



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**“Evaluación de miRNAs dirigidos a CD54 en plasmas de pacientes con cáncer gástrico y su asociación con variables clínico-patológicas”**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Biól. ALBERTO MONROY MORA

TUTOR PRINCIPAL  
DRA. ELIZABETH ORTIZ SÁNCHEZ  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
DR. FEDERICO CENTENO CRUZ  
INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA  
DRA. MARCELA LIZANO SOBERÓN  
INSTITUTO NACIONAL DE CANCEROLOGÍA

Ciudad de México. Febrero, 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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




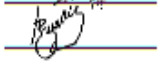

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

**SINODALES DESIGNADOS**  
**Presente**

Estimado académico:

Los miembros del Subcomité Académico en reunión ordinaria del **12 de septiembre de 2022**, conocieron la solicitud de asignación de **JURADO DE EXAMEN** para optar por el grado de **Maestro en Ciencias** del/la estudiante **MONROY MORA ALBERTO**, con la tesis "Evaluación de miRNAs dirigidos a CD54 en plasmas de pacientes con cáncer gástrico y su asociación con variables clínico-patológicas", dirigida por el/la Dr(a). **ORTIZ SÁNCHEZ ELIZABETH**.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado en el que se encuentra usted incluido:

			ACEPTA	FECHA	FIRMA
ROBLES FLORES MARTHA	PMDCBQ	PRESIDENTE	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	28 / 09 / 22	
ROCHA ZAVALA LETICIA	PMDCBQ	SECRETARIO	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	29 / 09 / 22	
GARCÍA CARRANCA ALEJANDRO MANUEL	PMDCBQ	VOCAL	SI <input type="checkbox"/> NO <input checked="" type="checkbox"/>	04 / 10 / 22	
MONTESINOS MONTESINOS JUAN JOSÉ	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	29 / 09 / 22	
ZARAIN HERZBERG ANGEL ALFONSO	PMDCBQ	VOCAL	SI <input checked="" type="checkbox"/> NO <input type="checkbox"/>	29 / 09 / 22	

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 19 de septiembre de 2022



**Coordinadora**  
**Dra. Claudia Lydia Treviño Santa Cruz**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Células Troncales de Tumores Sólidos de la Subdirección de Investigación Básica del Instituto Nacional de Cancerología, y contó con el apoyo financiero SEP/Conacyt A1S40601. Gracias al apoyo económico a través de una beca nacional Conacyt durante la realización del proyecto de maestría con No. CVU 1086342.

## AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM por enriquecer mi formación académica y personal. Así como al Instituto Nacional de Cancerología en donde realicé este trabajo y viví gratas experiencias en estos dos últimos años.

A la Dra. Elizabeth Ortiz Sánchez encargada del laboratorio de Células Troncales de Tumores Sólidos, al aceptarme para ser parte de su grupo de trabajo y por su dirección en el desarrollo de esta investigación.

A la M. en C. María del Pilar Ramos Godínez, quien gracias a ella no habría sido posible realizar este trabajo, por permitirme trabajar en un espacio de su laboratorio.

Al laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos, a cargo de la Dra. Marcela Lizano Soberón, por permitirme utilizar sus equipos para el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Luis Fernando Oñate Ocaña por su tiempo, paciencia y su asesoramiento en el análisis estadístico de este trabajo.

A mi comité tutor conformado por la Dra. Marcela Lizano Soberón y el Dr. Federico Centeno Cruz, por sus valiosas y oportunas observaciones a lo largo del desarrollo de la investigación.

A mi comité de sinodales conformado por la Dra. Martha Robles Flores, la Dra. Leticia Rocha Zabaleta, el Dr. Manuel Alejandro García Carranca, el Dr. Juan José Montesinos Montesinos y el Dr. Ángel Alfonso Zarain Herzberg, por sus valiosas observaciones para mejorar el escrito de la tesis y las atenciones recibidas de su parte.

Y por último a mis compañeros de laboratorio Jared Becerril, Alhelí Adán, Manuel Tinajero, Gonzalo González, David Herrera, Julián Grandvallet, Eduardo Alvarado, Roberto Garduño y Luisa Jiménez por compartir gratas experiencias durante mi estancia en el laboratorio.

## DEDICATORIAS

A mis padres María de Lourdes Mora García y Alberto Monroy García por todo su cariño, apoyo, confianza y dedicación, son un ejemplo a seguir y estoy totalmente agradecido con ustedes. Sin ustedes no hubiera logrado lo que soy ahora.

A mi hermana Katia, por compartir momentos agradables y aguantar mis cambios de humor.

A mi abuelita Julia García por cuidarme desde la niñez y por todo su cariño.

# ÍNDICE

1.	RESUMEN .....	11
2.	MARCO TEÓRICO .....	13
2.1.	Cáncer Gástrico (CaG).....	13
2.2.	Métodos diagnósticos en CaG .....	16
2.3.	Biogénesis y características de los microRNA (miRNAs) .....	20
2.4.	miRNAs en CaG.....	23
2.5.	Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o CD54.....	26
2.6.	Papel de CD54 en Cáncer.....	28
3.	JUSTIFICACIÓN .....	33
4.	PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN .....	34
5.	HIPÓTESIS.....	34
6.	OBJETIVOS.....	34
6.1.	Objetivo general .....	34
6.2.	Objetivos particulares.....	34
7.	METODOLOGÍA.....	35
7.1.	Población de estudio .....	35
7.1.1.	Criterios de inclusión .....	35
7.1.2.	Criterios de exclusión .....	35
7.2.	Purificación de RNA total de plasmas, incluido miRNAs .....	37
7.3.	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR) .....	37
7.4.	Normalización de datos experimentales de RT-qPCR mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ .....	38
7.5.	Análisis estadístico .....	38
8.	RESULTADOS .....	39
8.1.	La expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p es significativamente mayor en el plasma de pacientes con CaG que en donadores sin CaG. ....	39
8.2.	La expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p y las características clínico-patológicas de los pacientes con CaG.....	41
8.3.	Valor diagnóstico de Hsa-miR-335-5p como biomarcador no invasivo en CaG. ....	43
9.	DISCUSIÓN.....	44
10.	CONCLUSIÓN .....	48
11.	PERSPECTIVAS .....	48
12.	REFERENCIAS.....	49

13.	APÉNDICE 1 .....	63
14.	APÉNDICE 2 .....	64



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Etapas de desarrollo del adenocarcinoma intestinal gástrico denominadas “Cascada de Correa” .....	16
<b>Fig. 2.</b> Endoscopia superior. ....	17
<b>Fig. 3.</b> Posibles biomarcadores diagnóstico no invasivos para el CaG en etapa temprana. ....	19
<b>Fig. 4.</b> Descripción general de la biogénesis y función de los miRNAs.....	22
<b>Fig. 5.</b> Recopilación de miRNAs que contribuyen al desarrollo de CaG. ....	24
<b>Fig. 6.</b> Estructura de CD54 y su función en el rodamiento de leucocitos a sitios de inflamación. ....	26
<b>Fig. 7.</b> Representación esquemática de las isoformas de CD54 y su organización. ....	28
<b>Fig. 8.</b> Posibles mecanismos de acción por los que CD54 puede promover la metástasis tumoral. .	31
<b>Fig. 9.</b> La expresión de hsa-miR-335-5p es significativamente mayor en el plasma de pacientes con CaG que en donadores sin CaG. ....	41
<b>Fig. 10.</b> El hsa-miR-335-5p no presenta asociación con variables clínico-patológicas nominales de los pacientes con CaG. ....	42
<b>Fig. 11.</b> Curva de característica operativas del receptor (ROC) para el valor diagnóstico de hsa-miR-335-5p en plasma de pacientes con CaG.....	43

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Expresión diferencial de miRNAs circulantes en CaG con potencial biomarcador.....	25
<b>Tabla 2.</b> Características clínico-patológicas de pacientes con CaG y donadores sin CaG. ....	36
<b>Tabla 3.</b> miRNAs detectados en el plasma de pacientes con CaG y donadores sin CaG. ....	40
<b>Tabla 4.</b> Correlaciones entre los niveles de expresión relativa del hsa-miR-335-5p en plasma y variables clínico-patológicas de los pacientes con CaG. ....	43

## ABREVIATURAS

AFP	Pepsinógeno y la $\alpha$ -fetoproteína
AGO	Proteína argonauta
AJCC	Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer
CA	Antígeno carbohidrato
CaG	Antígeno Asociado a la citotoxina
CagA	Antígeno A asociado a la citotoxina
CagPAI	Isla de Patogenicidad cag
CEA	Antígeno carcinoembrionario
circRNA	RNA circular
cfDNAs	DNA circulante libre de células
CT	Tomografía computarizada
CTCs	Células tumorales circulantes
DO	Densidad óptica
dsRNA	RNA de doble cadena
Exp-5	Exportina 5
IARC	Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer
Ig	Inmunoglobulina
LFA-1	Factor 1 asociado a linfocitos
lncRNA	RNA largos no codificantes
LNM	Metástasis ganglionar
M	Metástasis
Mac-1	Complejo de ataque a membrana 1
MALT	Tejido linfoide asociado a mucosas
miRISC	Complejo silenciador inducido por miRNA
miRNA	Micro RNA
MRI	Resonancia magnética por imágenes
MUC1	Mucina 1
N	Nódulos linfáticos
NBI	Endoscopia de aumento con imágenes de banda estrecha
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACT	Proteína cinasa inducida por interferón
PET	Tomografía por emisión de positrones
PfEMP1	Proteína de membrana de glóbulos rojos de Plasmodium falciparum
PMN	Neutrófilos polimorfonucleares
Pol II	RNA polimerasa II
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	pri-mRNA
SL	Laparoscopia de estadificación
sICAM-1	Proteína soluble secretable ICAM-1
T	Tumor
TAM	Macrófagos asociados a tumores
TME	Microambiente tumoral
TNM	Sistema de estadificación
TRBP	Proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación
UICC	Unión Internacional para el Control del Cáncer
VacA	Citotoxina vacuolizante

## 1. RESUMEN

El cáncer gástrico (CaG) es un problema de salud pública a nivel mundial, en el año 2020 se estimaron más de 1,000,000 de casos nuevos y más de 700,000 muertes a causa de esta enfermedad, lo que lo convierte en el quinto cáncer diagnosticado con mayor incidencia y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo en ambos sexos. La mayoría de los casos que son diagnosticados como CaG, se detectan en estadios avanzados de la enfermedad, donde las tasas de supervivencia a 5 años son <20%, principalmente debido al desarrollo de metástasis. Varios estudios han demostrado una correlación importante entre la expresión de CD54 (ICAM-1) y la progresión a metástasis en adenocarcinoma de pulmón, cáncer de mama, melanoma y carcinoma oral de células escamosas, además de cáncer gástrico, entre otros. Nuestro grupo de trabajo caracterizó la presencia de células troncales de CaG con un fenotipo ampliado (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>: GCSC) en tumores de pacientes con esta neoplasia, a diferencia de poblaciones celulares con el fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>-</sup> obtenidas de tejidos gástricos de individuos sin CaG, sugiriendo que estas subpoblaciones celulares CD54<sup>+</sup> pueden tener un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad al favorecer el crecimiento tumoral, la metástasis y resistencia a los tratamientos. Por lo que resulta importante conocer los mecanismos que regulan la expresión de CD54 y su relación con las variables clínico patológicas en CaG. Tomando en cuenta que la regulación de CD54 a nivel pre/postranscripcional puede ser llevada a cabo por diferentes miRNAs, y que los patrones de expresión de estas moléculas en los biofluidos se asocian con las condiciones fisiopatológicas, el presente estudio tuvo como objetivo identificar si la presencia de miRNAs dirigidos a CD54 en el plasma de pacientes con CaG se relacionaban con variables clínico-patológicas en estos pacientes. A través de algoritmos de predicción, utilizando las bases de datos GeneCards® y miRBase se identificó a los miRNAs: hsa-miR-335-5p, hsa-miR-3186-3p, hsa-miR-3975 y hsa-miR-1256 con los valores de predicción más altos para unirse al mRNA de CD54. La presencia de los 4 miRNAs seleccionados y de hsa-miR-16-5p, utilizado como control de referencia, se determinó mediante RT-qPCR en el plasma de 30 pacientes con CaG y 30 donadores sin CaG. Sólo el hsa-miR-335-5p amplificó en 26 muestras plasmáticas de pacientes con CaG y 30 de donadores sin CaG. De manera interesante se encontró que la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p fue significativamente mayor en muestras plasmáticas de pacientes con CaG que en donadores sin CaG ( $p= 0.047$ ), y presentó una correlación positiva baja y significativa con las variables clínico patológicas ordinales relacionadas con el grado de diferenciación ( $r= 0.274$ ;  $p=$

0.042) y el tamaño tumoral ( $r= 0.295$ ;  $p= 0.028$ ); y una correlación positiva baja con tendencia a ser significativa con relación a la clasificación TNM ( $r= 0.245$ ;  $p= 0.069$ ) y con el porcentaje de células troncales CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> obtenidas de los tejidos tumorales de los pacientes con CaG estudiados ( $r= 0.252$ ;  $p= 0.064$ ). Al analizar los datos de expresión de hsa-miR-335-5p en el plasma de pacientes con CaG y donadores sin CaG a través de la curva ROC, se obtuvo una AUC de 0.608 para otorgar un valor diagnóstico para discriminar entre pacientes con CaG y donadores sin CaG. Estos resultados nos permiten concluir que la presencia de hsa-miR-335-5p en el plasma de pacientes con CaG puede estar asociada con las variables clínico patológicas relacionadas con la progresión de la enfermedad. No obstante, de acuerdo al valor de AUC obtenido (60.8%) se considera que el hsa-miR-335-5p es un biomarcador de bajo valor diagnóstico para discriminar entre pacientes con CaG y donadores sin CaG. Asimismo, resulta de gran interés conocer si hsa-miR-335-5p regula la expresión de CD54 en las células (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>: GCSC) para favorecer su capacidad migratoria y metastásica.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Cáncer Gástrico (CaG)

El cáncer gástrico (CaG) es un problema de salud pública a nivel mundial, en el año 2020 se estimaron más de 1,000,000 de casos nuevos y más de 700,000 muertes a causa de esta enfermedad, lo que lo convierte al CaG en el quinto cáncer diagnosticado con mayor incidencia y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo en ambos sexos, siendo la incidencia de CaG dos veces mayor en hombres que en mujeres, y la mayoría de los casos ocurren después de los 60 años (GLOBOCAN, 2020). La incidencia de CaG varía ampliamente entre diferentes regiones geográficas, observándose la incidencia más alta en el Este de Asia, algunos países de Europa del Este y América del Sur, y la más baja en América del Norte y África. A nivel mundial, más del 70% de CaG se produce en los países en desarrollo (Petryszyn *et al.*, 2020). En México, en 2020 se reportó que el CaG ocupa el sexto lugar de incidencia con 8,804 nuevos casos y el quinto lugar como causa de muerte con 6,735 casos (GLOBOCAN, 2020).

El desarrollo del CaG, como la mayoría de los tipos de cáncer, es un proceso complejo y multifactorial, que implica un número de factores etiológicos y múltiples alteraciones genéticas y epigenéticas. Entre los factores predisponentes están: la edad, alto consumo de sal, tabaquismo, dietas bajas en frutas y verduras, y en un pequeño porcentaje de pacientes, un componente genético familiar (Piazuelo & Correa, 2013). La infección por *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) también es un factor de riesgo crítico, que contribuye a aproximadamente al 75% de todos los casos de CaG a nivel mundial (Mentis *et al.*, 2019). *H. pylori* es una bacteria gram negativa en forma de espiral y es la infección bacteriana crónica más común en humanos. La gran mayoría de los pacientes son asintomáticos, aunque alrededor del 10 % desarrolla enfermedad de úlcera péptica, del 1 % al 3 % desarrolla adenocarcinoma gástrico y el 0.1 % desarrolla linfoma de tejido linfoide asociado a mucosas (MALT, por sus siglas en inglés). En 1994, *H. pylori* fue reconocido como carcinógeno de clase I por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) en base a la creciente evidencia que establece el papel de *H. pylori* en la carcinogénesis gástrica. Esta bacteria se considera una causa necesaria pero insuficiente para el desarrollo del CaG, debido a que sólo una minoría de los individuos infectados con *H. pylori* desarrollan cáncer (Kim & Wang, 2021).

El mecanismo molecular por el cual *H. pylori* induce CaG no se comprende por completo, pero es probable que sea una combinación de factores de virulencia, predisposición genética del huésped, y factores ambientales (como el consumo elevado de sal, tabaco y carne procesada) (Correa, 2013). Adicionalmente, existe una gran variedad genética entre las cepas de *H. pylori*, con un potencial patógeno y cancerígeno variable, y un mismo individuo puede estar infectado simultáneamente con múltiples cepas. Entre los mecanismos patogénicos de las enfermedades asociadas a *H. pylori*, se han reportado varios factores de virulencia específicos de cepa. Dentro de estos factores de virulencia, el antígeno A asociado a la citotoxina (CagA) y la citotoxina vacuolizante (VacA), son los mejor definidos y se asocian con un mayor riesgo de patología gástrica (Censini *et al.*, 1996; Blaser *et al.*, 1995).

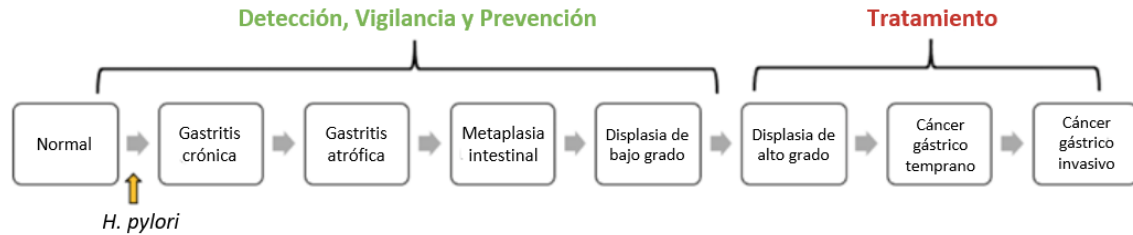
CagA es una proteína de 120 a 140 kDa, producto del gen bacteriano *cagA*, la cual se asocia con lesiones celulares y enfermedades gastrointestinales más graves. Este gen es parte de una región de DNA llamada isla de patogenicidad *cag* (*cagPAI*), que no está presente en todas las cepas de *H. pylori* y se considera un marcador de virulencia. Las cepas virulentas de *H. pylori* que codifican la región *cagPAI*, expresan un sistema de secreción que permite la inyección de factores de virulencia como CagA en las células epiteliales gástricas. La proteína CagA puede interactuar con proteínas intracelulares y activar vías de señalización a través de mecanismos independientes o dependientes de la fosforilación de tirosina. Esta proteína tiene múltiples efectos sobre las células epiteliales gástricas, incluido el aumento de la proliferación celular, la disminución de la apoptosis celular y la alteración de la polaridad celular, que promueven el desarrollo de tumores (Wroblewski & Peek, 2013; Chen *et al.*, 2016). VacA es otro factor de virulencia importante que promueve la formación de vacuolas ácidas en el citoplasma de las células epiteliales gástricas. También induce poros en las membranas mitocondriales y la apoptosis de las células, alterando las uniones estrechas entre ellas para provocar el colapso celular. Además, VacA actúa como un inmunosupresor que inhibe la proliferación de células T y altera la respuesta inmunitaria del huésped, lo que permite la colonización persistente del estómago por *H. pylori*. Aunque todas las cepas de *H. pylori* poseen el gen *vacA*, las variaciones genéticas determinan la actividad funcional de VacA y el riesgo de enfermedad gástrica (Cover *et al.*, 2005).

El CaG, tanto en estadios tempranos o avanzados, se caracterizan por una amplia diversidad morfológica que da como resultado un número todavía creciente de sistemas de clasificación. Una

de las clasificaciones más utilizada es la de Laurén, en donde más del 95% de los casos de cáncer de estómago son adenocarcinomas, y estos se subdividen en 2 tipos histológicos principales: intestinal y difuso (Laurén, 1965). El adenocarcinoma intestinal, es el tipo histológico que predomina en áreas de alta incidencia de CaG, no obstante, dicha incidencia ha disminuido en las últimas décadas. Se denomina CaG tipo intestinal debido a que el epitelio adquiere la capacidad de formar glándulas o túbulos revestidos por epitelio que se asemejan a la mucosa del intestino, y se observa cohesión entre las células tumorales. Mientras que, las células del carcinoma difuso carecen de cohesión e invaden tejidos de forma independiente o en pequeños grupos, por lo que se considera más agresivo que el tipo intestinal (Correa, 2013). La infección por *H. pylori* se asocia con ambos subtipos histológicos de CaG, aunque se asocia con mayor frecuencia, y se caracteriza mejor, en el desarrollo del adenocarcinoma intestinal (Hansson *et al.*, 1995).

El desarrollo escalonado del adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal, también conocido como la “cascada de Correa”, ha sido bien descrito (**Fig. 1**). La inflamación crónica conduce a la transición de la mucosa normal a la gastritis crónica, que puede convertirse en gastritis atrófica, metaplasia intestinal, displasia y finalmente cáncer (Correa, 1992). *H. pylori* es el desencadenante mejor estudiado que puede conducir a la gastritis crónica en esta vía. Aunque las colonias bacterianas de *H. pylori* permanecen principalmente en la luz gástrica, la interacción con el epitelio provoca una reacción inflamatoria que promueve la migración de células inflamatorias a la mucosa. Esta respuesta inmune no es efectiva para eliminar la bacteria y puede durar años o décadas, causando gastritis crónica, a menos que se erradique la infección (Piazuelo & Correa, 2013). Esta inflamación crónica conduce a la destrucción de las células parietales y principales del estómago, lo que produce aclorhidria y gastritis atrófica. La pérdida de células parietales y principales, que normalmente secretan señales que modulan el crecimiento y la diferenciación de los progenitores gástricos, conduce a la proliferación y acumulación de células progenitoras gástricas indiferenciadas, así como a la metaplasia intestinal. La metaplasia intestinal es una lesión premaligna que alberga progenitores indiferenciados que pueden dar lugar a displasia y carcinoma (Correa, 1988; Fox & Wang, 2007).





**Fig. 1. Etapas de desarrollo del adenocarcinoma intestinal gástrico denominadas “Cascada de Correa”.** Tomado y modificado de Kim & Wang, 2021.

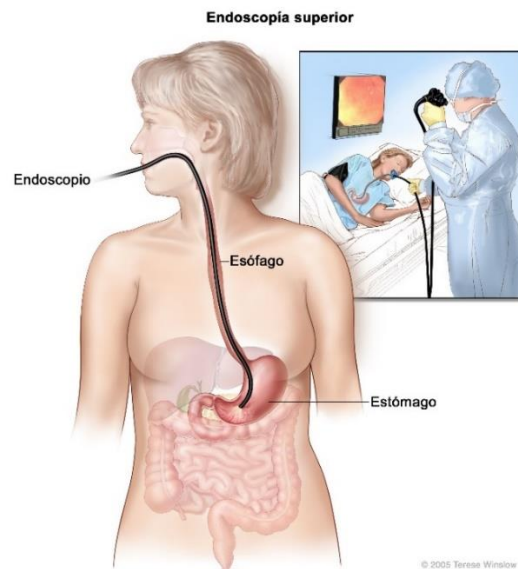
En la última década se han propuesto varios sistemas de clasificación molecular del CaG, a menudo intentando relacionar las características moleculares con los fenotipos histológicos y las características clínicas (Tan *et al.*, 2011; Lei *et al.*, 2013). Aunque las características moleculares basadas en alteraciones genéticas específicas o subtipos moleculares más amplios podrían guiar el desarrollo de tratamientos futuros, la clasificación de Laurén basada en los tipos histológicos (intestinal y difuso), sigue siendo la clasificación más utilizada para establecer los subgrupos en ensayos clínicos. De hecho, esta clasificación se usa comúnmente como una herramienta de diagnóstico para el CaG debido a su relativa simplicidad y establecimiento a largo plazo dentro de la comunidad médica. Los resultados generales de la enfermedad han sido bien estudiados y generalmente difieren según el subtipo de enfermedad. No obstante, se requiere de biomarcadores altamente específicos que mejoren el diagnóstico de esta enfermedad (Sexton *et al.*, 2020).

## 2.2. Métodos diagnósticos en CaG

Los síntomas más comunes asociados con el CaG son indigestión (dispepsia), anorexia (falta de apetito) o saciedad temprana, pérdida de peso y dolor abdominal. Puede ocurrir disfagia o regurgitación en tumores gástricos proximales o cánceres ubicados en la unión gastroesofágica. La anemia puede estar presente en los tumores sangrantes. Si los síntomas están presentes en el momento del diagnóstico, la enfermedad suele ser avanzada e incurable (Smyth *et al.*, 2020). De hecho, la mayoría de los pacientes diagnosticados con CaG se encuentran en estadios avanzados, donde las estrategias de tratamiento de quimioterapia convencional resultan ser poco efectivas, por lo que en la mayoría de los pacientes la tasa de supervivencia promedio a 5 años es menor al 20%

debido frecuentemente al desarrollo de resistencia a los tratamientos de quimioterapia (Xu *et al.*, 2015).

El CaG se diagnostica mediante examen endoscópico durante el cual se determina la localización del tumor dentro del estómago, su tipo macroscópico, y se toman biopsias para confirmación histológica (**Fig. 2**). La estadificación clínica determina si el enfoque del tratamiento será curativo o paliativo. Todos los pacientes deben clasificarse en etapas de acuerdo con la última edición de la Unión para el Control Internacional del Cáncer (UICC, por sus siglas en inglés) y el Comité Conjunto Estadounidense sobre el Cáncer (AJCC, por sus siglas en inglés) (Smyth *et al.*, 2016; Amin *et al.*, 2017). El sistema de estadificación del AJCC también se llama sistema de estadificación TNM [es decir, tumor (T), nódulos linfáticos (N) y metástasis (M)]. Cada una de estas tres categorías tiene números que van del 0 al 4 y definen la gravedad y la propagación de cada categoría. La categoría T varía de 0 a 4 y describe qué tan lejos se ha diseminado el tumor primario a través de las cinco capas del estómago. La clasificación T significa que el tumor está *in situ* o en su posición original. La categoría N varía de 0 a 3 y describe los nódulos linfáticos regionales a los que se ha diseminado el cáncer. La categoría M varía de 0 a 1 y describe las partes distantes del cuerpo que el cáncer ha invadido. También hay una clasificación "X" para cada categoría, lo que significa que no se puede evaluar por falta de información (Lyons *et al.*, 2018).



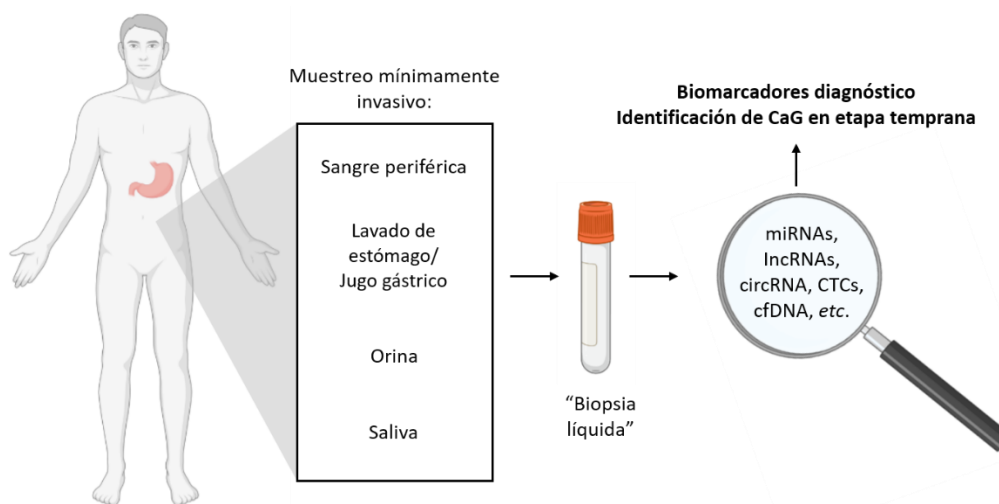
**Fig. 2. Endoscopia superior.** Un endoscopio (tubo delgado con iluminación) se inserta por la boca para identificar áreas anormales en el esófago, el estómago y la primera parte del intestino delgado. Por lo general, se realiza una biopsia del estómago durante la endoscopia para observarse bajo un microscopio y verificar si hay signos de cáncer. Tomado de Web site of the National Cancer Institute (<https://www.cancer.gov>).

Las innovaciones recientes en las técnicas utilizadas durante la endoscopia gastrointestinal han permitido una notable mejora en la capacidad para detectar lesiones neoplásicas tempranas. La cromosendoscopia con rociado de tinte índigo previamente desempeñó un papel importante en la identificación de lesiones tempranas. La endoscopia de aumento con imágenes de banda estrecha (NBI, por sus siglas en inglés) ha experimentado mejoras tecnológicas, permitiendo la observación de la arquitectura microvascular de la mucosa y el patrón de microsuperficie de la lesión, y es útil para evaluar el área de la lesión y la profundidad de la invasión tumoral (Ezoe *et al.*, 2011; Nagahama *et al.*, 2011). La ecografía endoscópica es más beneficiosa para identificar tumores raros en etapa temprana (T1; AJCC), que puede beneficiarse de la resección endoscópica o la cirugía inicial. Sin embargo, la mayoría de los tumores son T2 a T4 y existen limitaciones conocidas en la capacidad de la ecografía endoscópica y las imágenes para identificar con precisión las metástasis ganglionares (Ikoma *et al.*, 2017).

Los resultados de los pacientes con CaG avanzado dependen en gran medida de si se realiza o no una resección curativa. Las metástasis en el hígado y los nódulos linfáticos pueden estar asociadas con la resección no curativa y se han diagnosticado con mayor precisión debido a los avances recientes en las tecnologías de diagnóstico por imágenes, como la tomografía computarizada (CT, por sus siglas en inglés) y la resonancia magnética por imágenes (MRI, por sus siglas en inglés) (Takahashi *et al.*, 2013). La tomografía por emisión de positrones (PET, por sus siglas en inglés) es útil para detectar metástasis ocultas en CT, pero es menos sensible en cáncer de tipo difuso (Smyth *et al.*, 2012). La diseminación peritoneal, que ha sido difícil de identificar mediante técnicas de diagnóstico por imágenes convencionales, es la manifestación no curativa más frecuente en pacientes con CaG. De manera que, la laparoscopia de estadificación (SL, por sus siglas en inglés), permite proporcionar un diagnóstico preciso de diseminación peritoneal e invasión extraserosa, y la capacidad para realizar lavado peritoneal para un estudio citológico. En pacientes con CaG avanzado para quienes las imágenes no arrojan un diagnóstico, la citología de lavado peritoneal obtenida antes del tratamiento puede ser muy importante para la planificación del tratamiento (Burke *et al.*, 1997; Lowy *et al.*, 1996).

Por lo anteriormente descrito, desafortunadamente, el diagnóstico del CaG se basa solo en procedimientos invasivos como la endoscopia digestiva y la histología. No obstante, son necesarios otros criterios para definir mejor la población de pacientes con gastritis atrófica o metaplasia intestinal más susceptibles de beneficiarse de la vigilancia sistemática. Por lo tanto, existe una gran

necesidad de pruebas menos invasivas o no invasivas, pero también de biomarcadores altamente específicos en el caso del CaG. En este sentido, una “biopsia líquida”, que es una muestra de cualquier líquido corporal que puede contener material genético de un tumor, como la sangre periférica, orina o saliva, lavado de estómago/jugo gástrico; representa una fuente de potenciales biomarcadores específicos, proporcionando datos importantes para la detección y el diagnóstico del CaG (Petryszyn *et al.*, 2020; Necula *et al.*, 2019). Entre las opciones de biopsia líquida, las muestras de sangre de pacientes con cáncer son las más estudiadas debido a que contienen células tumorales circulantes (CTCs, del inglés *Circulating Tumor Cells*), proteínas, ácidos nucleicos libre de células y vesículas derivadas de células, como los exosomas (Fig. 3) (Siravegna *et al.*, 2017).



**Fig. 3. Posibles biomarcadores diagnóstico no invasivos para el CaG en etapa temprana.** Las alteraciones genéticas y epigenéticas, los microRNA, los RNA largos no codificantes, el RNA circular, las células tumorales circulantes y el DNA tumoral, obtenidas de biopsias líquidas, representan candidatos prometedores para el desarrollo de nuevos métodos no invasivos en el diagnóstico precoz del cáncer gástrico. CaG: Cáncer gástrico; miRNA: MicroRNA; lncRNA: RNA largos no codificantes; circRNA: RNA circular; CTC: Células tumorales circulantes; cfDNAs: DNA circulante libre de células. Tomado y modificado de Necula *et al.*, 2019.

Actualmente, los biomarcadores tumorales más utilizados en la clínica para la detección precoz del CaG son el antígeno carcinoembrionario (CEA, por sus siglas en inglés), los antígenos con carbohidratos (CA, por sus siglas en inglés): CA19-9, CA72-4, CA125, CA24-2, CA50, así como el pepsinógeno y la  $\alpha$ -fetoproteína (AFP). Sin embargo, la especificidad y la sensibilidad de estos biomarcadores séricos son bajas y, hasta el momento, ninguno de ellos es único para el diagnóstico del CaG (Tsai *et al.*, 2016; Tong *et al.*, 2016). Por lo tanto, el desarrollo de un método de detección mejorado para diagnosticar el CaG en etapas tempranas es crucial, especialmente sabiendo que la

mayoría de los pacientes son asintomáticos hasta que la enfermedad progresa a etapas avanzadas (Necula *et al.*, 2019). En este contexto, los RNA pequeños no codificantes, como los microRNA se están investigando actualmente en el CaG como nuevos biomarcadores, debido a que se pueden encontrar en una gran variedad de biofluidos, son extremadamente estables fuera de las células, son relativamente fáciles de adquirir y, acorde con su actividad regulatoria, su expresión alterada puede reflejar una condición fisiopatológica de utilidad diagnóstica y pronóstica (Sohel, 2020).

### 2.3. Biogénesis y características de los microRNA (miRNAs)

Los microRNA (miRNA) son RNA monocatenarios no codificantes de ~19-24 nucleótidos (nt) de longitud que se generan a partir de transcritos endógenos en forma de horquilla. Los miRNA funcionan como moléculas guía en la regulación génica postranscripcional mediante un apareamiento de bases con los mRNA diana, lo que conduce a la escisión del mRNA o a la represión de la traducción. Al silenciar varios mRNA objetivo, los miRNA tienen funciones clave en diversas vías reguladoras, incluido el control del desarrollo, la diferenciación de células hematopoyéticas, la apoptosis, la proliferación celular y el desarrollo de órganos (Kim, 2005). Con más de 200 miembros por especie en eucariotas superiores, los miRNA son una de las familias de genes más grandes y representan aproximadamente el 1 % del genoma (Bartel, 2004).

Los genes de miRNA pueden variar ampliamente en su ubicación en el genoma. En algunos casos, los genes de miRNA contienen sus propios promotores y potenciadores independientes. En humanos y ratones, alrededor del 40 % de los miRNA están ubicados dentro de los intrones de unidades de transcripción codificantes o no codificantes de proteínas, y el 10 % están dentro de los exones (Rodríguez *et al.*, 2004). También, aproximadamente el 50% de los genes de miRNA se encuentran en grupos que inicialmente se transcriben a partir de una unidad de transcripción policistrónica que posteriormente se escinde en múltiples miRNA. En la mayoría de los casos, los miRNA policistrónicos comparten el mismo patrón de expresión (Zhao & Srivastava, 2007).

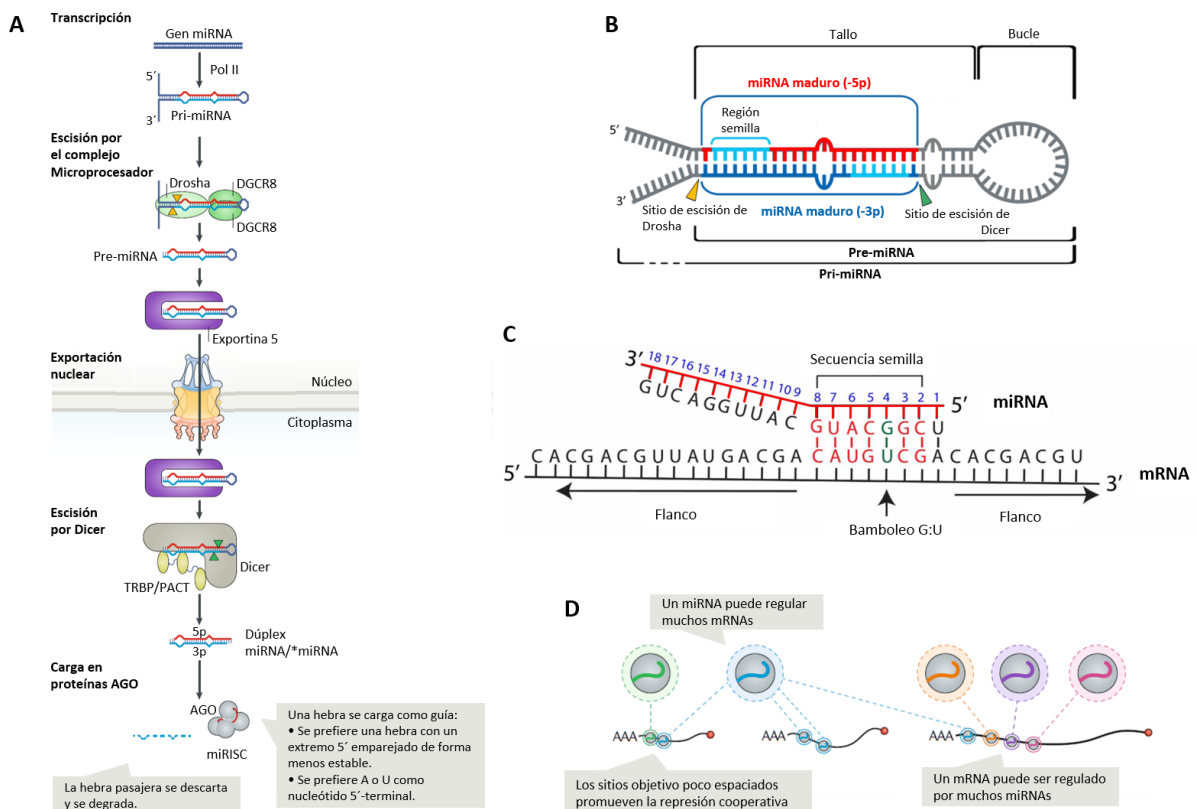
La transcripción de la mayoría de los genes de miRNA está mediada por la RNA polimerasa II (Pol II) (**Fig. 4A**), aunque existe la posibilidad de que un pequeño número de genes de miRNA puedan ser transcritos por otras RNA polimerasas. Por lo tanto, la transcripción dependiente de Pol II permite que los genes de miRNA se regulen de manera elaborada en condiciones y tipos de células específicos (Kim *et al.*, 2009). En humanos, canónicamente la Pol II genera transcritos primarios de

miRNA (pri-miRNA) con varios cientos de nt de longitud, en forma de tallo-bucle (**Fig. 4B**). El pri-miRNA es procesado dentro del núcleo por un complejo multiproteico llamado Microprocesador, cuyos componentes centrales son una enzima RNasa III llamada Drosha y la proteína de unión a RNA de doble cadena (dsRNA, del inglés *double stranded-RNA*) DGCR8/Pasha (Bushati & Cohen, 2007). Este complejo escinde el pri-miRNA, produciendo un miRNA precursor (pre-miRNA) con forma de horquilla prematura de ~70-120 nt de longitud. Tras el procesamiento nuclear, los pre-miRNA se exportan al citoplasma mediante la exportina 5 (Exp-5), un miembro de la familia de receptores de transporte nuclear, que reconoce un tallo de dsRNA más un “saliente” corto 3’ de ~1-8 nt en el pre-miRNA para ejercer la acción (Kim, 2004; Bohnsack *et al.*, 2004; Zeng & Cullen, 2004). En el citoplasma, el pre-miRNA es escindido cerca del bucle terminal, liberando un dúplex de miRNA de ~18-23 nt de largo por otra enzima RNasa III llamada Dicer, la cual interactúa junto con dos proteínas; la proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación (TRBP, del inglés *TAR RNA-binding protein*) y, en células humanas, la proteína activadora de la proteína quinasa inducida por interferón (PACT). Posteriormente, las dos hebras de miRNA se separan, dependiendo de varios factores como la asimetría termodinámica del dúplex y la estabilidad de emparejamiento de bases en el extremo 5’. Una hebra, denominada “hebra guía”, junto con las proteínas de unión a dsRNA antes mencionadas, se asocia con proteínas argonauta (AGO), formando un complejo de ribonucleoproteína llamado complejo silenciador inducido por miRNA (miRISC, del inglés *miRNA-induced silencing complex*). La hebra de miRNA con el emparejamiento de bases inestable en el extremo 5’ generalmente actúa como la hebra guía, mientras que la hebra con apareamiento de bases estable en el extremo 5’ (“hebra pasajera” o miRNA\*) generalmente se degrada o, en casos raros, incluso se asocia con proteínas AGO, lo que permite que ambas hebras sirvan como miRNA funcionales (Bhaskaran & Mohan, 2014).

Una vez que el miRNA es incorporado en RISC, se dirige al mRNA diana a través de complementariedad de secuencia. El reconocimiento de objetivos se realiza principalmente a través del emparejamiento de bases entre la región llamada de “semilla” en el extremo 5’ del miRNA (región de 2-8 nt de longitud) y los sitios dentro de la región no traducida 3’ (3'-UTR) de los mRNA diana (**Fig. 4C**) (Bartel, 2009; Krol *et al.*, 2010). El grado de complementariedad entre el mRNA y la región de semilla generalmente determina si el mRNA se degrada y/o se reprime su traducción. En casos de complementariedad perfecta o casi perfecta con el miRNA, el mRNA diana se escinde y se degrada, actividad que depende de proteínas AGO en donde la actividad endonucleasa de AGO2

inicia la escisión del mRNA. Por otro lado, en caso de un emparejamiento incompleto (la cual ocurre principalmente en células animales), tiene lugar la represión de la traducción mediada por miRISC y posteriormente se degrada el mRNA (Kim, 2005; Kim *et al.*, 2008). Se cree que tanto la represión de la traducción como la degradación del mRNA están interconectados, y diversos estudios revelaron que la degradación del mRNA es generalmente responsable del 66–90 % del silenciamiento (Guo *et al.*, 2010; Eichhorn *et al.*, 2014).

Un miRNA puede silenciar cientos de genes, aunque el efecto sobre cada gen es generalmente leve y múltiples miRNAs pueden regular el mismo gen. Además, las vías celulares enteras pueden ser reguladas por miRNAs individuales o grupos de miRNAs (Fig. 4D). De manera que, los miRNAs pueden apagarse o funcionar como sintonizadores finos de la expresión de mRNAs y, por lo tanto, amortiguar el ruido en la expresión génica (Gebert & MacRae, 2019).



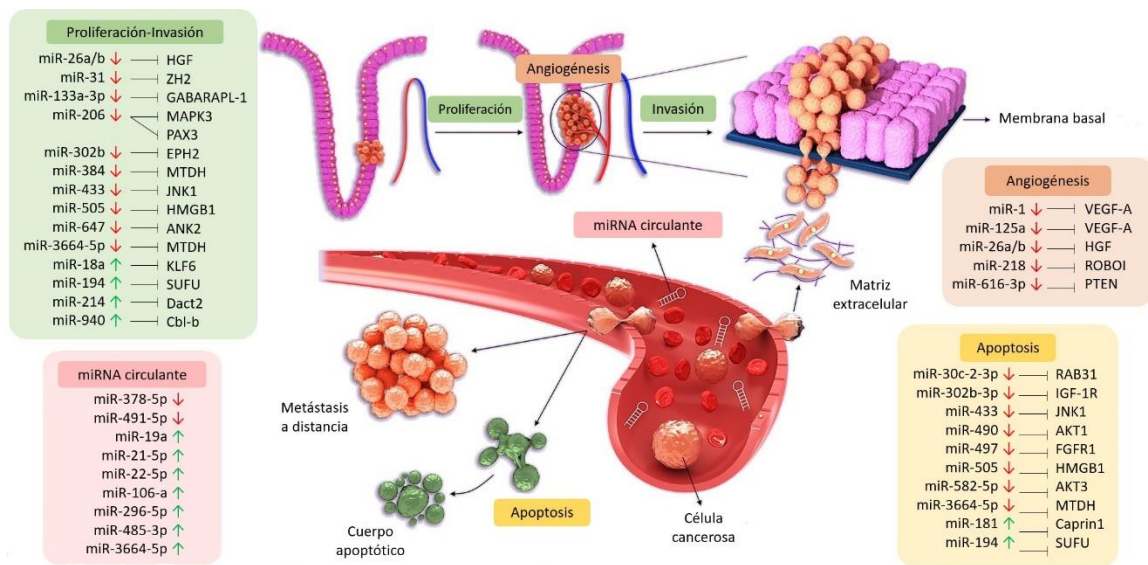
**Fig. 4. Descripción general de la biogénesis y función de los miRNAs. A |** La biogénesis canónica de los miRNAs se divide en procesamiento nuclear y procesamiento citoplasmático. Al comienzo del procesamiento nuclear, se generan transcripciones de miRNA primarios (pri-miRNA) a partir de genes de miRNA a través de la actividad de la RNA polimerasa II (Pol II). El complejo de microprocesador compuesto por la RNasa III Drosha y DGCR8 escinde los pri-miRNA para producir

miRNA precursores (pre-miRNA). Exportina 5 transporta estos pre-miRNA desde el núcleo hasta el citoplasma. En el citoplasma, la RNasa III Dicer escinde los pre-miRNA para producir dúplex de miRNA (miRNA/miRNA\*). En vertebrados, la escisión por Dicer está modulada por la proteína de unión al RNA en respuesta transactivación (TRBP) y el activador de proteínas de la proteína quinasa inducida por interferón (PACT). Una hebra del dúplex miRNA/miRNA\* maduro ("hebra guía") se carga en proteínas AGO para producir el complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC), mientras que la otra hebra ("hebra pasajera") se degrada. Se da preferencia de carga a la hebra que posee el extremo 5' emparejado menos estable. **B** | Generalidades de la estructura de un pri-miRNA en la que se ilustran los sitios de escisión para Drosha y Dicer. Se muestran los miRNA maduros ubicados en el tallo (resaltados en rojo y azul) y sus regiones de semillas correspondientes (resaltadas en azul claro). **C** | Interacción canónica de un miRNA con su mRNA diana. Los números en azul muestran los nucleótidos que posicionan al miRNA. La secuencia semilla se refiere a los nucleótidos en el número de posición de miRNA. Flanco se refiere a la secuencia de mRNA a ambos lados de la región correspondiente a la secuencia semilla del miRNA. Los emparejamientos de tipo Watson-Crick en la secuencia de semillas se muestran en rojo, y un ejemplo de bamboleo de G-U en la secuencia de semilla se muestra en verde. **D** | Los miRNA forman redes complejas de interacciones, ya que un miRNA puede dirigirse a muchos mRNA diferentes, y un mRNA puede ser regulado por muchos miRNA diferentes, con la represión cooperativa lograda mediante la unión de sitios diana muy próximos entre sí. Tomado y modificado de Gebert & MacRae, 2019; Jevsinek-Skok *et al.*, 2013; Peterson *et al.*, 2014.

## 2.4. miRNAs en CaG

Muchos estudios han demostrado la importancia de los miRNAs en la biología del cáncer mediante el control de la expresión de sus mRNA diana para facilitar el crecimiento tumoral, la invasión, la angiogénesis y la evasión inmune (Kasinski & Slack, 2011; Stahlhut & Slack, 2013). Los miRNAs desregulados en cáncer actúan como oncogenes (oncomiRs), o como genes supresores de tumores (anti-oncogenes). Los oncomiR están regulados positivamente en el cáncer y suprimen su gen supresor de tumores diana. Por el contrario, los miRNAs supresores de tumores están regulados a la baja en la malignidad, y como resultado, sus oncogenes diana se sobreexpresan (Saliminejad *et al.*, 2018). En varios tipos de cáncer, incluido el CaG, se ha observado una expresión aberrante de miRNAs que pueden actuar como un oncogén o un gen supresor de tumores, dependiendo diversos factores tales como estrés ambiental, inanición, hipoxia, estrés oxidativo o daño en el ADN, que desregulan su biogénesis en varios tejidos (Syeda *et al.*, 2020). En el caso particular de CaG, varios oncomiRs y genes supresores de tumor que actúan sobre genes blanco participantes en la proliferación, migración, invasión, angiogénesis y apoptosis, han sido descritos (**Fig. 5**) (Azarbarzin *et al.*, 2020).





**Fig. 5. Recopilación de miRNAs que contribuyen al desarrollo de CaG.** Ilustración esquemática de algunos miRNAs desregulados en CaG que contribuyen a varios mecanismos celulares y de desarrollo del cáncer, como proliferación, apoptosis, invasión, migración y angiogénesis. También se muestra algunos miRNAs que se han encontrado desregulados en circulación. Tomada y modificada de Azarbarzin *et al.*, 2020.

Una de las características biológicas más interesantes de los miRNAs es la estabilidad única a la degradación endógena y exógena (Mitchell *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008). La estabilidad de los miRNAs se ha explicado en parte por el tamaño reducido y, probablemente lo más importante, por formar complejos con lipoproteínas que incluyen a las microvesículas y exosomas que contienen a los miRNAs. En la actualidad, se han detectado miRNAs en casi todos los fluidos corporales estudiados, como sangre, heces, fluidos peritoneales y cerebrospinales, etc. Debido a esas propiedades, los miRNA tienen un enorme potencial como biomarcadores y recientemente se han explorado en CaG (Link *et al.*, 2012; Link & Goel, 2013). Al explorar la utilidad de los miRNAs circulantes como biomarcadores para la detección del CaG en una etapa temprana, se ha encontrado que la concentración plasmática de miR-17-5p, miR-21, miR-106a y miR-106b fue significativamente menor en los pacientes con CaG que en los individuos sanos (Tsujiura *et al.*, 2010). En otro estudio, se encontró que el nivel de expresión de miR-221-3p, miR-376c-3p y miR-744-5p cambió significativamente en el suero de pacientes con CaG, 5 años antes de la aparición de los síntomas clínicos (Song *et al.*, 2012). Además, se ha demostrado que el nivel de expresión de miR-203 y miR-218 circulante en suero está estrechamente asociado con la metástasis de CaG (Xin *et al.*, 2014; Imaoka *et al.*, 2016). En otro estudio, se demostró que el miR-196a circulante puede servir como un biomarcador potencial para discriminar CaG, ya que su expresión se redujo

significativamente en el plasma de estos pacientes respecto a la de los individuos sanos (Tsai *et al.*, 2016). Por otro lado, se demostró que los niveles de expresión de miR-21, miR-93, miR-106a y miR-106b circulantes fueron significativamente más altos en el suero de pacientes con GC que en donadores sanos, con 82,2% de precisión (Zhao *et al.*, 2018). Puesto que el factor pronóstico crucial en CaG es la metástasis ganglionar (LNM), se ha reportado que el nivel de expresión de miR-143-3p, miR-146a, miR-451a y miR-501-3p circulantes parecen prometedores en la detección de pacientes con CaG que desarrollan LNM y proporciona información de pronóstico para LNM (Jiang *et al.*, 2017). Aunque el miR-21 circulante se ha propuesto como biomarcador de CaG en varios estudios, se considera uno de los oncomiR más estudiados y se encuentra asociado con muchos otros tipos de cáncer. Por lo tanto, el miR-21 circulante puede considerarse un biomarcador global para varios tipos de cáncer, pero no para un cáncer específico como el CaG. En la **Tabla 1** se muestran miRNAs circulantes identificados en CaG (Sohel, 2020).

**Tabla 1. Expresión diferencial de miRNAs circulantes en CaG con potencial biomarcador.** Tomada y modificada de Soheli, 2020.

Nombre del miRNA	Tipo de muestra	Regulación de la expresión	Área bajo la curva	Sensibilidad y especificidad	Potencial biomarcador	Referencias
miR-221, miR-744, & miR-376c	Suero	↑	0.70-0.74	82.4% & 58.8%	Si	[Song et al., 2012]
miR-203	Suero	↓	0.707	No calculada	-	[Imaoka et al., 2016]
miR-196a	Plasma	↑	0.864	69.5% & 97.6%	Si	[Tsai et al., 2016]
miR-106a, miR-106b, miR-21, & miR-93	Plasma	↑	0.887	84.8% & 79.2%	Si	[Zhao et al., 2018]
miR-143-3p, miR-146a, miR-451a, & miR-501-3p	Suero	↓	0.891	63.33% & 87.78%	Si	[Jiang et al., 2017]
miR-21	Plasma	↑	0.893	86.7% & 72.2%	Si	[Emami et al., 2018]
miR-22-3p	Plasma	↓	0.8494	91.70% & 65.40%	Si	[Chen et al., 2018]
miR-101	Plasma	↓	0.740	56.3% & 82.5%	Si	[Imamura et al., 2017]
miR-19b-3p, & miR-106a-5p	Exosoma sérico	↑	0.826	95% & 90%	Si	[Wang et al., 2017]
miR-106a, miR-18a, miR-20b, miR-486-5p, & miR-584	Plasma	↑	0.95	85.7% & 95.8%	Si	[Zhou et al., 2017]
miR-217	Plasma	↓	0.893	81.3% & 83.2%	Si	[Liu et al., 2017]

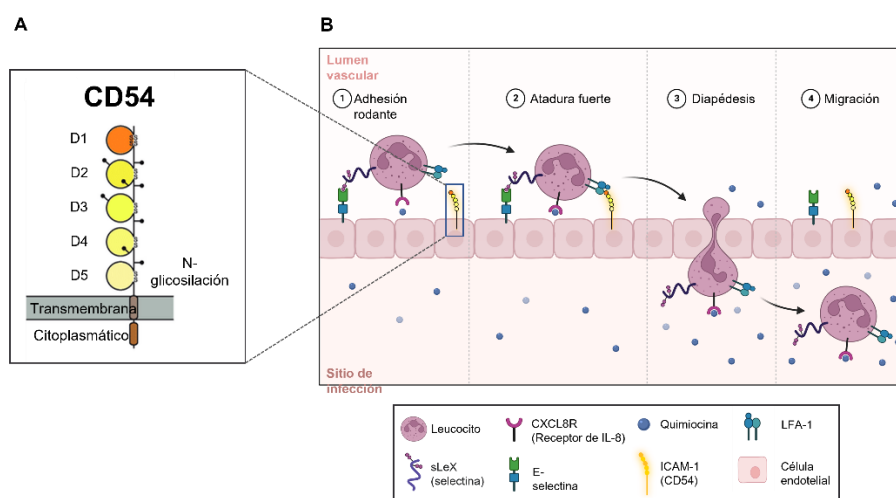
↑ = Regulado al alza; ↓ = Regulado a la baja.

Por otra parte, los miRNA se desregulan comúnmente en la mucosa gástrica durante la infección por *H. pylori* y de manera escalonada desde la gastritis crónica, pasando por afecciones preneoplásicas como gastritis atrófica y la metaplasia intestinal, hasta la displasia temprana y el cáncer invasivo (Link & Kupcinskas, 2018). Por ejemplo, en pacientes con CaG recurrente se ha encontrado fuertemente incrementada la expresión de miR-335-5p circulante en relación a pacientes con CaG no recurrente, y mediante análisis geneontológico se encontró que dicho miRNA

participa en vías de señalización oncogénicas tales como p53, MAPK, TGF- $\beta$ , Wnt, ERbB, mTOR, receptores tipo Toll y adhesiones focales (Yan *et al.*, 2012). De hecho, en un estudio reciente se demostró que el nivel de expresión del miR-335-5p disminuye, mientras que el nivel de expresión de ICAM-1 incrementa en cáncer de tiroides al interactuar con la región 3'-UTR del mRNA de ICAM-1 e inhibir su expresión, sugiriendo su participación en la regulación de esta molécula de adhesión (Luo *et al.*, 2018).

## 2.5. Molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o CD54

ICAM-1 o CD54, es una glicoproteína transmembrana que pertenece a la superfamilia de las inmunoglobulinas (Ig) y consta de cinco dominios Ig extracelulares, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático corto con múltiples residuos de treonina (**Fig. 6A**). CD54 se expresa en muchas células como leucocitos, fibroblastos, plaquetas, células endoteliales, células epiteliales, plaquetas y células gliales (Ramos *et al.*, 2014). Su función se ha estudiado mejor en la migración transendotelial de leucocitos, donde CD54 regula las interacciones adhesivas y de movimiento de leucocitos sobre la pared del vaso sanguíneo favoreciendo el cruce de leucocitos de la capa endotelial (Wee *et al.*, 2009; Gorina *et al.*, 2014). Más recientemente, los estudios funcionales identificaron que CD54 participa en la resolución de lesiones epiteliales, las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas en la inflamación y la tumorigénesis (**Fig. 6B**) (Kong *et al.*, 2018).



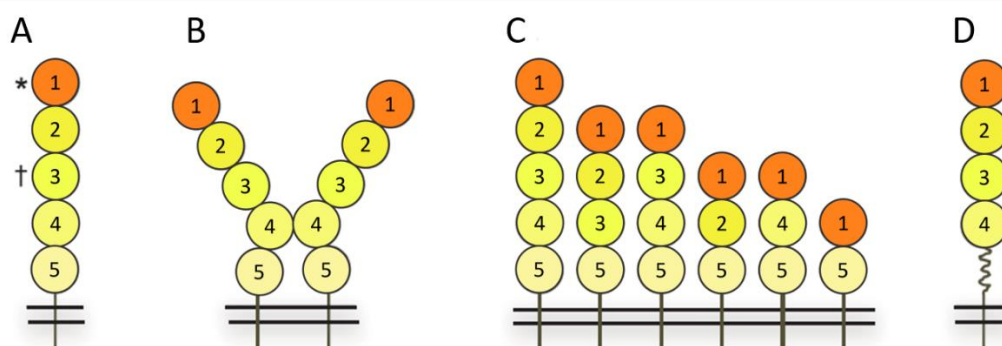
**Fig. 6. Estructura de CD54 y su función en el rodamiento de leucocitos a sitios de inflamación. A** | CD54 consta de 5 dominios inmunoglobulina (Ig) (D1~D5), un dominio transmembrana, un dominio citoplasmático y contiene 8 sitios de N-

glicosilación. Los enlaces disulfuro en los dominios a Ig se forman entre los residuos de cisteína que estabilizan la estructura. **B** | 1. Rodamiento de los leucocitos mediada por la interacción de E-selectinas y sus ligandos a lo largo de la superficie endotelial, 2. Las quimiocinas mostradas en las células endoteliales se unen a sus receptores e incrementan la afinidad de las integrinas y unión firme de los leucocitos al endotelio, mediada por integrinas como LFA-1 que se une a CD54, 3. Transmigración (diapédesis) de los leucocitos a través del endotelio, 4. Migración de los leucocitos al foco de infección y lesión tisular. Adaptado de "Migración de leucocito en sitios de infección", por BioRender.com (2020). Obtenido de <https://app.biorender.com/biorender-templates>

CD54 está fuertemente glicosilado y contiene múltiples sitios de N-glicosilación (8 en humanos) y se requieren N-glicanos para la expresión superficial de la proteína (Scott & Patel, 2013). El peso molecular de esta proteína varía según el grado de glicosilación en los dominios Ig y oscila entre 80 y 114 kDa, mientras que la forma desglicosilada tiene un peso molecular de 60 kDa (Staunton *et al.*, 1988; Dustin *et al.*, 1986; Rothlein *et al.*, 1986). Estos dominios Ig glicosilados median las interacciones de CD54 con sus ligandos. La dimerización y agrupación a través de la unión homotípica entre los cuartos dominios Ig de CD54 puede formar un homodímero, aumentando significativamente la afinidad a sus ligandos afines como: el antígeno asociado a la función de los linfocitos 1 (LFA-1; CD11a/ CD18) y el antígeno macrófago 1 (Mac-1; CD11b/CD18), integrinas leucocitarias de la familia  $\beta 2$  (Miller *et al.*, 1995; Frick *et al.*, 2005). Además de LFA-1 y Mac-1, CD54 se une a múltiples ligandos, incluidos el fibrinógeno, hialuronano, PfEMP1 (una proteína de membrana de glóbulos rojos de *Plasmodium falciparum*) y los principales grupos de rinovirus (HRV). La mayoría de los ligandos de CD54 se unen al primer dominio Ig, aunque se ha demostrado que Mac-1 se une al tercer dominio Ig (Diamond *et al.*, 1991; McCourt *et al.*, 1994; Languino *et al.*, 1995; Ockenhouse *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 2000; Tse *et al.*, 2004).

Al igual que con otros miembros de la superfamilia de Ig, CD54 se regula postranscripcionalmente mediante corte y empalme alternativo, lo que genera seis variantes unidas a la membrana y una proteína soluble secretable (sICAM-1). Todas las isoformas unidas a la membrana contienen al menos 2-5 dominios Ig, de los cuales los dominios Ig 1 y 5 son constantes, y los dominios variables 2, 3 y 4, definen la especificidad de unión de CD54 a sus ligandos (**Fig. 7**) (King *et al.*, 1995; Robledo *et al.*, 2003). Por lo tanto, el empalme alternativo puede dictar la función de CD54 en varias condiciones patológicas. Por otro lado, el isómero soluble de CD54 es de longitud completa y tiene los cinco dominios Ig y su transcrito de mRNA carece del dominio transmembrana (Ramos *et al.*, 2014). CD54 soluble, también se genera como resultado de la acción proteolítica de la elastasa de neutrófilos, la catépsina G y otras enzimas bacterianas sobre CD54 unida a la membrana (Budnik *et al.*, 1996; Champagne *et al.*, 1998; Wakatsuki *et al.*, 1995). La expresión de CD54 soluble es, en parte,

específica de células (células mononucleares de sangre periférica y endoteliales) y está modulada por citocinas como IFN-1 $\alpha$ , además de estar presente principalmente en el suero sanguíneo y el líquido cefalorraquídeo durante las infecciones y la inflamación (Pietruczuk *et al.*, 2004; Giorelli *et al.*, 2002). La concentración de CD54 presente en una muestra de suero de cualquier persona normal es aproximadamente de 100–450 ng/ml. Una mayor concentración de CD54 soluble se ha correlacionado con la gravedad de las enfermedades cardiovasculares, los trastornos autoinmunitarios y muchos tipos de cáncer (Chen *et al.*, 2017; Chen *et al.*, 2016; López-Campos *et al.*, 2012; Tsai *et al.*, 2019). De hecho, se ha observado que el nivel sérico de CD54 soluble se correlacionó positivamente con el tamaño del tumor, invasión a los ganglios linfáticos y metástasis a distancia en cáncer de mama, de páncreas, cáncer gástrico, cáncer de pulmón y carcinoma hepatocelular (Meng-Meng *et al.*, 2012). En un estudio donde se analizaron los niveles de CD54 soluble entre donadores sanos y pacientes con CaG, se encontró que niveles >337 ng/ml de CD54 soluble en suero puede ayudar a predecir la presencia de CaG (Alexiou *et al.*, 2003).



**Fig. 7. Representación esquemática de las isoformas de CD54 y su organización.** **A** | Isoforma canónica de CD54 de longitud completa con 5 dominios Ig y dominios transmembrana e intracelulares. \* indica el sitio de unión para LFA-1 y otros ligandos en el primer dominio Ig; † indica el sitio de unión de Mac-1 en el tercer dominio Ig. **B** | Las isoformas de longitud completa de CD54 se dimerizan por interacción a través de los cuartos dominios de Ig. **C** | Las seis isoformas de CD54 de membrana expresadas en células endoteliales y otros tipos de células. **D** | El empalme alternativo en el exón 6 conduce al truncamiento del dominio 5 de Ig en la isoforma completa en condiciones inflamatorias. En cada panel, los círculos representan un dominio similar a Ig. La numeración de cada dominio Ig se basa en la isoforma completa que contiene cinco dominios similares a Ig. Tomada y modificada de Ramos *et al.*, 2014.

## 2.6. Papel de CD54 en Cáncer

Diversos estudios han demostrado la correlación entre la expresión de CD54 en la progresión e inhibición de muchas enfermedades. La participación de CD54 en células cancerosas es innegable.

Los estudios han demostrado niveles altos de CD54 en adenocarcinoma de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma, carcinoma oral de células escamosas, etc. (Bui *et al.*, 2020). Se ha encontrado que CD54 se expresa en casi todas las células del microambiente tumoral (TME, del inglés *tumor micro-environment*) (Reina & Espel, 2017) y, además, es responsable de la polarización en macrófagos asociados a tumores (TAM, del inglés *tumor-associated macrophages*) (Gu *et al.*, 2017).

Al igual que con el sitio del tumor primario, se ha documentado la regulación positiva de CD54 durante la metástasis (Rosette *et al.*, 2005; Sokeland & Schumacher, 2019). Una inducción de la expresión de CD54 por parte de las células infiltrantes y residentes del tumor tanto en los sitios primarios como secundarios indica un papel importante de este receptor durante la tumorigénesis (Bui *et al.*, 2020). Dadas sus propiedades putativas, la CD54 expresada por las células tumorales puede influir en el desarrollo del tumor, ya sea mediante la promoción de interacciones adhesivas tumor-célula inmunitaria o mediante la transmisión de señales de afuera hacia adentro para regular la función de las células tumorales. Apoyando la idea de la retención de células inmunitarias dependiente de CD54, análisis histológicos de tejido de cáncer de mama correlacionaron la expresión alta de CD54 en células de cáncer de mama triple negativo (TNBC, del inglés *triple-negative breast cancer*) con la presencia de estructuras linfoides terciarias (TLS, del inglés *tertiary lymphoid structures*), regiones ricas en células T estrechamente asociadas con tumores invasivos y altamente inmunogénicos (Figenschau *et al.*, 2018). Aunque el reclutamiento y la retención de células T debido a CD54, por un lado, pueden mejorar la inmunovigilancia y restringir potencialmente el desarrollo tumoral. No obstante, se ha demostrado que la agregación de células T dentro de los tejidos tumorales afecta la función efectora de las células T infiltrantes, lo que permite que las células tumorales se desarrollen y puedan evadir el reconocimiento inmune y la lisis (Bui *et al.*, 2020).

Curiosamente, los análisis de secciones tumorales de pacientes con TNBC revelaron que las células tumorales que expresan CD54 estaban localizadas en el frente invasivo del tumor, una región que también estaba fuertemente infiltrada por células inmunitarias, particularmente linfocitos T (Guo *et al.*, 2014; Figenschau *et al.*, 2018). De manera similar, en el carcinoma oral de células escamosas, CD54 se enriqueció en la capa basal invasora, donde se observaron células T acumuladas y donde las respuestas inmunogénicas fueron impulsadas por la señalización de IFN- $\gamma$  dependiente de células T (Usami *et al.*, 2013). Esto sugiere que las células inmunitarias que se infiltran en el tumor

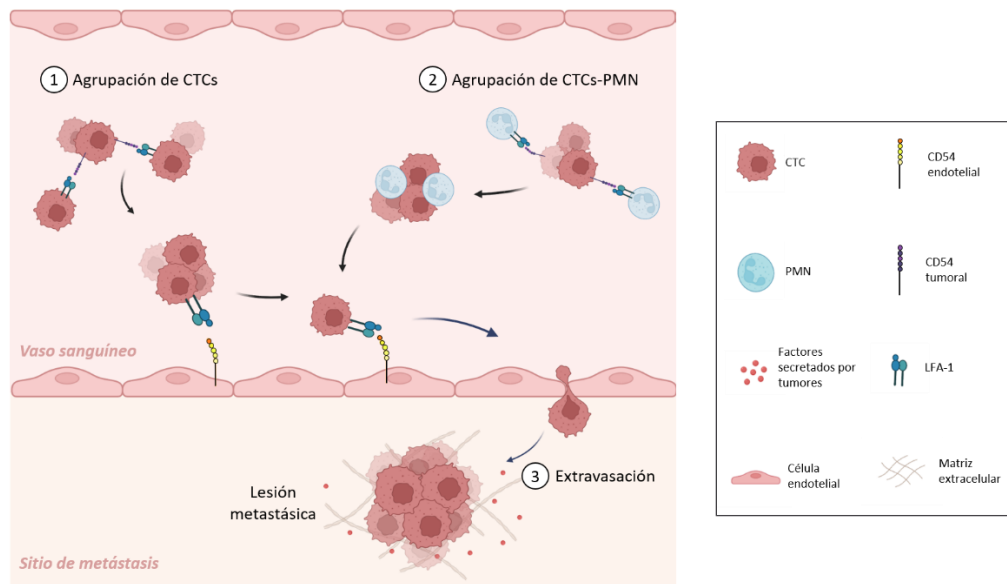
a través de la liberación de citoquinas pueden impulsar la expresión de CD54 en las células tumorales y, como tal, promover las interacciones entre el tumor y las células inmunitarias y mejorar la migración direccional de las células cancerosas. De hecho, el IFN- $\gamma$  se ha demostrado que induce la expresión de CD54 en células cancerosas, y, a su vez, se ha implicado a CD54 en la promoción de la migración de células cancerosas (Chang *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2006; Kesnakurti *et al.*, 2013).

Aunque no se ha definido bien la señalización específica de CD54 en células tumorales que pueden mejorar la migración, la evidencia de otros sistemas biológicos indica varias vías de señalización potenciales. Por ejemplo, CD54 a través de interacciones de unión con la integrina (mucina 1; MUC1), que se sobreexpresa en cánceres de mama, ovario, próstata y gástrico, puede activar la cascada de señalización promigratoria de MAPK/ERK en células tumorales vecinas (Hayashi *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2007; Ihermann-Hella *et al.*, 2014). CD54 también puede interactuar con los componentes de la matriz extracelular, como el fibrinógeno, para estimular la señalización promigratoria (Roche *et al.*, 2003; Tsakadze *et al.*, 2002).

La metástasis es una de las principales causas de mortalidad asociada al cáncer. Las células cancerosas se diseminan a los órganos secundarios al desprenderse del tumor primario y luego ingresar a la circulación. Estas CTCs tienen la capacidad de atravesar sitios distales para formar lesiones metastásicas (Seyfried & Huysentruyt, 2013; Pantel & Brakenhoff, 2004). La supervivencia de las CTCs en el torrente sanguíneo y su ubicación en órganos secundarios es esencial para la formación de metástasis (Wang *et al.*, 2018; Strilic & Offermanns, 2017). Curiosamente, la evidencia emergente indica un papel potencial de CD54 en la regulación de ambos procesos. Los análisis de CTCs de pacientes con cáncer de mama y modelos de xenoinjerto de ratón revelaron que, en circulación, las células tumorales tienden a unirse entre sí, formando grupos de CTCs. Dentro de estos grupos, los CTCs están protegidos del entorno hostil en la circulación y muestran una mayor capacidad proliferativa y potencial metastásico (Gkountela *et al.*, 2019; Szczerba *et al.*, 2019; Saini *et al.*, 2019).

Además, se descubrió que los grupos de CTCs se asociaban con las células inmunitarias, en particular con los neutrófilos polimorfonucleares (PMN), y estas asociaciones se redujeron sorprendentemente tras el desmontaje del grupo de CTCs (Szczerba *et al.*, 2019). Estas observaciones subrayan un papel potencial de los PMN y probablemente de otras células inmunitarias circulantes en la regulación de la supervivencia y la motilidad de las CTCs y, como

resultado, las propiedades metastásicas. Debido a que muchos subtipos de células tumorales y células inmunitarias co-expresan CD54 y varios ligandos de CD54, es posible que CD54 desempeñe un papel importante en la agrupación heterotípica de CTCs y PMN observada en estos estudios (**Fig. 8**) (Bui *et al.*, 2020).



**Fig. 8. Posibles mecanismos de acción por los que CD54 puede promover la metástasis tumoral.** **1** | A través de la unión a células tumorales que expresan integrinas  $\beta 2$  (LFA-1), CD54 puede favorecer la agrupación homotípica de células tumorales circulantes (CTCs). Los grupos de CTCs muestran una mayor supervivencia y potencial metastásico. **2** | A través de las integrinas  $\beta 2$  expresadas por las células inmunitarias, CD54 puede promover el agrupamiento de CTC con neutrófilos polimorfonucleares (PMN) a través de su interacción con la integrina  $\beta 2$ . Esta asociación aumenta la supervivencia y la proliferación de células tumorales. **3** | CD54 expresada por las células endoteliales pueden facilitar la captura y la extravasación de las células tumorales, de manera similar a los mecanismos de migración transendotelial que utilizan los leucocitos que expresan la integrina  $\beta 2$ . Creado con BioRender.com.

Finalmente, aunque está claro que la expresión de CD54 está altamente inducida en el TME, el valor pronóstico de CD54 en los resultados clínicos del paciente con cáncer sigue siendo algo controvertido. La mayor parte de la evidencia sugiere la función pro-tumoral de CD54. En muchos tipos de cáncer, incluidos el carcinoma oral de células escamosas, el carcinoma de pulmón, el cáncer gástrico y de mama, CD54 se ha implicado en la promoción del cáncer (Guo *et al.*, 2014; Usami *et al.*, 2013; De Vita *et al.*, 1998; Schroder *et al.*, 2011; Jung *et al.*, 2012). También se demostró que los niveles de CD54 son indicativos del grado del tumor y, como tales, pueden tener valor pronóstico en enfermedades metastásicas. Un estudio de pronóstico que comparó a 332 pacientes con



enfermedades pulmonares benignas con 387 pacientes con cáncer de pulmón encontró que los pacientes con estadio tumoral avanzado (estadio IV, alto riesgo metastásico) tenían niveles más altos de CD54 soluble que aquellos con un estadio más bajo (Sprenger *et al.*, 1997). Específicamente dentro del subgrupo en etapa IV, los pacientes con metástasis detectables tenían niveles significativamente más altos de CD54 soluble en comparación con aquellos con enfermedades localizadas. Estas observaciones respaldan las contribuciones de CD54 a la progresión metastásica, como se ha observado en estudios preclínicos utilizando modelos animales. Por tanto, al ser importante en la función del sistema inmunológico y tener funciones favorables en la metástasis tumoral, es importante comprender el mecanismo regulador detrás de la expresión de CD54, que se sabe que está controlado especialmente a nivel transcripcional. Al respecto, múltiples estudios han demostrado su regulación tanto a nivel pre/postranscripcional como a nivel epigenético. De hecho, muchos estudios han reforzado el efecto de diferentes microRNA (miRNA) en la regulación de la expresión de CD54 (Suárez *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2015; Luo *et al.*, 2018).

### 3. JUSTIFICACIÓN

El CaG es un problema de salud pública a nivel mundial, en el año 2020 se estimaron más de 1,000,000 de casos nuevos y más de 700,000 muertes a causa de esta enfermedad, lo que lo convierte en el quinto cáncer diagnosticado con mayor incidencia y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo en ambos sexos (GLOBOCAN, 2020). La mayoría de los casos que son diagnosticados como CaG desafortunadamente se detectan en estadios avanzados de la enfermedad, donde las estrategias de tratamiento convencional son poco efectivas, resultando en bajas tasas de supervivencia (<20% a 5 años). Se ha estipulado que la presencia de subpoblaciones de células tumorales denominadas Células Troncales Cancerosas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*), presentes en el estroma del tumor, favorecen el rápido crecimiento, desarrollo de metástasis y resistencia a los tratamientos (Se *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014). Nuestro grupo de trabajo caracterizó la presencia de células troncales de cáncer gástrico con un fenotipo ampliado (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>: GCSC) en tejidos tumorales de pacientes con esta neoplasia. En contraste, en tejidos gástricos de sujetos sin CaG, se identificaron poblaciones celulares con el fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>-</sup>, sugiriendo que la expresión de CD54 en estas subpoblaciones celulares puede ser importante en la fisiopatología de la enfermedad (Tesis de maestría de Gómez-Gallegos, 2017: manuscrito en proceso). De hecho, a partir de los tejidos tumorales de pacientes con CaG, se encontró que la expresión de la molécula de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) o CD54 está significativamente asociada con un estadio avanzado y una supervivencia más corta (Jung *et al.*, 2020).

Por otra parte, se ha propuesto que los patrones de expresión de los miRNAs (cuya función es regular la expresión génica postranscripcional) en los biofluidos se asocian con condiciones fisiopatológicas y pueden servir como biomarcadores no invasivos para la identificación temprana de enfermedades como el cáncer. En el caso particular de CaG se han detectado niveles disminuidos de algunos miRNAs en el plasma en relación con los de donadores sin CaG (Tsujiura *et al.*, 2010), sin embargo, su asociación con la fisiopatología de la enfermedad es poco conocida. Con base en lo anterior, el presente estudio tiene como finalidad conocer la expresión de miRNAs en el plasma de pacientes con CaG que pudieran estar relacionados a la presencia de CD54, el cual forma parte de los marcadores fenotípicos diferencialmente expresados en pacientes con CaG. Finalmente, de encontrarse miRNAs diferencialmente expresados en el plasma de los pacientes con CaG, es

indispensable evaluar su asociación con variables clínico-patológicas, lo cual puede ser de gran utilidad para el diagnóstico de la enfermedad.

#### **4. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Existen miRNAs que regulan la expresión de CD54 en el plasma de pacientes con CaG cuyos tejidos tumorales sean positivos a CD54 y que puedan asociarse con las variables clínico-patológicas?

#### **5. HIPÓTESIS**

Adicional a la observación de relación inversa entre CD54 y la supervivencia de pacientes con CaG, se sabe que CD54 es una proteína relevante para la migración celular, y que factores como los miRNAs pueden regular su expresión, además de que los miRNAs circulantes pueden ser utilizados como posibles biomarcadores de utilidad clínica, por lo que hipotetizamos la existencia de miRNAs en plasma de pacientes con CaG que pudieran regular a CD54, los cuales a su vez podrían tener alguna asociación con variables clínico-patológicas de valor diagnóstico de la enfermedad.

#### **6. OBJETIVOS**

##### **6.1. Objetivo general**

Evaluar la presencia de miRNAs dirigidos a CD54 en el plasma de pacientes con Cáncer Gástrico (CaG) y su asociación con variables clínico-patológicas.

##### **6.2. Objetivos particulares**

- 1.** Determinar el nivel de expresión de miRNAs dirigidos a CD54, en el plasma de pacientes con CaG.
- 2.** Determinar el nivel de expresión de miRNAs dirigidos a CD54, en el plasma de donadores sin CaG.
- 3.** Analizar la asociación entre el nivel de expresión de los miRNAs dirigidos a CD54 en plasma de pacientes con CaG con sus variables clínico-patológicas.

## 7. METODOLOGÍA

### 7.1. Población de estudio

En este trabajo se incluyeron 30 muestras de plasma de pacientes con CaG colectadas durante el periodo 2015-2016 y 30 muestras de plasma de donadores sin CaG colectadas en el año 2021. Se obtuvo el consentimiento informado firmado por pacientes con CaG y donadores sin CaG para su participación en el estudio. Los pacientes con CaG fueron diagnosticados y reclutados en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan), además diagnosticados de acuerdo al sistema TNM para la clasificación de CaG. El estudio de la enfermedad se determinó según la combinación de criterios clínicos, histopatológicos y de imagenología, basados en el grado de infiltración (T), invasión de ganglios linfáticos regionales (N) y afectación a órganos distantes (M). Además, todos los datos, incluidos la edad, el sexo y la clasificación histológica de Lauren, se obtuvieron de los registros clínico-patológicos (**Tabla 2**).

#### 7.1.1. Criterios de inclusión

- Pacientes que acudieron al servicio de endoscopia del INCan, que tengan expediente completo.
- Pacientes que hayan firmado el consentimiento informado, hombres o mujeres, mayores de 18 años de edad con capacidad de decisión propia.
- Pacientes con diagnóstico histopatológico de carcinoma gástrico con cualquier etapa clínica TNM.
- Además, que no padezcan ninguna otra neoplasia maligna sincrónica o metacrónica.

#### 7.1.2. Criterios de exclusión

- Que hayan recibido cualquier tratamiento antineoplásico previo a tomar las biopsias, tratamientos de antibióticos, así como tratamientos de inhibidores de bombas de protones.
- Pacientes con enfermedades autoinmunes o cualquier otra condición médica que en opinión del investigador podría comprometer la capacidad del paciente para cumplir con los procedimientos del estudio.
- Que durante cualquier etapa de su estudio o tratamiento demuestren padecer otra enfermedad maligna.
- Que tengan historia de cualquier otra enfermedad maligna.

Tabla 2. Características clínico-patológicas de pacientes con CaG y donadores sin CaG.

Variable	Cáncer Gástrico (n=30)	Donadores sin CaG (n=30)
<b>Género</b>		
Masculino	16 (53.3%)	13 (43.3%)
Femenino	14 (46.7%)	17 (56.7%)
<b>Edad (Media ± DE)</b>	53.97 ± 13.28	
<b>Estadio TNM</b>		
I	3 (10.0%)	
IIB	2 (6.7%)	
III	4 (13.3%)	
IVa	11 (36.7%)	
IVb	10 (33.3%)	
<b>Clasificación de Lauren</b>		
Intestinal	15 (50.0%)	
Difuso	15 (50.0%)	
<b>Tamaño tumoral (T)</b>		
T1: Lamina propia, muscularis, mucosa y submucosa	3 (10.0%)	
T3: adventicia	6 (20.0%)	
T4a: Pleura, pericardio, pleura o peritoneo	9 (30.0%)	
T4b >15 mm fuera muscular propia	12 (40.0%)	
<b>Invasión a ganglios linfáticos regionales (N)</b>		
N0, Sin infiltración celular	6 (20.0%)	
N1, Mts 1-2 ganglios linfáticos regionales	6 (20.0%)	
N2, Mts 3-6 ganglios linfáticos regionales	6 (20.0%)	
N3, Mts 7 o más ganglios linfáticos regionales	12 (40.0%)	
<b>Metástasis a distancia (M)</b>		
M0, No hay	20 (66.7%)	
M1, Metástasis a distancia	10 (33.3%)	

## 7.2. Purificación de RNA total de plasmas, incluido miRNAs

El RNA se extrajo de muestras de plasma utilizando el kit miRNeasy Serum/Plasma (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) de acuerdo con el protocolo del fabricante. Brevemente, el reactivo de lisis QIAzol se agregó a las muestras de plasma, después se adicionó cloroformo, el lisado se separó en fases acuosa y orgánica por centrifugación. El RNA se localizó en la fase acuosa superior, mientras que el DNA se encontró en la interfase y las proteínas en la fase orgánica inferior o en la interfase. Se extrajo la fase acuosa superior y se añadió etanol para proporcionar condiciones de unión apropiadas para todas las moléculas de RNA desde aproximadamente 18 nucleótidos hacia arriba. A continuación, la muestra se aplicó a una columna de centrifugación RNeasy MinElute, donde el RNA total se unió a la membrana y el fenol y otros contaminantes se eliminó por lavado. A continuación, se eluyó RNA en un pequeño volumen de agua libre de RNAasa. La concentración y la pureza del RNA [utilizando la densidad óptica (DO) de la relación 260/280 nm] se determinó en un espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (ThermoFisher Scientific, Foster City, CA, USA).

## 7.3. Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcripción inversa (RT-qPCR)

Para cada muestra, se llevó a cabo la reacción de transcriptasa inversa, usando el kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) y cebadores stem-loop específicos para el hsa-miR-335-5p y los miRNAs: hsa-miR-3186-3p, hsa-miR-3975 y hsa-miR-1256, que de acuerdo a la base de datos GeneCards® se dirigen a CD54. Así mismo, también se utilizó un cebador stem-loop específico para el hsa-miR-16-5p, el cual se utilizó como control de referencia interno. La reacción de transcripción inversa se llevó a cabo utilizando el equipo ProFlex™ PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). La qPCR se realizó utilizando el kit TaqMan® 2X Universal PCR Master Mix, No AmpErase UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), y cebadores/sonda específicos TaqMan® miRNA Assays (ThermoFisher Scientific, Foster City, CA, USA) de los miRNAs mencionados anteriormente. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) bajo las siguientes condiciones de termociclado: Predegeneración a 95°C durante 10 min, seguido de 40 ciclos de 95°C durante 15s y 60°C durante 1 min. Todas las reacciones se realizaron por triplicado. El umbral de ciclo ( $C_T$ ) se define como el número de ciclos necesarios para que la señal de fluorescencia cruce el umbral en la qPCR.

#### 7.4. Normalización de datos experimentales de RT-qPCR mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_T}$

En este estudio, se aplicó la cuantificación relativa y, por lo tanto, se utilizó el hsa-miR-16-5p como control de referencia endógeno en la amplificación para cada reacción; esto debido a que se ha reportado su abundancia y estabilidad para el análisis de miRNAs en pacientes con CaG y en voluntarios sanos (Song *et al.*, 2011). La expresión de miRNAs de las muestras de plasma se normalizaron utilizando el método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  a partir de los valores de  $C_T$  de los miRNAs de interés en relación con el hsa-miR-16-5p. Los niveles de expresión de los miRNA normalizados para el control endógeno ( $\Delta C_T$ ) se calcularon restando los valores de  $C_T$  del control endógeno a los valores de  $C_T$  de los miRNA de interés. Luego se calculó la  $\Delta\Delta C_T$  restando el promedio de los  $\Delta C_T$  de cada grupo (pacientes con CaG o individuos sin CaG) a cada  $\Delta C_T$  individual. Las veces de cambio de los miRNA de interés respecto al control endógeno se calculó mediante la ecuación  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ .

#### 7.5. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando los softwares SPSS v.26 (IBM Corp., Armonk, NY, USA) y GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software Inc., CA, EE. UU.). Para el análisis comparativo de expresión de miRNAs entre pacientes con CaG y donadores sin CaG se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para muestras con distribución no paramétrica. Una  $p < 0.05$  de dos colas se consideró estadísticamente significativa. Los datos fueron expresados mediante la mediana (Me) y el rango intercuartílico (RI). La asociación entre los niveles de expresión de los miRNAs evaluados y las variables clínico-patológicas nominales se examinó mediante la prueba de U de Mann-Whitney. Para el análisis de la asociación entre variables clínico-patológicas ordinales o continuas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. La interpretación del coeficiente Rho de Spearman se basó en los datos del Apéndice 1 (**pág. 63**). Por otra parte, para evaluar la capacidad diagnóstica de los miRNAs, se realizó una curva de característica operativas del receptor (ROC).

## 8. RESULTADOS

### 8.1. La expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p es significativamente mayor en el plasma de pacientes con CaG que en donadores sin CaG.

Se ha propuesto que los patrones de expresión de los miRNAs (cuya función es regular la expresión génica postranscripcional) en los biofluidos, se asocian con condiciones fisiopatológicas y pueden servir como biomarcadores no invasivos en enfermedades como el cáncer. Nuestro grupo de trabajo previamente detectó subpoblaciones celulares con fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> en tejidos tumorales de pacientes con CaG, en contraste con la presencia de células con un fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>-</sup> en tejido gástrico de individuos sin CaG. Esta diferencia en la presencia de CD54, abre nuestra inquietud de determinar si los miRNAs que potencialmente regulan la expresión de CD54, se encuentran presentes en el plasma de pacientes con CaG y se asocian con variables clínico-patológicas de valor diagnóstico de la enfermedad. Para ello, se realizó una revisión en la literatura y se consultó en las bases de datos GeneCards® y miRBase, de acuerdo a los algoritmos de predicción, los posibles miRNAs cuyo blanco molecular es el mRNA de CD54. Se encontraron 4 miRNAs que presentaron altos valores de predicción para unirse al mRNA de CD54: hsa-miR-335-5p, hsa-miR-3186-3p, hsa-miR-3975 y hsa-miR-1256. Los datos publicados por Luo y colaboradores demostraron que el hsa-miR-335-5p podría actuar sobre la región 3'-UTR del mRNA de CD54 e inhibir la expresión de mRNA de CD54 en el cáncer de tiroides (Luo *et al.*, 2018).

Con la finalidad de evaluar la presencia de estos miRNAs que hacen blanco al mRNA de CD54, durante el presente trabajo se evaluó el nivel de expresión de estos miRNAs en el plasma de pacientes con CaG y donadores sin CaG. En nuestro estudio, únicamente se consideraron las muestras que amplificaron para hsa-miR-16-5p, cuyos valores de C<sub>T</sub> fueron ≤35. Tomando en cuenta este criterio, 26 muestras de pacientes con CaG y 30 de donadores sin CaG amplificaron para el control endógeno. Cabe mencionar que los miRNAs: hsa-miR-1256, hsa-miR-3975 y hsa-miR-3186-3p no amplificaron en ninguna de las muestras evaluadas (pacientes con CaG y donadores sin CaG), sin embargo, el hsa-miR-335-5p amplificó en 18 muestras de pacientes con CaG y 14 muestras de donadores sin CaG (**Tabla 3**).

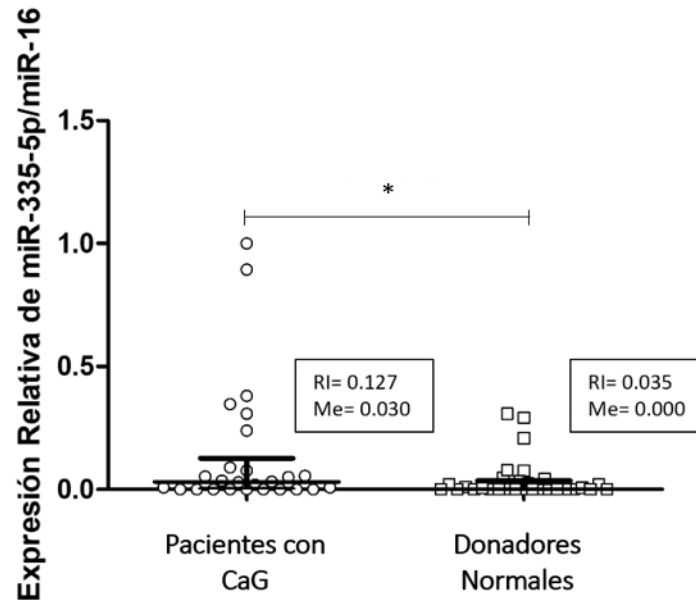


**Tabla 3. miRNAs detectados en el plasma de pacientes con CaG y donadores sin CaG.**

	Clave de acceso (miRBase)	Pacientes con CaG (n=26)	Voluntarios sanos (n=30)
hsa-miR-16-5p *	<a href="#">MIMAT0000069</a>	26	30
hsa-miR-335-5p	<a href="#">MIMAT0000765</a>	18	14
hsa-miR-1256	<a href="#">MIMAT0005907</a>	ND	ND
hsa-miR-3975	<a href="#">MIMAT0019360</a>	ND	ND
hsa-miR-3186-3p	<a href="#">MIMAT0015068</a>	ND	ND

\*Control endógeno  
 ND=No detectado en plasmas

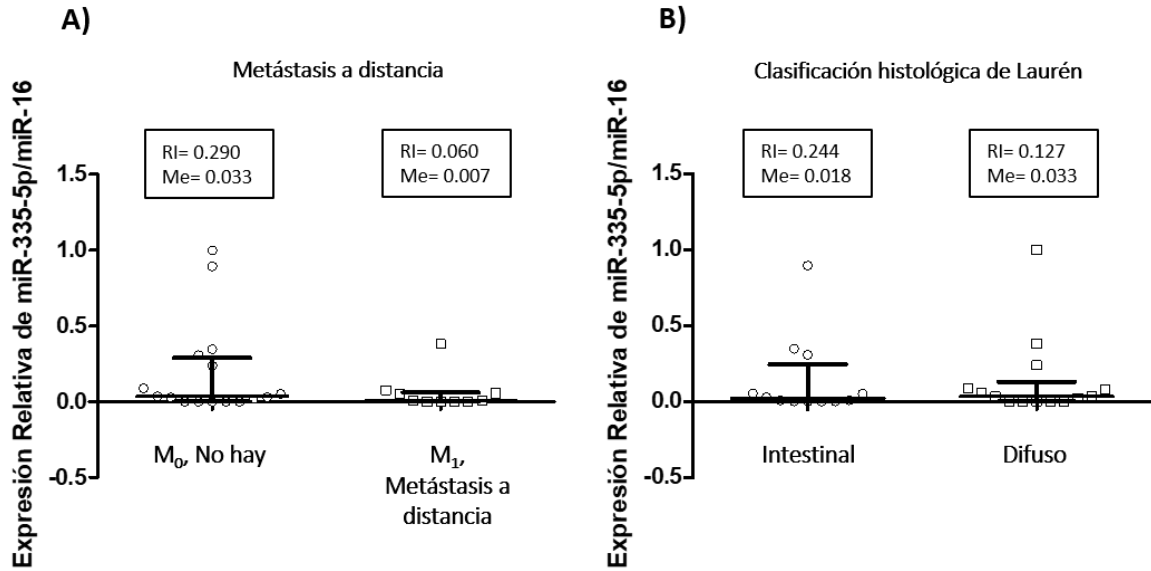
Por otro lado, se determinó la expresión relativa de hsa-miR-335-5p respecto a la de hsa-miR-16-5p tomando en consideración los valores de  $C_T$  correspondientes para cada una de las muestras analizadas. Posteriormente, para analizar la distribución de los datos de expresión relativa del hsa-miR-335-5p en las muestras de plasma, se utilizó la prueba de normalidad de Shapiro-Wilk, encontrándose que los datos no presentaron una distribución normal. Basado en este análisis, se procedió a realizar un análisis no paramétrico utilizando la prueba de U de Mann-Whitney para comparar las medianas de expresión de hsa-miR-335-5p en el plasma de pacientes con CaG respecto a los de donadores sin CaG. El análisis estadístico del plasma de los pacientes con CaG presentaron una expresión significativamente mayor de hsa-miR-335-5p respecto a los de donadores sin CaG ( $p=0.047$ ), obteniéndose valores de la mediana de 0.030 y de 0.00, y de rango intercuartílico (percentil 75) de 0.127 y 0.035, respectivamente (**Fig. 9**).



**Fig. 9.** La expresión de hsa-miR-335-5p es significativamente mayor en el plasma de pacientes con CaG que en donadores sin CaG. Gráficos de dispersión de puntos que muestran la expresión relativa de hsa-miR-335-5p en muestras plasmáticas de pacientes con CaG (n=26) y donadores sin CaG (n=30). Se utilizó como control endógeno el hsa-miR-16-5p para normalizar la expresión del hsa-miR-335-5p. Se indica el Rango intercuartílico (RI), y la Mediana (Me) de los valores de expresión relativa de hsa-miR-335/hsa-miR-16 en cada grupo estudiado. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para establecer las diferencias estadísticas. \*, p=0.047.

## 8.2. La expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p y las características clínico-patológicas de los pacientes con CaG.

Para determinar si los niveles de expresión relativa del hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p en plasma de pacientes con CaG tienen asociación con las variables clínico-patológicas nominales de metástasis a distancia (M) y la clasificación histológica de Laurén (Difuso e Intestinal), se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney. El análisis realizado indicó que no hubo asociación entre la expresión relativa del hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p con la metástasis a distancia ( $p= 0.438$ ), obteniéndose los valores de mediana para M0 (no hay metástasis) y M1 (Metástasis a distancia) de 0.033 y de 0.007, y de rango intercuartílico de 0.290 y de 0.060, respectivamente (**Fig. 10A**). Por otra parte, tampoco se encontró asociación de la expresión relativa de hsa-miR-335-5p con la Clasificación histológica de Laurén ( $p= 0.715$ ). Los valores de las medianas para Intestinal y difuso fueron de 0.018 y 0.033 y los rangos intercuartílicos fueron de 0.244 y 0.127, respectivamente (**Fig. 10B**).



**Fig. 10. El hsa-miR-335-5p no presenta asociación con variables clínico-patológicas nominales de los pacientes con CaG.** Gráficos de dispersión de puntos que muestran la asociación de la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p con **A)** metástasis a distancia (M0=sin metástasis o M1=metástasis) y **B)** clasificación histológica de Laurén (Difuso e Intestinal). Se indica el Rango intercuartílico (RI), y la Mediana (Me) de los valores de expresión relativa de hsa-miR-335/hsa-miR-16 en cada grupo estudiado. Se utilizó la prueba de U de Mann-Whitney para establecer las diferencias estadísticas

Para evaluar la correlación entre los niveles de expresión relativa del hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p en plasma de pacientes con CaG respecto a las variables clínico-patológicas ordinales, se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. El análisis mostró que hubo correlación positiva baja y estadísticamente significativa entre la expresión relativa del hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p con respecto al grado de diferenciación ( $r= 0.274$ ;  $p= 0.042$ ) y el tamaño tumoral ( $r= 0.295$ ;  $p= 0.028$ ); mientras que la expresión del hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p no mostró correlación significativa con respecto a la invasión a ganglios linfáticos ( $r= 0.220$ ;  $p= 0.103$ ), ni con el porcentaje de células CD54<sup>+</sup> detectadas en los tejidos tumorales ( $r= 0.166$ ;  $p= 0.223$ ). No obstante, la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p mostró una correlación positiva baja con tendencia a ser significativa en relación con la clasificación TNM ( $r= 0.245$ ;  $p= 0.069$ ) y con el porcentaje de células troncales CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> obtenidas de los tejidos tumorales ( $r= 0.252$ ;  $p= 0.064$ ) (**Tabla 4**).

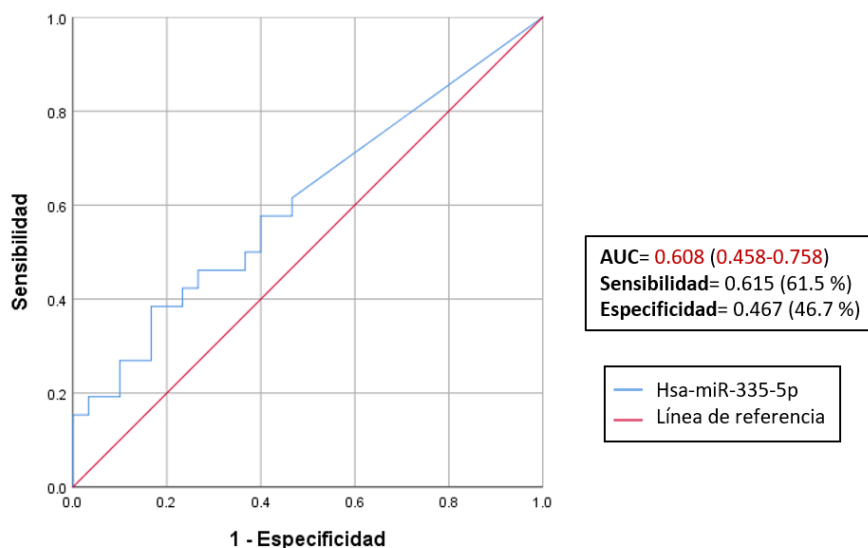
**Tabla 4. Correlaciones entre los niveles de expresión relativa del hsa-miR-335-5p en plasma y variables clínico-patológicas de los pacientes con CaG.**

	Grado de diferenciación	Tamaño Tumoral	Invasión a ganglios linfáticos	Clasificación TNM	%GCSC (CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CD54 <sup>+</sup> )	%Células CD54+
Coefficiente de correlación de Spearman	0.274*	0.295*	0.220	0.245	0.252	0.166
Sig. (bilateral)	<b>0.042</b>	<b>0.028</b>	0.103	0.069	0.064	0.223

\* La correlación es significativa en el nivel 0,05 (bilateral)

### 8.3. Valor diagnóstico de Hsa-miR-335-5p como biomarcador no invasivo en CaG.

Con la finalidad de averiguar el posible valor diagnóstico de la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p en el plasma de pacientes con CaG, se procedió a realizar un ensayo de Característica Operativa del Receptor (Curva ROC). De acuerdo con la curva ROC, con un punto de corte de 0.000073528, se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0.608, y los valores de sensibilidad y especificidad óptimas de Hsa-miR-335-5p fueron de 0.615 y de 0.467, respectivamente (**Fig. 11**), lo cual indica que el hsa-miR-335-5p presenta un valor diagnóstico bajo para ser considerado como biomarcador no invasivo en CaG.



**Fig. 11. Curva de característica operativas del receptor (ROC) para el valor diagnóstico de hsa-miR-335-5p en plasma de pacientes con CaG.** El AUC de la expresión de hsa-miR-335-5p para el diagnóstico de cáncer gástrico fue de 0.608 (línea azul). La línea roja indica la diagonal de referencia, o la línea de no discriminación.

## 9. DISCUSIÓN

El cáncer gástrico es un problema de salud pública a nivel mundial, en el año 2020 se estimaron más de 1,000,000 de casos nuevos y más de 700,000 muertes a causa de esta enfermedad, lo que lo convierte en el quinto cáncer diagnosticado con mayor incidencia y la cuarta causa principal de muerte por cáncer en todo el mundo en ambos sexos (GLOBOCAN, 2020). La mayoría de los casos que son diagnosticados como CaG, desafortunadamente se detectan en estadios avanzados de la enfermedad, donde las estrategias de tratamiento convencional son poco efectivas, resultando en bajas tasas de supervivencia (<20% a 5 años), principalmente debido al desarrollo de metástasis, considerada una de las principales causas de mortalidad asociada a este tipo de cáncer (Guan, 2015). Una gran variedad de moléculas que se inducen en el TME participan en el desarrollo de la metástasis (Rosette *et al.*, 2005; Sokeland & Schumacher, 2019). En este contexto, diversos estudios han demostrado una correlación importante entre la expresión de CD54 y la progresión a metástasis en adenocarcinoma de pulmón, cáncer gástrico, cáncer de mama, melanoma y carcinoma oral de células escamosas, entre otros (Bui *et al.*, 2020).

Se ha estipulado que la presencia de subpoblaciones de células tumorales denominadas Células Troncales Cancerosas (CSCs, del inglés *cancer stem cells*), presentes en el estroma del tumor, favorecen el rápido crecimiento, desarrollo de metástasis y resistencia a los tratamientos (Xu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2014). Nuestro grupo de trabajo caracterizó la presencia de células troncales de cáncer gástrico con un fenotipo ampliado (CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>: GCSC) en tumores de pacientes con esta neoplasia. En contraste, en tejidos gástricos de sujetos sin CaG, se identificaron poblaciones celulares con el fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>-</sup>, sugiriendo que las subpoblaciones celulares CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>: GCSC pueden tener un papel importante en la fisiopatología de la enfermedad al favorecer el crecimiento tumoral, la metástasis y resistencia a los tratamientos (Tesis de maestría Gómez-Gallegos, 2017: manuscrito en proceso). Por tal motivo, resulta importante comprender los mecanismos que regulan la expresión de CD54. En este sentido, múltiples estudios han demostrado que su regulación puede ser tanto a nivel pre/postranscripcional como a nivel epigenético. Curiosamente, muchos estudios han reforzado la participación de diferentes miRNAs en la regulación de la expresión de CD54 (Bui *et al.*, 2020). Tomando en cuenta que la función de los miRNAs es regular la expresión génica a nivel postranscripcional, y que los patrones de expresión de estas moléculas en los biofluidos, se asocian con condiciones fisiopatológicas y pueden servir como biomarcadores no invasivos en enfermedades como el cáncer,

en el presente estudio se evaluó la presencia de miRNAs dirigidos a CD54 en el plasma de pacientes con CaG y su asociación con variables clínico-patológicas. Para ello, se realizó una revisión en la literatura y se consultó en las bases de datos GeneCards® y miRBase para identificar a miRNAs que tuvieran como blanco a CD54. De acuerdo con los algoritmos de predicción que manejan estas bases de datos, se encontró que los miRNAs: hsa-miR-335-5p, hsa-miR-3186-3p, hsa-miR-3975 y hsa-miR-1256 presentaron los valores de predicción más altos para unirse al mRNA de CD54.

Al analizar la presencia de los 4 miRNAs seleccionados en el plasma de 30 pacientes con CaG y 30 donadores sin CaG, se encontró que solo el hsa-miR-335-5p amplificó en 26 muestras plasmáticas de pacientes con CaG y 30 de donadores sin CaG. De manera interesante se encontró que la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p fue significativamente mayor en muestras plasmáticas de pacientes con CaG que en donadores sin CaG ( $p= 0.047$ ). Asimismo, se observó que la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p presentó una correlación positiva baja y significativa con las variables clínico patológicas ordinales relacionadas con el grado de diferenciación ( $r= 0.274$ ;  $p= 0.042$ ) y el tamaño tumoral ( $r= 0.295$ ;  $p= 0.028$ ); y una tendencia a correlacionar con la clasificación TNM ( $r= 0.245$ ;  $p= 0.069$ ) y con el porcentaje de células troncales CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup> obtenidas de los tejidos tumorales de los pacientes con CaG estudiados ( $r= 0.252$ ;  $p= 0.064$ ). Por otro lado, con la finalidad de averiguar el posible valor diagnóstico de la expresión relativa de hsa-miR-335-5p en el plasma de pacientes con CaG, se realizó un análisis de Característica Operativa del Receptor (Curva ROC), en donde se obtuvo un área bajo la curva (AUC) de 0.608, y valores de sensibilidad y especificidad óptimas de 0.615 y de 0.467, respectivamente. Lo cual podría otorgar un valor diagnóstico bajo (60.8%) para poder discriminar entre pacientes con CaG y donadores sin CaG.

Los hallazgos obtenidos en este estudio, parecen estar acorde con la hipótesis planteada, de que el plasma de pacientes con CaG, en cuyos tejidos tumorales se hayan encontrado subpoblaciones celulares con fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>, presenten miRNAs que regulen la expresión de CD54 y tengan asociación con variables clínico-patológicas de la enfermedad, particularmente con variables ordinales, como se mencionó anteriormente.

La expresión de hsa-miR-335-5p en tejidos tumorales y en el plasma ha sido controversial, puesto que ésta puede ser diferente entre varios tipos de cáncer e incluso en diferentes etapas del mismo cáncer, por lo que esta característica puede ser de utilidad en el diagnóstico y pronóstico del cáncer

(Luo *et al.*, 2016). En el caso particular de CaG, se ha encontrado que la expresión de hsa-miR-335-5p es disminuida en líneas celulares y tejidos de CaG en comparación con los controles normales (Li *et al.*, 2014). Lo cual podría asociarse con mayor contenido de CD54 reportado en tumores de CaG respecto al de tejidos normales (Tang *et al.*, 2017; Jung *et al.*, 2020). Sin embargo, estos datos contrastan con los resultados obtenidos en el plasma de pacientes con CaG reportados por el grupo de Yan *et al.*, 2012, quienes encontraron que los niveles altos de hsa-miR-335-5p en el plasma de pacientes con CaG correlacionaron con tumores de alta recurrencia y pobre sobrevida. De hecho, estos pacientes habían pasado por varios ciclos de quimio y radioterapia, promoviendo probablemente una selección de clonas resistentes a estos tratamientos. Asimismo, reportaron que hsa-miR-335-5p está involucrado en la mayoría de las vías de señalización oncogénicas, como p53, MAPK, TGF- $\beta$ , Wnt, ERBB, mTOR, receptor tipo Toll, adhesión focal, y que estas alteraciones en las vías de señalización, especialmente la vía p53, podría afectar razonablemente el resultado clínico, incluido el riesgo a la recurrencia de CaG (Pan *et al.*, 2009). Las correlaciones encontradas en nuestro estudio, entre los niveles de hsa-miR-335-5p/ hsa-miR-16-5p en el plasma de pacientes con CaG con las variables clínico patológicas, parecen estar acorde con los datos obtenidos por Yan *et al.*, 2012, debido a que la gran mayoría de los pacientes estudiados tuvieron tumores de gran tamaño (T3-T4), con pobre grado de diferenciación (GII-GIII), estadio tumoral avanzado (IVA-IVB) e invasión a ganglios (N2-N3). Asimismo, se encontró que en algunas muestras tumorales de estos pacientes se detectaron porcentajes importantes de células troncales con fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>, de acuerdo a los datos del Apéndice 2 (pág. 64).

Por otro lado, la sobreexpresión de hsa-miR-335-5p ha sido asociada con el desprendimiento de las células tumorales, por ejemplo, en las células tumorales MDA-MB-436 y MDA-MB-231 de cáncer de mama, se ha reportado que la sobreexpresión de hsa-miR-335-5p inhibe significativamente la formación de mamosferas (Polytarchou *et al.*, 2012). De hecho, la actividad funcional de hsa-miR-335-5p para inhibir la expresión de mRNA de CD54, ha sido reportada en células de cáncer de tiroides, en donde se demostró que podría actuar sobre la región 3'-UTR del mRNA de CD54 (Luo *et al.*, 2018). Asimismo, se ha reportado que la regulación al alza de hsa-miR-335-5p inhibe significativamente la formación de colonias celulares y el crecimiento independiente del anclaje, pero no afecta la proliferación celular en células BE (2)-C de neuroblastoma (Qiao *et al.*, 2013). Este fenómeno facilitaría, en consecuencia, el que las células cancerosas se diseminan a los órganos secundarios al desprenderse del tumor primario y luego ingresar a la circulación. Estas células

tumorales circulantes (CTC) luego atraviesan sitios distales para formar lesiones metastásicas (Seyfried & Huysentruyt, 2013; Pantel & Brakenhoff, 2004). Interesantemente, la evidencia emergente indica un papel potencial de CD54 en la regulación de ambos procesos, puesto que además de favorecer el desprendimiento de las células del tumor primario por su baja expresión (en donde la alta expresión de hsa-miR-335-5p pueda estar participando), y en la formación de grupos de células tumorales-polimorfonucleares que viajan en circulación (Szczerba *et al.*, 2019). En nuestro estudio encontramos que la expresión relativa de hsa-miR-335-5p fue significativamente mayor en el plasma de pacientes con CaG que en los de donadores sin CaG, no obstante sería importante considerar analizar el nivel de expresión de hsa-miR-335-5p en el entorno del tumor, para determinar su influencia en la desregulación de CD54 en las células que forman parte del frente invasor del tumor, así como en las poblaciones de las células con fenotipo CD44<sup>+</sup>CD24<sup>+</sup>EpCAM<sup>+</sup>CD54<sup>+</sup>: GCSC, para contrastar dicha expresión. Sin duda, resulta importante considerar en un estudio prospectivo un mayor número de muestras plasmáticas de pacientes con CaG de diferentes etapas de desarrollo de CaG, puesto que la mayoría de las muestras de las pacientes utilizadas en esta fase I de estudio fueron de etapas avanzadas (III y IV), así como de donadores sin CaG para tener una mayor perspectiva de la medición del hsa-miR-335-5p con valor clínico para el diagnóstico general, no invasivo, rápido y cuantitativo de CaG.



## 10. CONCLUSIÓN

El presente estudio tuvo como finalidad conocer la expresión de miRNAs en el plasma de pacientes con CaG que pudieran estar relacionados con la presencia de CD54, el cual forma parte de los marcadores fenotípicos diferencialmente expresados en células tumorales de pacientes con CaG. De manera interesante se encontró que la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p fue significativamente mayor en muestras plasmáticas de pacientes con CaG que en donadores sin CaG ( $p= 0.047$ ). Asimismo, se observó que la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p presentó una correlación positiva baja y significativa con las variables clínico patológicas ordinales relacionadas con el grado de diferenciación ( $r= 0.274$ ;  $p= 0.042$ ) y el tamaño tumoral ( $r= 0.295$ ;  $p= 0.028$ ). Finalmente, en este trabajo se encontró que el hsa-miR-335-5p mostró valores de 61.5% de sensibilidad y 46.7% de especificidad, considerándose como un biomarcador de bajo valor diagnóstico [AUC=0.608] para discriminar entre pacientes con CaG y donadores sin CaG.

## 11. PERSPECTIVAS

Analizar la expresión relativa de hsa-miR-335-5p/hsa-miR-16-5p en un mayor número de muestras plasmáticas de pacientes con CaG de diferentes etapas de desarrollo de CaG, puesto que la mayoría de las muestras de los pacientes utilizados fueron de etapas avanzadas (III y IV), así como de donadores sin CaG para tener una mayor perspectiva del valor pronóstico de miR-335-5p como biomarcador en CaG.

## 12. REFERENCIAS

- **Alexiou, D.**, Karayiannakis, A. J., Syrigos, K. N., Zbar, A., Sekara, E., Michail, P., Rosenberg, T., & Diamantis, T. (2003). Clinical significance of serum levels of E-selectin, intercellular adhesion molecule-1, and vascular cell adhesion molecule-1 in gastric cancer patients. *Am J Gastroenterol*; 98(2): 478-85.
- **Amin, M. B.**, Greene, F. L., Edge, S. B., Compton, C. C., Gershenwald, J. E., Brookland, R. K., Meyer, L., Gress, D. M., Byrd, D. R., & Winchester, D. P. (2017). The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cáncer J Clin*; 67(2): 93–99.
- **Azarbarzin, S.**, Safaralizadeh, R., Khojasteh, M. B., Baghbanzadeh, A., & Baradaran, B. (2020). Current perspectives on the dysregulated microRNAs in gastric cancer. *Mol Biol Rep*; 47(9): 7253–7264.
- **Bartel, D. P.** (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*; 116(2): 281–297.
- **Bartel, D. P.** (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*; 136(2): 215–233.
- **Bhaskaran, M.**, & Mohan, M. (2014). MicroRNAs: History, Biogenesis, and Their Evolving Role in Animal Development and Disease. *Vet Pathol*; 51(4): 759–774.
- **Blaser, M. J.**, Perez-Perez, G. I., Kleanthous, H., Cover, T. L., Peek, R. M., Chyou, P. H., Stemmermann, G. N., & Nomura, A. (1995). Infection with *Helicobacter pylori* strains possessing *cagA* is associated with an increased risk of developing adenocarcinoma of the stomach. *Cancer Res*; 55(10): 2111-5.
- **Bohnsack, M. T.**, Czaplinski, K., & Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*; 10(2): 185–191.
- **Budnik, A.**, Grewe, M., Gyufko, K., & Krutmann, J. (1996). Analysis of the production of soluble ICAM-1 molecules by human cells. *Exp Hematol*; 24: 352-9.
- **Bui, T. M.**, Wiesolek, H. L., & Sumagin, R. (2020). ICAM-1: A master regulator of cellular responses in inflammation, injury resolution, and tumorigenesis. *J Leukoc Biol*; 108(3): 787-799.

- **Burke, E. C.,** Karpeh, M. S., Conlon, K. C., & Brennan, M. F. (1997). Laparoscopy in the management of gastric adenocarcinoma. *Ann Surg*; 225(3): 262–267.
- **Bushati, N., & Cohen, S. M.** (2007). microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*; 23: 175–205.
- **Censini, S.,** Lange, C., Xiang, Z., Crabtree, J. E., Ghiara, P., Borodovsky, M., Rappuoli, R., & Covacci, A. (1996). cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 14648–53.
- **Champagne, B.,** Tremblay, P., Cantin, A., & St Pierre, Y. (1998). Proteolytic cleavage of ICAM-1 by human neutrophil elastase. *J Immunol*; 161(11): 6398-405.
- **Chang, Y. J.,** Holtzman, M. J., & Chen, C. C. (2002). Interferon-gamma-induced epithelial ICAM-1 expression and monocyte adhesion. Involvement of protein kinase C-dependent c-Src tyrosine kinase activation pathway. *J Biol Chem*; 277: 7118-7126.
- **Chen, S. Y.,** Zhang, R. G., & Duan, G. C. (2016). Pathogenic mechanisms of the oncoprotein CagA in *H. pylori*-induced gastric cancer (Review). *Oncol Rep*; 36(6): 3087-3094.
- **Chen, V. L.,** Podlaha, O., Estevez, J., Li, B., Le, A., Vutien, P., Chang, E., Pflanz, S., Jiang, Z., Ge, D., Gaggar, A., & Nguyen, M. (2016). High serum soluble intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) concentration is associated with hepatocellular carcinoma (HCC) development in HBV, HCV, and non-viral liver disease: multiplex analysis of 51 cytokines and other serum markers. *J Hepatol*; 64: S195.
- **Chen, V. L.,** Le, A. K., Podlaha, O., Estevez, J., Li, B., Vutien, P., Chang, E. T., Rosenberg-Hasson, Y., Pflanz, S., Jiang, Z., Ge, D., Gaggar, A., & Nguyen, M. H. (2017). Soluble intercellular adhesion molecule-1 is associated with hepatocellular carcinoma risk: multiplex analysis of serum markers. *Sci Rep*; 7(1): 11169.
- **Chen, X.,** Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., & Zhang, C. Y. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*; 18: 997-1006.
- **Correa, P.** (1988). Human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res*; 48: 3554–60.

- **Correa, P.** (1992). Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process—First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res*; 52: 6735–40.
- **Correa, P.** (2013). Gastric Cancer: Overview. *Gastroenterol Clin North Am*; 42(2): 211-7.
- **Cover, T. L., & Blanke, S.R.** (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nat Rev Microbiol*; 3: 320-32.
- **De Vita, F.,** Infusino, S., Auriemma, A., Orditura, M., & Catalano, G. (1998). Circulating levels of soluble intercellular adhesionmolecule-1 in non-small cell lung cancer patients. *Oncol Rep*; 5: 393-396.
- **Diamond, M. S.,** Staunton, D. E., Marlin, S. D. & Springer, T. A. (1991). Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell*; 65(6): 961–971.
- **Dustin, M. L.,** Rothlein, R., Bhan, A. K., Dinarello, C. A., Springer, T. A. (1986). Induction by IL 1 and interferon-gamma: tissue distribution, biochemistry, and function of a natural adherence molecule (ICAM-1). *J Immunol*; 137(1): 245-54.
- **Eichhorn, S. W.,** Guo, H., McGeary, S. E., Rodriguez-Mias, R. A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S. H., Ghoshal, K., Villén, J., & Bartel, D. P. (2014). mRNA destabilization is the dominant effect of mammalian microRNAs by the time substantial repression ensues. *Mol Cell*; 56(1): 104–115.
- **Ezoe, Y.,** Muto, M., Uedo, N., Doyama, H., Yao, K., Oda, I., Kaneko, K., Kawahara, Y., Yokoi, C., Sugiura, Y., Ishikawa, H., Takeuchi, Y., Kaneko, Y., & Saito, Y. (2011). Magnifying narrow band imaging is more accurate than conventional white-light imaging in diagnosis of gastric mucosal cancer. *Gastroenterology*; 141(6): 2017–2025.e3.
- **Figenschau, S. L.,** Knutsen, K., Urbarova, I., Fenton, C., Elston, B., Perander, M., Mortensen, E. S., & Fenton, K. A. (2018). ICAM1 expression is induced by proinflammatory cytokines and associated with TLS formation in aggressive breast cancer subtypes. *Sci Rep*; 8: 11720.
- **Fox, J. G., & Wang, T. C.** (2007). Inflammation, atrophy, and gastric cancer. *J Clin Invest*; 117: 60–9.
- **Gebert, L., & MacRae, I. J.** (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 20(1): 21–37.

- **Giorelli, M.**, De Blasi, A., Defazio, G., Avolio, C., Iacovelli, L., Livrea, P., & Trojano, M. (2002). Differential regulation of membrane bound and soluble ICAM 1 in human endothelium and blood mononuclear cells: effects of interferon beta-1a. *Cell Commun Adhes*; 9(5-6): 259-72.
- **Gkountela, S.**, Castro-Giner, F., Szczerba, B. M., Vetter, M., Landin, J., Scherrer, R., Krol, I., Scheidmann, C., Beisel, C., Stirnimann, C. U., Kurzeder, C., Heinzelmann-Schawarz, V., Rochlitz, C., Weber, W. P., & Aceto, N. (2019). Circulating tumor cell clustering shapes DNA methylation to enable metastasis seeding. *Cell*; 176: 98-112 e14.
- **Gómez-Gallegos, A. A.** (2017). Caracterización fenotípica de células troncales de carcinoma gástrico y su participación en la tumorigenicidad. Tesis de Maestría. UNAM. México, D.F.
- **Gorina, R.**, Lyck, R., Vestweber, D., & Engelhardt, B. (2014). beta2 integrin mediate crawling on endothelial ICAM-1 and ICAM-2 is a pre-requisite for transcellular neutrophil diapedesis across the inflamed blood-brain barrier. *J Immunol*; 192: 324-337.
- **Gu, W.**, Yao, L., Li, L., Zhang, J., Place, A. T., Minshall, R. D., Liu, G. (2017). ICAM-1 regulates macrophage polarization by suppressing MCP-1 expression via miR-124 upregulation. *Oncotarget*; 8(67): 111882–111901.
- **Guan, X.** (2015). Cancer metastases: challenges and opportunities. *Acta Pharm Sin B*; 5: 402-418.
- **Guo, H.**, Ingolia, N. T., Weissman, J. S., & Bartel, D. P. (2010). Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*; 466(7308): 835–840.
- **Guo, P.**, Huang, J., Wang, L., Jia, Di., Yang, J., Dillon, D. A., Zurakowski, D., Mao, H., Moses, M. A., & Auguste, D. T. (2014). ICAM-1 as a molecular target for triple negative breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*; 111(41): 14710-5.
- **Hansson, L. R.**, Engstrand, L., Nyrén, O., & Lindgren, A. (1995). Prevalence of *Helicobacter pylori* infection in subtypes of gastric cancer. *Gastroenterology*; 109(3): 885-8.
- **Hayashi, T.**, Takahashi, T., Montoya, S., Ishida, T., Itoh, F., Adachi, M., Hinoda, Y., & Imai, K. (2001). MUC1 mucin core protein binds to the domain 1 of ICAM-1. *Digestion*; 63 Suppl 1: 87-92.
- **Hu, G.**, Gong, A. Y., Liu, J., Zhou, R., Deng, C., & Chen, X. M. (2010). miR-221 suppresses ICAM-1 translation and regulates interferon-gamma-induced ICAM-1 expression in human cholangiocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*; 298(4): G542-50.

- **Ihermann-Hella, A.**, Lume, M., Miinalainen, I. J., Pirttiniemi, A., Gui, Y., Peränen J., Charron, J., Saarma, M., Costantini, F., & Kuure, S. (2014). Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway regulates branching by remodeling epithelial cell adhesion. *PLoS Genet*; 10(3): e1004193.
- **Ikoma, N.**, Lee, J. H., Bhutani, M. S., Ross, W. A., Weston, B., Chiang, Y. J., Blum, M. A., Sagebiel, T., Devine, C. E., Matamoros, A., Jr, Fournier, K., Mansfield, P., Ajani, J. A., & Badgwell, B. D. (2017). Preoperative accuracy of gastric cancer staging in patient selection for preoperative therapy: race may affect accuracy of endoscopic ultrasonography. *J Gastrointestinal Oncol*; 8(6): 1009–1017.
- **Imaoka, H.**, Toiyama, Y., Okigami, M., Yasuda, H., Saigusa, S., Ohi, M., Tanaka, K., Inoue, Y., Mohri, Y., & Kusunoki, M. (2016). Circulating microRNA-203 predicts metastases, early recurrence, and poor prognosis in human gastric cancer. *Gastric cancer*; 19(3): 744–753.
- **Jevsinek-Skok, D.**, Godnic, I., Zorc, M., Horvat, S., Dovc, P., Kovac, M., & Kunej, T. (2013). Genome-wide in silico screening for microRNA genetic variability in livestock species. *Anim Genet*, 44(6), 669–677.
- **Jiang, X.**, Wang, W., Yang, Y., Du, L., Yang, X., Wang, L., Zheng, G., Duan, W., Wang, R., Zhang, X., Wang, L., Chen, X., & Wang, C. (2017). Identification of circulating microRNA signatures as potential noninvasive biomarkers for prediction and prognosis of lymph node metastasis in gastric cancer. *Oncotarget*; 8(39): 65132–65142.
- **Jung, M.**, Yang, Y., McCloskey, J. E., Zaman, M., Vedvyas, Y., Zhang, X., Stefanova, D., Gray, K.D., Min, I. M., Zargenar, R., Choi, Y. Y., Cheong, J. H., Noh, S. H., Rha, S. Y., Chung, H. C., & Jin, M. M. (2020). Chimeric Antigen Receptor T Cell Therapy Targeting ICAM-1 in Gastric Cancer. *Mol Ther Oncolytics*; 18: 587-601.
- **Jung, W. C.**, Jang, Y. J., Kim, J. H., Park, S. S., Park, S. H., Kim, S. J., Mok, Y. J., & Kim, C. S. (2012). Expression of intercellular adhesion molecule-1 and e-selectin in gastric cancer and their clinical significance. *J Gastric Cancer*; 12(3): 140-8.
- **Kasinski, A. L.**, & Slack, F.J. (2011). MicroRNAs on route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 11(12): 849-64.
- **Kesanakurti, D.**, Chetty, C., Rajasekhar-Maddirela, D., Gujrati, M., & Rao, J. S. (2013). Essential role of cooperative NF-kappa B and Stat3 recruitment the ICAM-1 intronic

consensus elements in the regulation of radiation induced invasion and migration in glioma. *Oncogene*; 32: 5144-5155.

- **Kim, J., & Wang, T. C.** (2021). *Helicobacter pylori* and Gastric Cancer. *Gastrointest Endosc Clin N Am*; 31(3): 451-465.
- **Kim, V. N.** (2004). MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends Cell Biol*; 14(4): 156–159.
- **Kim, V. N.** (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 6(5): 376-85.
- **Kim, V. N., Han, J., & Siomi, M.C.** (2008). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 10(2): 126-39.
- **King, P. D., Sandberg, E.T., Selvakumar, A., Fang, P., Beaudet, A. L., & Dupont, B.** (1995). Novel isoforms of murine intercellular adhesion molecule-1 generated by alternative RNA splicing. *J Immunol*; 154: 6080-6093.
- **Kong, D. H., Kim, Y. K., Kim, M. R., Jang, J. H., & Lee, S.** (2018). Emerging roles of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in immunological disorders and cancer. *Int J Mol Sci*; 19(4): 1057.
- **Krol, J., Loedige, I., & Filipowicz, W.** (2010) The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat Rev Genet*; 11(9): 597-610.
- **Languino, L. R., Duperray, A., Joganic, K. J., Fornaro, M., Thornton, G. B., & Altieri, D. C.** (1995). Regulation of leukocyte-endothelium interaction and leukocyte transendothelial migration by intercellular adhesion molecule 1-fibrinogen recognition. *Proc Natl Acad Sci USA*; 92: 1505–1509.
- **Laurén, P.** (1965). The two histological types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification. *Acta Pathol Microbiol Scand*; 64: 31-49.
- **Lei, Z., Tan, I. B., Das, K., Deng, N., Zouridis, H., Pattison, H., Chua, C., Feng, Z., Guan, Y. K., Ooi, C. H., Ivanova, T., Zhang, S., Lee, M., Wu, J., Ngo, A., Manesh, S., Tan, E., Teh, B. T., & Yan-So, J. B.** (2013). Identification of molecular subtypes of gastric cancer with different responses to PI3-kinase inhibitors and 5-fluorouracil. *Gastroenterology*; 145: 554–65.

- **Li, H.**, Xie, S., Liu, M., Chen, Z., Liu, X., Wang, L., Li, D., & Zhou, Y. (2014). The clinical significance of downregulation of mir-124-3p, mir-146a-5p, mir-155-5p and mir-335-5p in gastric cancer tumorigenesis. *Int J Oncol*; 45(1): 197-208.
- **Li, K.**, Dan, Z., & Yu-Qiang, N. (2014). Gastric cancer stem cells in gastric carcinogenesis, progression, prevention and treatment. *World J Gastroenterol*; 20(18): 5420-6.
- **Lin, Y. C.**, Shun, C. T., Wu, M. S., & Chen, C. C. (2006). A novel anticancer effect of thalidomide: inhibition of intercellular adhesion molecule-1-mediated cell invasion and metastasis through suppression of nuclear factor-kappa B. *Clin Cancer Res*; 12: 7165-7173.
- **Link, A., & Goel, A.** (2013). MicroRNA in gastrointestinal cancer: a step closer to reality. *Adv Clin Chem*; 62: 221-68.
- **Link, A.**, Kupcinskas, J., Wex, T., & Malfertheiner, P. (2012). Macro-role of microRNA in gastric cancer. *Dig Dis*; 30(3): 255-67.
- **Link, A., & Kupcinskas, J.** (2018). MicroRNAs as non-invasive diagnostic biomarkers for gastric cancer: Current insights and future perspectives. *World J Gastroenterol*; 24(30): 3313-3329.
- **Liu, R. R.**, Li, J., Gong, J. Y., Kuang, F., Liu, J. Y., Zhang, Y. S., Ma, Q. L., Song, C. J., Truax, A. D., Gao, F., Yang, K., Jin, B.Q., & Chen, L.H. (2015). MicroRNA-141 regulates the expression level of ICAM-1 on endothelium to decrease myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*; 309(8): H1303-13.
- **López-Campos, J. L.**, Calero, C., Arellano-Orden, E., Marquez-Martin, E., Cejudo-Ramos, P., Ortega-Ruiz, F., & Montes-Worboys, A. (2012). Increased levels of soluble ICAM-1 in chronic obstructive pulmonary disease and resistant smokers are related to active smoking. *Biomark Med*; 6(6): 805-11.
- **Lowy, A. M.**, Mansfield, P. F., Leach, S. D., & Ajani, J. (1996). Laparoscopic staging for gastric cancer. *Surgery*; 119(6): 611–614.
- **Luo, L.**, Xia, Li., Zha, B, Zuo, C., Deng, D., Chen, M., Hu, L., He, Y., Dai, F., Wu, J., Wang, C., Wang, Y., & Zhang, Q. (2018). miR-335-5p targeting ICAM-1 inhibits invasion and metastasis of thyroid cancer cells. *Biomed Pharmacother*; 106: 983-990.
- **Luo, L. J.**, Wang, D.D., Wang, J., Yang, F., & Tang, J.H. (2016). Diverse roles of miR-335 in development and progression of cancers. *Tumour Biol*.



- **Lyons, K.,** Le, L. C., Pham, Y. T., Borron, C., Park, J. Y., Tran, C., Tran, T. V., Tran, H. T., Vu, K. T., Do, C. D., Pelucchi, C., La Vecchia, C., Zgibor, J., Boffetta, P., & Luu, H. N. (2019). Gastric cancer: epidemiology, biology, and prevention: a mini review. *Eur Journal Cancer Prev*; 28(5): 397–412.
- **Martínez Rebollar, A., & Campos Francisco, W.** (2015). Correlación entre Actividades de Interacción Social Registradas con Nuevas Tecnologías y el grado de Aislamiento Social en los Adultos Mayores. *Rev Mex de Ing Biomed*; 36(3): 181-191.
- **McCourt, P. A.,** Ek, B., Forsberg, N., & Gustafson, S. (1994). Intercellular adhesion molecule-1 is a cell surface receptor for hyaluronan. *J Biol Chem*; 269(48): 30081–30084.
- **Meng-Meng, T.,** Sun, Y., Zhong-Wu, L., Wu, Y., Ai-Lian, Z., & Ji-You, L. (2012). Polymorphisms of ICAM-1 are associated with gastric cancer risk and prognosis. *World J Gastroenterol*; 18(4): 368-374.
- **Mentis, A. F. A.,** Boziki, M., Grigoriadis, N., & Papavassiliou, A. G. (2019). *Helicobacter pylori* infection and gastric cancer biology: tempering a double-edged sword. *Cell Mol Life Sci*; 76(13): 2477-2486.
- **Mitchell, P. S.,** Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., & Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA*; 105: 10513-10518.
- **Nagahama, T.,** Yao, K., Maki, S., Yasaka, M., Takaki, Y., Matsui, T., Tanabe, H., Iwashita, A., & Ota, A. (2011). Usefulness of magnifying endoscopy with narrow-band imaging for determining the horizontal extent of early gastric cancer when there is an unclear margin by chromoendoscopy (with video). *Gastrointes Endosc*; 74(6): 1259–1267.
- **Necula, L.,** Matei, L., Dragu, D., Neagu, A. I., Mambet, C., Nedeianu, S., Bleotu, C., Diaconu, C. C., & Chivu-Economescu, M. (2019). Recent advances in gastric cancer early diagnosis. *World J Gastroenterol*; 25(17): 2029–2044.
- **Ockenhouse, C. F.,** Betageri, R., Springer, T. A., & Staunton, D. E. (1992). *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes bind ICAM-1 at a site distinct from LFA-1, Mac-1, and human rhinovirus. *Cell*; 68: 63-69.

- **Pan, J. J.,** Zhang, S. W., Chen, C. B., Xiao, S. W., Sun, Y., Liu, C. Q., Su, X., Li, D. M., Xu, G., Xu, B., & Lu, Y. Y. (2009). Effect of recombinant adenovirus-p53 combined with radiotherapy on long-term prognosis of advanced nasopharyngeal carcinoma. *J Clin Oncol*; 27(5): 799–804.
- **Pantel, K., & Brakenhoff, R. H.** (2004). Dissecting the metastatic cascade. *Nature Rev Cancer*; 4: 448-456.
- **Peterson, S. M.,** Thompson, J. A., Ufkin, M. L., Sathyanarayana, P., Liaw, L., & Congdon, C. B. (2014). Common features of microRNA target prediction tools. *Front Genet*; 5: 23.
- **Petryszyn, P.,** Chapelle, N., & Matysiak-Budnik, T. (2020). Gastric Cancer: Where Are We Heading?. *Dig Dis*; 38(4): 280-285.
- **Piazuelo, M. B., & Correa, P.** (2013). Gastric cáncer: Overview. *Colomb Med*; 44(3): 192-201.
- **Pietruczuk, M.,** Pietruczuk, A., Pancewicz, S., Hermanowska-Szpakowicz, T. (2004). ICAM- 1: structure, biological role and clinical significance. *Pol Merkur Lekarski*; 17(101): 507-11.
- **Polytarchou, C.,** Iliopoulos, D., & Struhl, K. (2012). An integrated transcriptional regulatory circuit that reinforces the breast cancer stem cell state. *Proc Natl Acad Sci USA*; 109(36): 14470-5.
- **Qiao, J.,** Lee, S., Paul, P., Theiss, L., Tiao, J., Qiao, L., Kong, A., & Chung, D. H. (2013). miR-335 and miR-363 regulation of neuroblastoma tumorigenesis and metastasis. *Surgery*; 154(2):2 26–33.
- **Ramos, T. N.,** Bullard, D. C., & Barnum, S. R. (2014). ICAM-1: Isoforms and Phenotypes. *J Immunol*; 192: 4469-4474.
- **Reina, M., & Espel, E.** (2017). Role of LFA-1 and ICAM-1 in Cancer. *Cancers (Basel)*; 9(11): 153.
- **Robledo, O.,** Papaioannou, A., Ochietti, B., Beauchemin, C., Legault, D., Cantin, A., King, P. D., Daniel, C., Alakhov, V. Y., Potworowski, E. F., & St-Pierre, Y. (2003). ICAM-1 isoforms: specific activity and sensitivity to cleavage by leukocyte elastase and cathepsin G. *Eur J Immunol*; 33: 1351-1360.
- **Roche, Y.,** Pasquier, D., Rambeaud, J. J., Seigneurin, D., & Duperray, A. (2003). Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway. *Thromb Haemost*; 89: 1089-1097.

- **Rodríguez, A.**, Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*; 14(10A): 1902–1910.
- **Rosette, C.**, Roth, R. B., Oeth, P., Braun, A., Kammerer, S., Ekblom, J., & Denissenko, M. F. (2005). Role of ICAM1 in invasion of human breast cancer cells. *Carcinogenesis*; 26: 943-950.
- **Rothlein, R.**, Dustin, M. L., Marlin, S. D., Springer, T. (1986). A human intercellular adhesion molecule (ICAM-1) distinct from LFA-1. *J Immunol*; 137(4): 1270-4.
- **Saini, M.**, Szczerba, B. M., & Aceto, N. (2019). Circulating tumor cell-neutrophil tango along the metastatic process. *Cancer Res*; 79: 6067-6073.
- **Saliminejad, K.**, Khorran-Kkorshid, H. R., Fard, S. S., & Ghaffari, S. H. (2018). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*; 234(5): 5451-5465.
- **Schroder, C.**, Witzel, I., Muller, V., Krenkel, S., Wirtz, R. P., Jänicke, F., Schumacher, U., & Milde-Langosch, K. (2011). Prognostic value of intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 expression in breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*; 137: 1193-1201.
- **Scott, D. W., & Patel, R. P.** (2013). Endothelial heterogeneity and adhesion molecules N-glycosylation: implications in leukocyte trafficking in inflammation. *Glycobiology*; 23: 622-633.
- **Seyfried, T. N., & Huysentruyt, L. C.** (2013). On the origin of cancer metastasis. *Crit Rev Oncog*; 18: 43-73.
- **Sexton, R. E.**, Al Hallak, M. N., Diab, M., & Azmi, A. S. (2020). Gastric cancer: a comprehensive review of current and future treatment strategies. *Cancer Metastasis Rev*; 39(4): 1179-1203.
- **Siravegna, G.**, Marsoni, S., Siena, S., & Bardelli, A. (2017). Integrating liquid biopsies into the management of cancer. *Nat Rev Clin Oncol*; 14(9): 531–548.
- **Smith, J. D.**, Craig, A. G., Kriek, N., Hudson-Taylor, D., Kyes, S., Fagan, T., Pinches, R., Baruch, D. I., Newbold, D. I., & Miller, L. H. (2000). Identification of a *Plasmodium falciparum* intercellular adhesion molecule-1 binding domain: a parasite adhesion trait implicated in cerebral malaria. [Published erratum appears in 2006 *Proc Natl Acad Sci USA*; 103: 12209]. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97: 1766-1771.

- **Smyth, E.**, Schöder, H., Strong, V. E., Capanu, M., Kelsen, D. P., Coit, D. G., & Shah, M. A. (2012). A prospective evaluation of the utility of 2-deoxy-2- [(18) F] fluoro-D-glucose positron emission tomography and computed tomography in staging locally advanced gastric cancer. *Cancer*; 118(22): 5481–5488.
- **Smyth, E. C.**, Verheij, M., Allum, W., Cunningham, D., Cervantes, A., Arnold, D., & ESMO Guidelines Committee. (2016). Gastric cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*; 27 (suppl 5): v38–v49.
- **Smyth, E. C.**, Nilsson, M., Grabsch, H. I., van Grieken, N. C., & Lordick, F. (2020). Gastric cancer. *Lancet*; 396(10251): 635-648.
- **Sohel, M.** (2020). Circulating microRNAs as biomarkers in cancer diagnosis. *Life Sci*; 248: 117473.
- **Sokeland, G., & Schumacher, U.** (2019). The functional role of integrins during intra- and extravasation within the metastatic cascade. *Mol Cancer*; 18: 12.
- **Song, J.**, Bai, Z., Han, W., Zhang, J., Meng, H., Bi, J., Ma, X., Han, S., & Zhang, Z. (2011). Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients. *Dig Dis Sci*; 57(4): 897-904.
- **Song, M. Y.**, Pan, K. F., Su, H. J., Zhang, L., Ma, J. L., Li, J. Y., Yuasa, Y., Kang, D., Kim, Y. S., & You, W. C. (2012). Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PLoS One*; 7(3): e33608.
- **Sprenger, A.**, Schardt, C., Rotsch, M., Zehrer, M., Wolf, M., Havemann, K., & Heymanns, J. (1997). Soluble intercellular adhesion molecule-1 in patients with lung cancer and benign lung diseases. *J Cancer Res Clin Oncol*; 123: 632-638.
- **Stahlhut, C., & Slack, F. J.** (2013). MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. *Genome Med*; 5(12): 111.
- **Staunton, D. E.**, Marlin, S. D., Stratowa, C., Dustin, M. L., & Springer, T. A. (1988). Primary structure of ICAM-1 demonstrates interaction between members of the immunoglobulin and integrin supergene families. *Cell*; 52(6): 925-33.
- **Strilic, B., & Offermanns, S.** (2017). Intravascular survival and extravasation of tumor cells. *Cancer Cell*; 32: 282-293.
- **Suárez, Y.**, Wang, C., Manes, T. D., & Pober, J. S. (2010). Cutting edge: TNF-induced microRNAs regulate TNF-induced expression of E-selectin and intercellular adhesion

molecule-1 on human endothelial cells: feedback control of inflammation. *J Immunol*; 184(1): 21-5.

- **Syeda, Z. A.**, Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *Int J Mol Sci*; 21(5): 1723.
- **Szczerba, B. M.**, Castro-Giner, F., Vetter, M., Krol, I., Gkountela, S., Landin, J., Scheidmann, M. C., Donato, C., Scherrer, R., Singer, J., Beisel, C., Kurzeder, C., Heinzelmann-Schwarz, V., Rochlitz, C., Weber, W. P., Beerenwinkel, N., & Aceto, N. (2019). Neutrophils escort circulating tumour cells to enable cell cycle progression. *Nature*; 566: 553-557.
- **Takahashi, T.**, Saikawa, Y., & Kitagawa, Y. (2013). Gastric cancer: current status of diagnosis and treatment. *Cancers*; 5(1): 48–63.
- **Tan, I. B.**, Ivanova, T., Lim, K. H., Ong, C. W., Deng, N., Lee, J., Tan, S. H., Wu, J., Lee, M. H., Ooi, C. H., Rha, S. Y., Wong, W. K., Boussioutas, A., Yeoh, K. G., So, J., Yong, W. P., Tsuburaya, A., Grabsch, H., Toh, H. C., Rozen, S., Cheong, J. H., Noh, S. H., Wan, W. K., Ajani, J. A., Lee, J. S., Salto-Tellez, M., Tan, P. (2011). Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*; 141: 476–85.
- **Tang, Z.**, Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Res*; 45(W1): W98-W102.
- **Tong, W.**, Ye, F., He, L., Cui, L., Cui, M., Hu, Y., Li, W., Jiang, J., Zhang, D. Y., & Suo, J. (2016). Serum biomarker panels for diagnosis of gastric cancer. *Onco Targets Ther*; 9: 2455–2463.
- **Tsai, C. F.**, Chen, J. H., Wu, C. T., Chang, P. C., Wang, S. L., & Yeh, W. L. (2019). Induction of osteoclast-like cell formation by leptin-induced soluble intercellular adhesion molecule secreted from cancer cells. *Ther Adv Med Oncol*; 11: 1758835919846806.
- **Tsai, M. M.**, Wang, C. S., Tsai, C. Y., Huang, H. W., Chi, H. C., Lin, Y. H., Lu, P. H., & Lin, K. H. (2016). Potential Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Targets of MicroRNAs in Human Gastric Cancer. *Int J Mol Sci*; 17(6): 945.
- **Tsai, M. M.**, Wang, C. S., Tsai, C. Y., Huang, C. G., Lee, K. F., Huang, H. W., Lin, Y. H., Chi, H. C., Kuo, L. M., Lu, P. H., & Lin, K. H. (2016). Circulating microRNA-196a/b are novel biomarkers associated with metastatic gastric cancer. *Eur J Cancer*; 64: 137–148.

- **Tsakadze, N. L.,** Zhao, Z., & D'Souza, S. E. (2002). Interactions of intercellular adhesion molecule-1 with fibrinogen. *Trends Cardiovasc Med*; 12: 101-108.
- **Tse, M. T.,** Chakrabarti, K., Gray, C., Chitnis, C. E., & Craig, A. (2004). Divergent binding sites on intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) for variant *Plasmodium falciparum* isolates. *Mol Microbiol*; 51: 1039-1049.
- **Tsujiura, M.,** Ichikawa, D., Komatsu, S., Shiozaki, A., Takeshita, H., Kosuga, T., Konishi, H., Morimura, R., Deguchi, K., Fujiwara, H., Okamoto, K., & Otsuji, E. (2010). Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*; 102(7): 1174-9.
- **Usami, Y.,** Ishida, K., Sato, S., Kishino, M., Kiryu, M., Ogawa, Y., Okura, M., Fukuda, Y., & Toyosowa, S. (2013). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression correlates with oral cancer progression and induces macrophage/cancer cell adhesion. *Int J Cancer*; 133: 568-578.
- **Wakatsuki, T.,** Kimura, K., Kimura, F., Shinomiya, N., Ohtsubo, M., Ishizawa, M., & Yamamoto, M. (1995). A distinct mRNA encoding a soluble form of ICAM-1 molecule expressed in human tissues. *Cell Adhes Commun*; 3(4): 283-9.
- **Wang, W. C.,** Zhang, X. F., Peng, J., Li, X. F., Wang, A. L., Bie, Y. Q., Shi, L. H., Lin, M. B., & Zhang, X. F. (2018). Survival mechanisms and influence factors of circulating tumor cells. *Biomed Res Int*; 2018: 6304701.
- **Wee, H.,** Oh, H. M., Jo, J. H., & Jun, C. D. (2009). ICAM-1/LFA-1 interaction contributes to the induction of endothelial cell-cell separation: implication for enhanced leukocyte diapedesis. *Exp Mol Med*; 41: 341-348.
- **Wroblewski, L. E.,** & Peek Jr, R. M. (2013). *Helicobacter pylori* in gastric carcinogenesis: mechanisms. *Gastroenterol Clin North Am*; 42: 285-98.
- **Xin, S. Y.,** Feng, X. S., Zhou, L. Q., Sun, J. J., Gao, X. L., & Yao, G. L. (2014). Reduced expression of circulating microRNA-218 in gastric cancer and correlation with tumor invasion and prognosis. *World J Gastroenterol*; 20(22): 6906–6911.
- **Xu, Z.,** Tang, J., Xie, H., Du, Y., Huang, L., & Yu, P. (2015). 5-Fluorouracil chemotherapy of gastric cancer generates residual cells with properties of cancer stem cells. *Int J Biol Sci*; 11(3): 284-94.

- **Yan, Z.**, Xiong, Y., Xu, W., Gao, J., Cheng, Y., Wang, Z., Chen, F., & Zheng, G. (2012). Identification of hsa-miR-335 as a prognostic signature in gastric cancer. *PLoS One*; 7(7): e40037.
- **Yuan, Z.**, Wong, S., Borrelli, A., & Chung, M. A. (2007). Down-regulation of MUC1 in cancer cells inhibits cell migration by promoting E-cadherin/catenin complex formation. *Biochem Biophys Res Commun*; 362: 740-746.
- **Zeng, Y., & Cullen, B. R.** (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*; 32(16): 4776–4785.
- **Zhao, Y., & Srivastava, D.** (2007). A developmental view of microRNA function. *Trends Biochem Sci*; 32(4): 189–197.
- **Zhao, G.**, Jiang, T., Liu, Y., Huai, G., Lan, C., Li, G., Jia, G., Wang, K., & Yang, M. (2018). Droplet digital PCR-based circulating microRNA detection serve as a promising diagnostic method for gastric cancer. *BMC cancer*; 18(1): 676.

## 13. APÉNDICE 1

Interpretación del coeficiente de correlación de Spearman. Tomado y modificado de Martínez-Rebollar & Campos, 2015.

Valor de Rho	Significado
-1	Correlación negativa grande y perfecta
-0.0 a -0.99	Correlación negativa muy alta
-0.7 a -0.89	Correlación negativa alta
-0.4 a -0.69	Correlación negativa moderada
-0.2 a -0.39	Correlación negativa muy baja
-0.01 a -0.19	Correlación negativa muy baja
0	Correlación nula
0.01 a 0.19	Correlación positiva muy baja
0.2 a 0.39	Correlación positiva baja
0.4 a 0.69	Correlación positiva moderada
0.7 a 0.89	Correlación positiva alta
0.0 a 0.99	Correlación positiva muy alta
1	Correlación positiva grande y perfecta



## 14. APÉNDICE 2

Valores de expresión relativa de hsa-miR-335-5p y variables clínico-patológicas de pacientes con CaG incluidos en el estudio.

Paciente	Expresión relativa hsa-miR-335-5p	Invasión a ganglios linfáticos	Grado de diferenciación	Tamaño tumoral	Estadio TNM	%GCSC (CD44 <sup>+</sup> CD24 <sup>+</sup> EpCAM <sup>+</sup> CD54 <sup>+</sup> )	%Células CD54 <sup>+</sup>
1	1	N2	GIII	T4b	IVa	1.70	0.10
2	0.8937509	N0	GIII	T4b	IVa	2.10	0.50
3	0.0199825	N1	GIII	T4a	IVa	0.98	2.20
4	0.03544471	N3	GII	T4a	III	0.05	0.00
5	0.38023	N3	GIII	T4a	IVb	1.70	0.10
6	0.089447	N3	GIII	T4b	IVa	0.97	1.00
7	0.05270097	N1	GIII	T4a	III	0.64	1.10
8	0.0501653	N3	GII	T4a	IVb	0.01	1.10
9	0.3078627	N0	GII	T3	IIB	1.10	1.40
10	0.23994738	N2	GIII	T4b	IVa	1.90	0.00
11	0	N3	GIII	T4b	IVb	1.87	1.90
12	0.34737059	N0	GIII	T1	I	1.63	3.00
13	0	N0	GIII	T1	I	1.72	1.20
14	0.03143415	N1	GIII	T4b	IVa	2.23	0.00
15	0	N3	GIII	T4a	IVb	1.01	1.10
16	0.02955859	N2	GIII	T3	III	1.51	0.90
17	0.0769321	N3	GIII	T4a	IVb	2.34	1.00
18	0	N3	GIII	T4a	IVb	2.11	0.48
19	0.055257	N3	GIII	T4b	IVb	1.89	0.78
20	0	N1	GIII	T4b	IVa	-	1.56
21	0	N0	GII	T3	IIB	2.11	0.45
22	0.00817369	N3	GIII	T3	IVb	0.20	0.67
23	0	N2	GIII	T4b	IVa	0.81	0.32
24	0	N0	GI	T1	I	1.99	0.30
25	0.0075787	N1	GIII	T3	IVb	1.87	0.56
26	0.0001471	N2	GIII	T4a	IVb	1.87	1.20