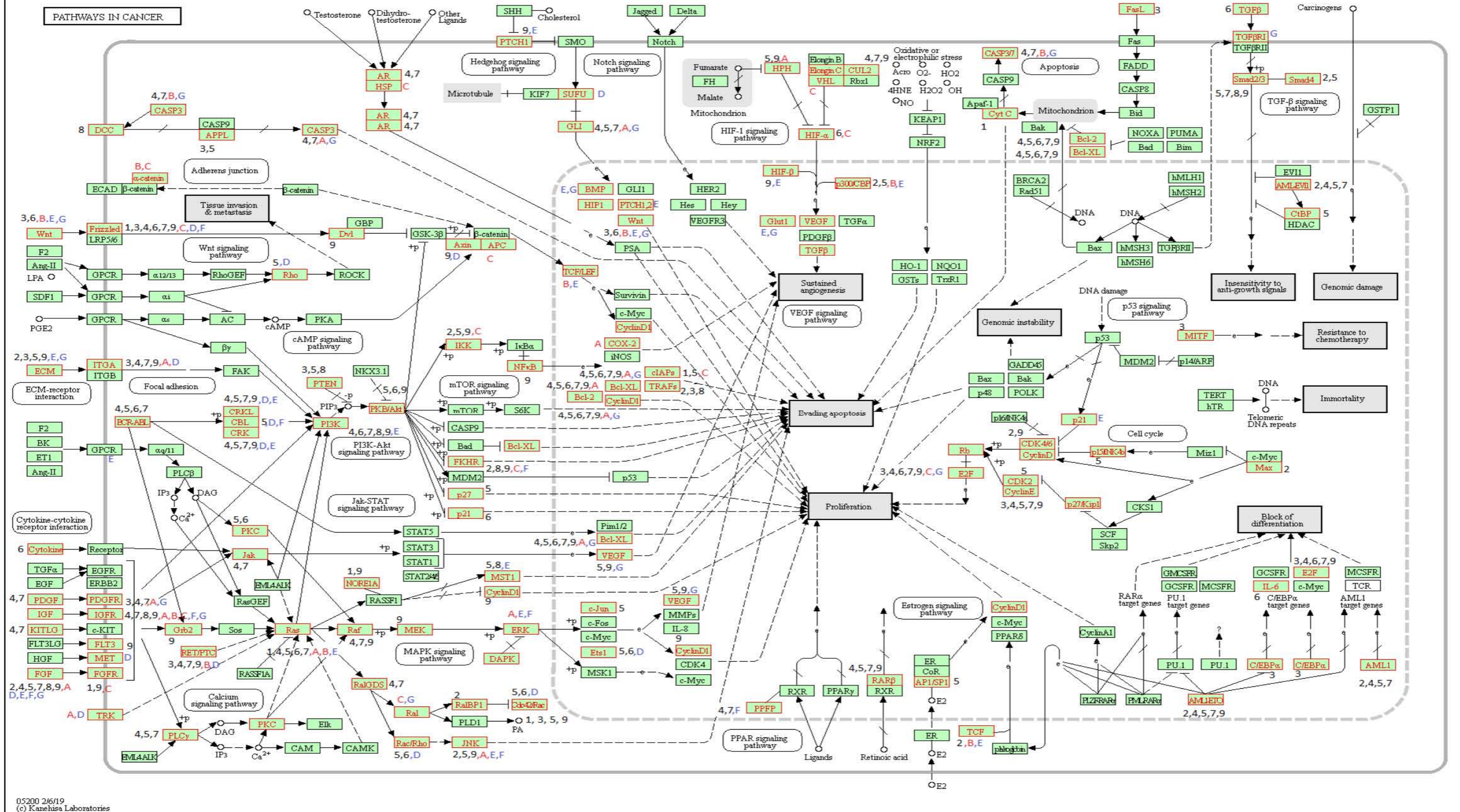
En la tabla 12 y en la figura XIV se observan los miRNAs comunes en los grupos de estudio asociados a cáncer ("Pathways in cancer") y los genes blanco a los que están asociados. Solo se consideraron aquéllos cuyo valor de asociación predictiva con su gen blanco fuera de $p \leq 0.05$.

Hubo 9 miRNAs comunes asociados a cáncer en los tres grupos de estudio "AD-Nfu vs. S-Nfu", "AD-Fu vs. S-Fu", y "AD vs. S", en el grupo "AD-NFu vs. S-NFu" hubo 3 miRNAs y en el grupo de "AD-Fu vs. S-Fu" hubo 4 miRNAs asociados a cáncer.

También se muestra en la figura XV . las Redes *interactome* construidas por medio de Cytoscape v3.1.0 para visualizar las redes de las interacciones de los miRNAs comunes asociados a cáncer en los "tres grupos de estudio AD-Nfu vs. S-Nfu", "AD-Fu vs. S-Fu", y "AD vs. S" y sus genes blanco.

Tabla 12. La tabla muestra los miRNAs identificados en la Tabla 7 que están asociados a "pathways in cancer" y sus blancos predictivos.

MiRNAs comunes en los tres grupos de estudio "AD-Nfu vs. S-Nfu", "AD-Fu vs. S-Fu", y "AD vs. S".	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" KEGG	Valor de P (asociación)	Genes Blanco ("PATHWAYS IN CANCER")
hsa-miR-532-5p	Si	5.97E-03	CYCS, FGFR1, FZD7, KRAS, RASSF5, XIAP
hsa-miR-942-5p	Si	3.18E-05	CDK6, CHUK, CREBBP, FGF1, FGF13, FOXO1, LAMC1, MAPK10, MAX, RALBP1, RUNX1, SMAD4, TCF7L2, TRAF3
hsa-miR-25-3p	Si	3.08E-03	APPL1, CCDC6, CCNE2, CDC42, CEBPA, COL4A6, E2F3, FASLG, FZD10, FZD4, HHIP, ITGA6, ITGAV, MITF, PDGFRA, PIK3R3, PTEN, TRAF3
hsa-miR-30a-5p	Si	5.31E-03	ABL1, AR, BCL2, CASP3, CBLB, CCDC6, CCNE2, CRKL, CUL2, E2F3, FGF5, FZD3, GLI2, IGF1R, ITGA6, JAK1, KITLG, KRAS, PDGFA, PDGFRB, PIK3CD, PIK3R2, PLCG1, RALGDS, RARB, RUNX1, SMAD2
hsa-miR-200c-3p	Si	5.65E-08	AKT2, APPL1, BCL2, CBL, CCNE2, CDC42, CDK2, CDKN1B, CDKN2B, COL4A1, CREBBP, CRKL, CTBP2, E2F3, EGLN1, EGLN3, EP300, ETS1, FGF23, FN1, GLI3, IKBKB, JUN, KRAS, LAMC1, MAPK9, PLCG1, PRKCA, PTEN, RAC1, RHOA, RUNX1, SMAD2, SMAD4, STK4, TCEB1, VEGFA, WNT5A, XIAP
hsa-miR-365a-3p	Si	6.49E-06	AKT3, BCL2, CDKN1A, E2F2, EPAS1, ETS1, FZD5, HHIP, IL6, KRAS, PIK3R3, PRKCB, RAC1, TGFβ3
hsa-miR-30d-5p	Si	4.65E-03	ABL1, AR, BCL2, CASP3, CBLB, CCDC6, CCNE2, CRKL, CUL2, E2F3, FGF5, FZD3, GLI2, IGF1R, ITGA6, JAK1, KITLG, KRAS, PDGFA, PDGFRB, PIK3CD, PIK3R2, PLCG1, RALGDS, RARB, RUNX1, SMAD2
hsa-miR-486-5p	Si	8.68E-04	DCC, FGF13, FOXO1, IGF1, PIK3R1, PTEN, SMAD2, STK4
hsa-miR-195-5p	Si	1.08E-09	AKT3, ARNT, AXIN2, BCL2, BCR, CCDC6, CCND1, CCNE1, CDC42, CDK6, CHUK, CRKL, CUL2, DVL1, E2F3, EGLN2, FGF2, FGF7, FGFR1, FGFR2, FIGF, FLT3, FOXO1, FZD10, GRB2, IGF1R, IKBKB, ITGA2, LAMC1, MAP2K1, MAPK9, NFKB1, PIAS1, PIK3R1, PIK3R3, PTCH1, RAF1, RARB, RASSF5, RET, RUNX1T1, SMAD3, VEGFA, WNT3A, WNT7A
miRNAs exclusivos de "AD-NFu vs. S-NFu"	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" KEGG	Valor de P (asociación)	Genes Blanco ("PATHWAYS IN CANCER")
hsa-miR-143-3p	Si	2.67E-03	BCL2, DAPK1, EGLN1, FGF1, GLI3, IGF1R, ITGA6, MAPK1, KRAS, PDGFRA, PIAS3, PTGS2, TPM3
hsa-miR-628-3p	Si	5.44E-04	CASP3, CCDC6, CREBBP, CTNNA2, HHIP, IGF1R, KRAS, TCF7
hsa-miR-223-3p	Si	8.20E-04	APC, CBLB, CHUK, CTNNA2, E2F1, EPAS1, FGFR2, FOXO1, FZD4, HSP90B1, IGF1R, RALA, VHL, XIAP
miRNAs exclusivos de "AD-Fu vs. S-Fu"	Asociado a "PATHWAYS IN CANCER" KEGG	Valor de P (asociación)	Genes Blanco ("PATHWAYS IN CANCER")
hsa-miR-31-5p	Si	1.00E-03	AXIN1, CBL, CRK, ETS1, FGF5, FGF7, FZD3, FZD4, ITGAV, MET, RAC1, RET, RHOA, SUFU, TPM3
hsa-miR-212-3p	Si	5.36E-05	ARNT, CDKN1A, CRK, EP300, FGF7, HHIP, KRAS, LAMC2, MAPK1, PIK3R1, PIK3R3, PTCH1, RB1, SLC2A1, SMAD2, STK4, TCF7L1, TCF7L2
hsa-miR-422a	Si	6.15E-04	BMP2, CBL, FGF12, FGF7, FOXO1, FZD5, GRB2, IGF1R, MAPK1, PAX8
hsa-miR-140-5p	Si	5.92E-04	BCL2L1, BMP2, CASP3, E2F3, FGF7, FGF9, GLI3, IGF1R, LAMC1, PDGFRA, RALA, SLC2A1, TGFβR1, VEGFA, WNT1



- | | | | |
|-------------------|-------------------|------------------|------------------|
| 1 hsa-miR-532-5p | 6 hsa-miR-365a-3p | A hsa-miR-143-3p | D hsa-miR-31-5p |
| 2 hsa-miR-942-5p | 7 hsa-miR-30d-5p | B hsa-miR-628-3p | E hsa-miR-212-3p |
| 3 hsa-miR-25-3p | 8 hsa-miR-486-5p | C hsa-miR-223-3p | F hsa-miR-422a |
| 4 hsa-miR-30a-5p | 9 hsa-miR-195-5p | | G hsa-miR-140-5p |
| 5 hsa-miR-200c-3p | | | |

Figura XIV. Diagrama de miRNAs asociados a "PATHWAYS IN CANCER" y sus genes blanco.

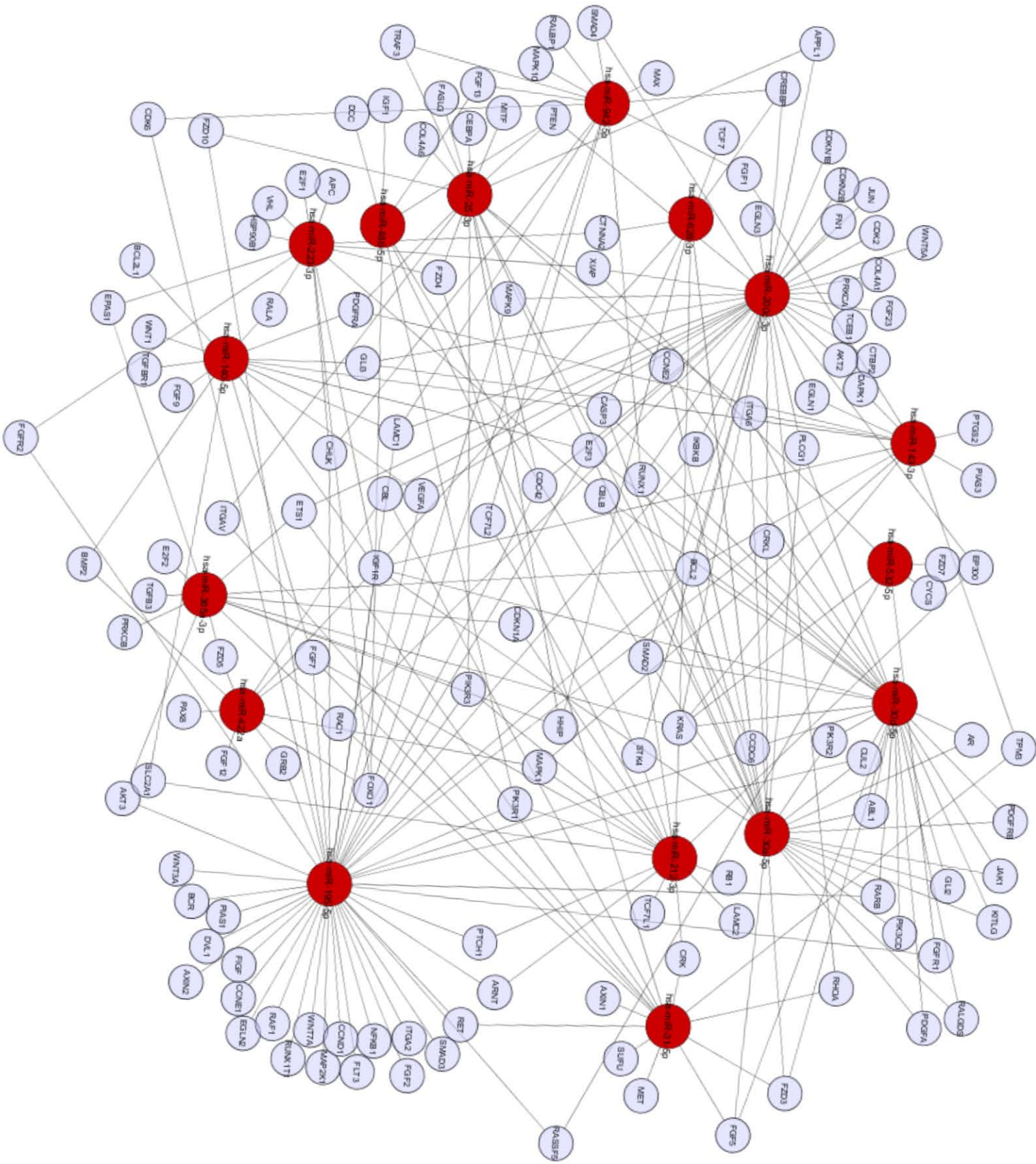


Figura XV. Redes *interactome* construidas para conectar los miRNAs comunes asociados a cáncer en los tres grupos de estudio AD-Nfu vs. S-Nfu", "AD-Fu vs. S-Fu", y "AD vs. S a sus genes blanco.

8 DISCUSION

Los miRNAs han sido señalados como biomarcadores de diagnóstico potenciales en el cáncer pulmonar en varios estudios publicados; en particular, los miRNAs en circulación sanguínea (suero y plasma) son considerados biomarcadores potenciales no-invasivos de esta enfermedad. Sin embargo, siendo el tabaquismo un factor de riesgo relevante en el cáncer pulmonar, es necesario analizar el efecto del mismo en la expresión de los miRNAs circulantes en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico, lo cual no se ha realizado sistemáticamente a la fecha.

El objetivo de este estudio fue identificar aquellos miRNAs cuyos niveles de expresión se asocien al tabaquismo o bien al diagnóstico del cáncer pulmonar, mediante la determinación de los niveles de expresión de miRNAs en el suero de individuos sanos y pacientes con cáncer pulmonar (fumadores y no fumadores).

El primer paso fue seleccionar los individuos sanos y los pacientes con diagnóstico de adenocarcinoma cuyo historial clínico incluyera la exposición al humo de tabaco. Los datos de exposición al humo de tabaco debían de incluir número de cigarrillos fumados por día, años de exposición, edad de inicio y si hubo exposición pasiva al mismo. De esta manera los individuos seleccionados como no-fumadores son sujetos que nunca fumaron y tampoco fueran fumadores pasivos. Los individuos seleccionados como fumadores son fumadores activos con un IT mayor o igual a 10, que es el nivel de exposición que ha sido asociado al diagnóstico de cáncer pulmonar.

Una vez seleccionadas las muestras adecuadas, se seleccionó un método de tamizaje para la determinación cuantitativa de los miRNAs. La prueba de tamizaje elegida (PCR-Array) permitió la detección cuantitativa de múltiples miRNAs simultáneamente, por lo que presenta una ventaja sobre otras pruebas de tamizaje como los microarreglos la cual es semicuantitativa. El diseño experimental anteriormente mencionado nos permitió obtener datos cuantitativos, múltiples y confiables.

Los datos obtenidos mostraron que efectivamente, el tabaquismo induce por sí mismo una alteración en los niveles de expresión de los miRNAs en el suero de

individuos aparentemente sanos. Lo anterior es relevante, ya que los individuos aparentemente sanos son usados como grupo de control en múltiples estudios. Los grupos de control son aquellos que se presentarían en los intervalos de referencia del biomarcador que se está analizando en una población sana que se encuentra dentro de los intervalos de referencia, lo cual no es correcto en el caso de individuos que fuman de acuerdo a las evidencias proporcionadas por este estudio donde se observó que si hay una alteración en la concentración de unos miRNA cuando se comparan sujetos aparentemente sanos fumadores contra no fumadores.

Lo anterior predice la importancia de analizar las muestras provenientes de pacientes con AD considerando si eran fumadores o no. Lo cual fue corroborado con los resultados obtenidos del análisis de los diferentes grupos de estudios que indicaron que los miRNAs detectados como alterados, varía dependiendo de la inclusión o no de fumadores y no fumadores. Este análisis nos permite además identificar aquellos miRNAs que pueden ser detectados en todos los grupos de estudio (18 miRNAs), los miRNAs que pueden ser identificados exclusivamente en AD no-fumadores (9 miRNAs) y en AD fumadores (13 miRNAs) (Tabla 7). Estos 18 miRNAs pueden ser considerados como los mejores potenciales candidatos para ser usados como biomarcadores de diagnóstico del AD, ya que no importaría si el paciente es fumador o no para poder ser diagnosticado. Diez de los 18 miRNAs comunes están asociados predictivamente con “PATHWAYS IN CANCER”, lo que es un factor a favor para ser considerados potenciales biomarcadores de diagnóstico de la enfermedad.

Por otro lado, los miRNAs alterados en pacientes AD fumadores exclusivamente, podrían ser blanco de estudio como potenciales mecanismos de carcinogénesis inducidos por el tabaquismo. Efectivamente, el análisis predictivo señaló a 15 miRNAs asociados a “PATHWAYS IN CANCER” (Datos de Tabla 10), siendo cuatro de ellos exclusivamente encontrados en AD fumadores (Figura 8) (Datos de Tabla 7).

Los datos obtenidos en este estudio cumplen el objetivo general que es identificar aquellos miRNAs cuyos niveles de expresión se asocien al tabaquismo o bien al

diagnóstico de la enfermedad. Tienen trascendencia relevante porque, proporcionan la evidencia experimental de que el tabaquismo es un factor crucial en el análisis de miRNAs en circulación para la búsqueda fidedigna y confiable de biomarcadores de diagnóstico y prognosis en el cáncer pulmonar.

Es también importante señalar que, con la información obtenida de este estudio, es posible continuar la segunda fase de descubrimiento de biomarcadores llamada fase de validación, donde se incluye una cohorte mayor de pacientes y controles.

Al revisar los datos publicados, encontramos que el miR-25-3p está relacionado con el desarrollo de diversos tipos de cáncer. Se encontró que estaba presente en concentraciones mayores en tejido pancreático con cáncer (PDAC) comparado con tejido sano, se observó un nivel mayor de miR-25-3p y su sobre-expresión se relacionó con menor sobrevivencia. La expresión forzada del miR-25-3p en líneas celulares de PDAC indujo un incremento en la proliferación celular y metástasis en experimentos *in vivo* en ratones. (69). En tejidos de cáncer de mama triple-negativo (TNBC) miR-25-3p se encuentra sobreexpresado y promueve la proliferación *in vitro* y crecimiento de los tumores en modelo de xenograft en ratones (70). Por otro lado, Zhicheng Zeng y colaboradores (59) reportaron que los niveles de miR-25 se encuentran incrementados en la fracción exosomal del suero de pacientes con cáncer colorrectal comparados con individuos sanos, y ese nivel incrementado se asocia a la presencia de metástasis. Nuestros datos coinciden con este último artículo en relación a que encontramos niveles incrementados de miR-25 en el suero de pacientes con adenocarcinoma, aunque no fue posible separar la fracción exosomal.

Por su parte el miR-200c, cuyos niveles encontramos incrementados en el suero de pacientes con adenocarcinoma, es un miRNA ampliamente asociado con neoplasias en la literatura. Los estudios publicados indican que este miRNA puede tener función prometastásica y antimetastásica (71). En cáncer pulmonar, un estudio reportó que miR-200c se encuentra sub-expresado en el tejido de pacientes comparado con tejido sano (62). Esto no contradice nuestros datos ya que la expresión en tejido no necesariamente corresponde a la secreción en fluidos corporales (72).

Con respecto a miR-140-5p, Yang y colaboradores (73) reportaron que los niveles de miR-140-5p se encuentran disminuidos en tejido pulmonar de pacientes con NSCLC comparados con tejido normal, pero no reportan las concentraciones en suero.

En nuestro estudio encontramos que el miR-140-5p se encuentra en una mayor concentración en pacientes con NSCLC en comparación con los sujetos sanos. Con respecto a su función potencial, se ha reportado que el miR-140-5p funciona como supresor de tumores (63) y que uno de sus blancos es el VEGFA.

En nuestro estudio, encontramos que uno de los blancos es efectivamente el VEGFA (Tabla 12, grupo AD-Fu).

Es importante señalar que la mayoría de la literatura consultada refiere a estudios de los miRNAs que identificamos en tejido o células, pero es relevante señalar los hallazgos reportados por otros autores para respaldar la trascendencia potencial de los miRNAs que identificamos en el desarrollo de este trabajo como posibles biomarcadores de enfermedad, en este caso, del cáncer pulmonar.

9 CONCLUSIONES

- El tabaquismo induce por sí mismo una alteración en los niveles de expresión de los miRNAs en el suero de individuos sanos, por lo tanto si afecta el valor diagnóstico de los miRNAs asociados al cáncer pulmonar
- Se identificaron 7 miRNAs sub-expresados en el suero de individuos aparentemente sanos fumadores comparados con sanos no fumadores como control.
- Las evidencias indican que los miRNAs detectados como alterados en el suero de pacientes con adenocarcinoma comparados con individuos aparentemente sanos varía dependiendo de la inclusión o no de fumadores y no-fumadores en el análisis.
- Se identificaron 35 miRNAs sobre-expresados y tres miRNAs sub-expresados en el suero de pacientes AD-NFu comparados con sanos no fumadores como control.
- Se identificaron 36 miRNAs sobre-expresados y tres miRNAs sub-expresados en el suero de pacientes AD-Fu comparados con sanos fumadores como control.
- Se identificaron 44 miRNAs sobre-expresados y un miRNA sub-expresado en el suero del total de pacientes con AD comparados con el total de individuos sanos fumadores y no-fumadores como control.
- Se identificaron 18 miRNAs sobre-expresados que son comunes en todos los grupos de pacientes con AD, por lo que se proponen como potenciales candidatos a biomarcadores de diagnóstico de la enfermedad.
- De los 18 miRNAs anteriores, 9 están asociados predictivamente a "PATHWAYS IN CANCER".
- Se propone validar a los 18 miRNAs (principalmente los asociados a mecanismos de carcinogénesis) en una cohorte mayor de pacientes y controles.

10 INDICE DE IMÁGENES

Figura I	Índice de incidencia y mortalidad del cáncer a nivel mundial, ambos géneros. GLOBOCAN 2012	4
Figura II	Índice de incidencia y mortalidad del cáncer en México, ambos géneros. GLOBOCAN 2012	5
Figura III	Mecanismo de biogénesis de los miRNAs	13
Figura IV	Mecanismos de secreción y de acción de los miRNAs.	16
Figura V	Consentimiento informado del protocolo de investigación.	29-31
Figura VI	Gráfica representativa de amplificación de miRNAs mediante PCR-Array	34
Figura VII	Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en los individuos sanos fumadores (S-Fu) comparados con los individuos sanos no-fumadores (S-NFu) mediante PCR-Array (Placa A y Placa B).	35
Figura VIII	Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en pacientes con adenocarcinoma pulmonar no-fumadores (AD-NFu) comparados con los individuos sanos no-fumadores (S-NFu) mediante PCR-Array (Placa A y Placa B).	38
Figura IX	Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar fumadores (AD-Fu) comparados con los individuos sanos fumadores (S-Fu) mediante PCR-Array (Placa A y Placa B).	40
Figura X	Gráfica de “volcán” que muestra los miRNAs detectados en los pacientes con adenocarcinoma pulmonar (AD) comparados con los individuos sanos (S) mediante PCR-Array (Placa A y B).	42
Figura XI	Diagrama de Venn donde se comparan los miRNAs diferencialmente expresados (sub-expresados) en los grupos de estudio de adenocarcinoma: S-Fu vs. S-NFu y AD-Fu vs. S-Fu.	44
Figura XII	Diagrama de Venn donde se comparan los miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de estudio de adenocarcinoma: ADFu vs. SFu, ADN Fu vs. SNF y AD vs. S.	45
Figura XIII	Diagrama de Venn donde se comparan los miRNAs alterados en el grupo de estudio AD-Fu vs. S-Fu que se asocian a “PATHWAYS IN CANCER” y los que son detectados exclusivamente en ese grupo.	51
Figura XIV	Diagrama de miRNAs asociados a “PATHWAYS IN CANCER” y sus genes blanco.	54
Figura XIV	Redes <i>interactome</i> construidas para conectar los miRNAs comunes asociados a cáncer en los tres grupos de estudio AD-Nfu vs. S-Nfu, "AD-Fu vs. S-Fu", y "AD vs. S a sus genes blanco.	55

11. INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Datos epidemiológicos del grupo de estudio de individuos sanos.	33
Tabla 2	Datos epidemiológicos del grupo de estudio de pacientes con adenocarcinoma pulmonar.	33
Tabla 3	MicroRNAs diferencialmente expresados en Sanos Fumadores (S-FU) vs. Sanos No-Fumadores (S-NFU)	36
Tabla 4	MicroRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma No-Fumadores(AD-NFU) vs. Sanos No-Fumadores(S-Nfu).	39
Tabla 5	MicroRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma Fumadores(AD-Fu) vs. Sanos Fumadores(S-FU)	41
Tabla 6	MicroRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma(AD) vs. Individuos Sanos(s)(Todos).	43
Tabla 7	Análisis comparativo entre los miRNAs diferencialmente expresados en los grupos de estudio de pacientes con adenocarcinoma fumadores y no-fumadores.	46
Tabla 8	Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en Sanos Fumadores(S-Fu) vs. Sanos No-Fumadores(S-Nfu) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.	47
Tabla 9	Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma No-Fumadores(AD-Nfu) vs. Sanos No Fumadores (S-Nfu) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.	48
Tabla 10	Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma Fumadores(AD-Fu) vs. Sanos Fumadores(S-FU) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.	49
Tabla 11	Asociación predictiva de los miRNAs diferencialmente expresados en pacientes con Adenocarcinoma (AD) vs. Sanos(S) con mecanismos relacionados a carcinogénesis.	50
Tabla 12	Muestra los miRNAs identificados en la Tabla 7 que están asociados a "pathways in cáncer" y sus blancos predictivos.	53

12 REFERENCIAS

1. Lopez-Camarillo C, Marchat LA, Arechaga-Ocampo E, Perez-Plasencia C, Del Moral-Hernandez O, Castaneda-Ortiz EJ, et al. MetastamiRs: non-coding MicroRNAs driving cancer invasion and metastasis. *Int J Mol Sci.* 2012;13(2):1347-79.
2. Stewart BW, Wild CP. WORLD CANCER REPORT. International Agency for Research on Cancer. 2014.
3. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2016. *CA Cancer J Clin.* 2016;66(1):7-30.
4. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer.* 2010;127(12):2893-917.
5. Valastyan S, Weinberg RA. Tumor metastasis: molecular insights and evolving paradigms. *Cell.* 2011;147(2):275-92.
6. The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Reports of the Surgeon General. Atlanta (GA)2014.
7. Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res.* 2016;5(3):288-300.
8. Cancerología INd. <http://cancerdepulmon.com.mx/> 2015 [cited 2018 03-05-18].
9. Chen R-J, W Chang L, Lin P, Wang Y-J. Epigenetic Effects and Molecular Mechanisms of Tumorigenesis Induced by Cigarette Smoke: An Overview. *Journal of oncology.* 2011;2011:654931.
10. National Center for Chronic Disease P, Health Promotion Office on S, Health. Reports of the Surgeon General. The Health Consequences of Smoking-50 Years of Progress: A Report of the Surgeon General. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US); 2014.
11. Hecht SS. Biochemistry, biology, and carcinogenicity of tobacco-specific N-nitrosamines. *Chemical research in toxicology.* 1998;11(6):559-603.
12. Sher T, Dy GK, Adjei AA. Small cell lung cancer. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(3):355-67.
13. Muscat JE, Stellman SD, Zhang ZF, Neugut AI, Wynder EL. Cigarette smoking and large cell carcinoma of the lung. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1997;6(7):477-80.
14. Pass HI, International Association for the Study of Lung C. Principles and practice of lung cancer : the official reference text of the IASLC. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2010.
15. Grossman S, Porth C. Porth fisiopatología : alteraciones de la salud, conceptos básicos : 9a edición. L'Hospitalet de Llobregat: Wolters Kluwer Health España/Lippincott Williams & Wilkins; 2014.
16. Jack A. Roth WKH, Ritsuko U. Komanki. Lung Cancer 4 ed ed. Blackwell W, editor2014.
17. Dorantes-Heredia R, Ruiz-Morales JM, Cano-García F. Histopathological transformation to small-cell lung carcinoma in non-small cell lung carcinoma tumors. *Translational Lung Cancer Research.* 2016;5(4):401-12.

18. Taimur Sher GKD, Alex A. Adjei. Small Cell Lung Cancer. Mayo Clinic Proceedings. 2008;83(3):355-67.
19. Jacobson FL, Jaklitsch MT. Lung cancer screening trials: The United States and beyond. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2012;144(3):S3-S6.
20. Rivera MP, Mehta AC. Initial diagnosis of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines (2nd edition). Chest. 2007;132(3 Suppl):131s-48s.
21. Ninane V. Pathological Diagnosis. In: Sculier J-P, Fry WA, editors. Malignant Tumors of the Lung: Evidence-based Management. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2004. p. 161-70.
22. Risse EK vtHM, Vooijs GP Relationship between patient characteristics and the sputum cytologic diagnosis of lung cancer. . Acta Cytol. 1987;31:159 –65.
23. Schreiber G, McCrory DC. Performance characteristics of different modalities for diagnosis of suspected lung cancer: summary of published evidence. Chest. 2003;123(1 Suppl):115s-28s.
24. Mazzone P, Jain P, Arroliga AC, Matthay RA. Bronchoscopy and needle biopsy techniques for diagnosis and staging of lung cancer. Clinics in chest medicine. 2002;23(1):137-58, ix.
25. Amorín Kajatt E. CÁNCER DE PULMÓN, UNA REVISIÓN SOBRE EL CONOCIMIENTO ACTUAL, MÉTODOS DIAGNÓSTICOS Y PERSPECTIVAS TERAPÉUTICAS. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2013;30(1):85-92.
26. Pantzar P, Meurala H, Koivuniemi A, Laustela E. Peroperative fine needle aspiration biopsy of lung tumors. Scandinavian journal of thoracic and cardiovascular surgery. 1983;17(1):51-3.
27. Collins L, Haines C, Perkel R, E Enck R. Lung Cancer: Diagnosis and Management 2007. 56-63 p.
28. Guhlmann A, Storck M, Kotzerke J, Moog F, Sunder-Plassmann L, Reske SN. Lymph node staging in non-small cell lung cancer: evaluation by [18F]FDG positron emission tomography (PET). Thorax. 1997;52(5):438-41.
29. Lardinois D, Weder W, Hany TF, Kamel EM, Korom S, Seifert B, et al. Staging of non-small-cell lung cancer with integrated positron-emission tomography and computed tomography. The New England journal of medicine. 2003;348(25):2500-7.
30. Roth JA. Lung Cancer. Wiley-Blackwell, editor: Wiley-Blackwell; 2014.
31. Yang P. Epidemiology of lung cancer prognosis: quantity and quality of life. Methods in molecular biology (Clifton, NJ). 2009;471:469-86.
32. Beckles MA, Spiro SG, Colice GL, Rudd RM. Initial evaluation of the patient with lung cancer: symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. Chest. 2003;123(1 Suppl):97s-104s.
33. Ali Mohammed Hammamy R, Farooqui K, Ghadban W. Sclerotic Bone Metastasis in Pulmonary Adenocarcinoma. 2018;2018:1903757.
34. Efthymiou C, Spyrtatos D, Kontakiotis T. Endocrine paraneoplastic syndromes in lung cancer. Hormones (Athens, Greece). 2018;17(3):351-8.

35. Molina JR, Yang P, Cassivi SD, Schild SE, Adjei AA. Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin Proc.* 2008;83(5):584-94.
36. Pfister DG, Johnson DH, Azzoli CG, Sause W, Smith TJ, Baker S, Jr., et al. American Society of Clinical Oncology treatment of unresectable non-small-cell lung cancer guideline: update 2003. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2004;22(2):330-53.
37. Chen Y, Gao DY, Huang L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Advanced drug delivery reviews.* 2015;81:128-41.
38. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-54.
39. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008;18(10):997-1006.
40. Kanno S, Nosho K, Ishigami K, Yamamoto I, Koide H, Kurihara H, et al. MicroRNA-196b is an independent prognostic biomarker in patients with pancreatic cancer. *Carcinogenesis.* 2017;38(4):425-31.
41. Lu M, Kong X, Wang H, Huang G, Ye C, He Z. A novel microRNAs expression signature for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Oncotarget.* 2017;8(5):8775-84.
42. Goto A, Tanaka M, Yoshida M, Umakoshi M, Nanjo H, Shiraishi K, et al. The low expression of miR-451 predicts a worse prognosis in non-small cell lung cancer cases. *PLoS One.* 2017;12(7):e0181270.
43. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif.* 2016;49(3):281-303.
44. Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic acids research.* 2010;38(20):7248-59.
45. Romero-Cordoba SL, Salido-Guadarrama I, Rodriguez-Dorantes M, Hidalgo-Miranda A. miRNA biogenesis: Biological impact in the development of cancer. *Cancer Biology & Therapy.* 2014;15(11):1444-55.
46. Gregory RI, Yan KP, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* 2004;432(7014):235-40.
47. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004;432(7014):231-5.
48. Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *Journal of cellular and molecular medicine.* 2008;12(5b):1811-9.
49. Aleckovic M, Kang Y. Regulation of cancer metastasis by cell-free miRNAs. *Biochimica et biophysica acta.* 2015;1855(1):24-42.
50. Wang B, Yanez A, Novina CD. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2008;105(14):5343-8.

51. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science (New York, NY)*. 2006;312(5770):75-9.
52. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(17):9779-84.
53. Li L, Zhu D, Huang L, Zhang J, Bian Z, Chen X, et al. Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles. *PloS one*. 2012;7(10):e46957.
54. Gibbins DJ, Ciaudo C, Erhardt M, Voinnet O. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature cell biology*. 2009;11(9):1143-9.
55. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):654-9.
56. Mause SF, Weber C. Microparticles: protagonists of a novel communication network for intercellular information exchange. *Circulation research*. 2010;107(9):1047-57.
57. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(12):5003-8.
58. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223-33.
59. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2001;69(3):89-95.
60. Duffy MJ. Role of tumor markers in patients with solid cancers: A critical review. *European journal of internal medicine*. 2007;18(3):175-84.
61. Avila-Moreno F, Urrea F, Ortiz-Quintero B. [MicroRNAs in diagnosis and prognosis in lung cancer]. *Rev Invest Clin*. 2011;63(5):516-35.
62. Shen J, Todd NW, Zhang H, Yu L, Lingxiao X, Mei Y, et al. Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 2011;91(4):579-87.
63. Hennessey PT, Sanford T, Choudhary A, Mydlarz WW, Brown D, Adai AT, et al. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS One*. 2012;7(2):e32307.
64. Chen X, Hu Z, Wang W, Ba Y, Ma L, Zhang C, et al. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel noninvasive biomarkers for nonsmall cell lung cancer diagnosis. *International journal of cancer*. 2012;130(7):1620-8.
65. Sanfiorenzo C, Ilie MI, Belaid A, Barlesi F, Mouroux J, Marquette CH, et al. Two panels of plasma microRNAs as non-invasive biomarkers for prediction of recurrence in resectable NSCLC. *PloS one*. 2013;8(1):e54596.
66. Yuchuan H, Ya D, Jie Z, Jingqiu C, Yanrong L, Dongliang L, et al. Circulating miRNAs might be promising biomarkers to reflect the dynamic pathological changes in smoking-related interstitial fibrosis. *Toxicology and industrial health*. 2014;30(2):182-91.

67. Graff JW, Powers LS, Dickson AM, Kim J, Reisetter AC, Hassan IH, et al. Cigarette smoking decreases global microRNA expression in human alveolar macrophages. *PloS one*. 2012;7(8):e44066.
68. Xi S, Xu H, Shan J, Tao Y, Hong JA, Inchauste S, et al. Cigarette smoke mediates epigenetic repression of miR-487b during pulmonary carcinogenesis. *The Journal of clinical investigation*. 2013;123(3):1241-61.
69. Zhang J, Bai R, Li M, Ye H, Wu C, Wang C, et al. Excessive miR-25-3p maturation via N(6)-methyladenosine stimulated by cigarette smoke promotes pancreatic cancer progression. *Nat Commun*. 2019;10(1):1858-.
70. Chen H, Pan H, Qian Y, Zhou W, Liu X. MiR-25-3p promotes the proliferation of triple negative breast cancer by targeting BTG2. *Mol Cancer*. 2018;17(1):4-.
71. Pacurari M, Addison JB, Bondalapati N, Wan Y-W, Luo D, Qian Y, et al. The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. *Int J Oncol*. 2013;43(2):548-60.
72. Liu P-L, Liu W-L, Chang J-M, Chen Y-H, Liu Y-P, Kuo H-F, et al. MicroRNA-200c inhibits epithelial-mesenchymal transition, invasion, and migration of lung cancer by targeting HMGB1. *PloS one*. 2017;12(7):e0180844-e.
73. Yang P, Xiong J, Zuo L, Liu K, Zhang H. miR-140-5p regulates cell migration and invasion of non-small cell lung cancer cells through targeting VEGFA. *Mol Med Rep*. 2018;18(3):2866-72.