**ÍNDICE**

[**I.** **INTRODUCCIÓN 1**](#_Toc487643820)

[1. El CÁNCER 3](#_Toc487643821)

[1.1. CONCEPTO DE CÁNCER 3](#_Toc487643822)

[1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER 3](#_Toc487643823)

[2. El CÁNCER DE PULMÓN 7](#_Toc487643824)

[2.1. EPIDEMIOLOGÍA 7](#_Toc487643825)

[2.2. FACTORES DE RIESGO 9](#_Toc487643826)

[2.3. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA 11](#_Toc487643827)

[2.4. DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN 12](#_Toc487643828)

[2.5. TRATAMIENTO 15](#_Toc487643829)

[2.6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN 16](#_Toc487643830)

[3. MICROARNs Y CÁNCER 21](#_Toc487643831)

[3.1. DEFINICIÓN E HISTORIA 21](#_Toc487643832)

[3.2. NOMENCLATURA 23](#_Toc487643833)

[3.3. BIOGÉNESIS 26](#_Toc487643834)

[3.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA 29](#_Toc487643835)

[3.4.1. MiARNs intergénicos 29](#_Toc487643836)

[3.4.2. MiARNs intragénicos 29](#_Toc487643837)

[3.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS MIRNAS 32](#_Toc487643838)

[4. PAPEL DE LOS MICROARNs EN CÁNCER 35](#_Toc487643839)

[4.1. MIARNs COMO SUPRESORES DE TUMORES 38](#_Toc487643840)

[4.2. MIARNs COMO ONCOGENES 39](#_Toc487643841)

[5. MIARNs EN CÁNCER DE PULMÓN 40](#_Toc487643842)

[5.1. MIARNs COMO BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE PULMÓN 42](#_Toc487643843)

[5.2. MIARNs EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN 46](#_Toc487643844)

[**II.** **OBJETIVOS 49**](#_Toc487643845)

[**III.** **MATERIALES Y MÉTODOS 53**](#_Toc487643846)

[1. PACIENTES Y MUESTRAS 55](#_Toc487643847)

[1.1. PACIENTES 55](#_Toc487643848)

[1.2. MUESTRAS 55](#_Toc487643849)

[2. EXTRACCIÓN DE ARN Y ADN 55](#_Toc487643850)

[3. AISLAMIENTO DE ARN DE PEQUEÑO TAMAÑO 56](#_Toc487643851)

[4. DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN EGFR 57](#_Toc487643852)

[5. DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN KRAS 57](#_Toc487643853)

[6. SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA 59](#_Toc487643854)

[7. SECUENCIACIÓN MASIVA 60](#_Toc487643855)

[7.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE ADNc A PARTIR DE ARN PEQUEÑO 60](#_Toc487643856)

[7.1.1. Hibridación y ligación del ARN 61](#_Toc487643857)

[7.1.2. Transcripción reversa (RT) 61](#_Toc487643858)

[7.1.3. Purificación del ADNc 62](#_Toc487643859)

[7.1.4. Selección del tamaño del ADNc 62](#_Toc487643860)

[7.1.5. Amplificación del ADNc 63](#_Toc487643861)

[7.1.6. Purificación del ADN amplificado 64](#_Toc487643862)

[7.1.7. Evaluación del rendimiento y distribución del tamaño del ADN amplificado 64](#_Toc487643863)

[7.2. PREPARACIÓN DE LAS *BEADS* CON EL SISTEMA SOLID™ 64](#_Toc487643864)

[7.2.1. Preparar la PCR en emulsión (ePCR) 65](#_Toc487643865)

[7.2.2. Rotura de la emulsión y lavado de las *beads* 67](#_Toc487643866)

[7.2.3. Enriquecimiento de las *beads* 68](#_Toc487643867)

[7.2.4. Modificación de los extremos 3’ 68](#_Toc487643868)

[7.3. PROCESO DE SECUENCIACIÓN 68](#_Toc487643869)

[8. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL 69](#_Toc487643870)

[8.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT) 70](#_Toc487643871)

[8.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RTqPCR) 71](#_Toc487643872)

[9. ANÁLISIS DE DATOS 74](#_Toc487643873)

[9.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO EN EL GRUPO PRUEBA E *IN SILICO* 74](#_Toc487643874)

[9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN LOS GRUPOS DE VALIDACIÓN E *IN SILICO* 77](#_Toc487643875)

[**IV.** **RESULTADOS Y DISCUSIÓN 79**](#_Toc487643876)

[1. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA 81](#_Toc487643877)

[1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES 81](#_Toc487643878)

[1.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y SELECCIÓN DEL ARN PARA SECUENCIAR 82](#_Toc487643879)

[1.3. CONTRUCCIÓN DE LAS LIBRERIAS 82](#_Toc487643880)

[1.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA 84](#_Toc487643881)

[1.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIARNS ENTRE MUESTRAS TUMORALES Y NORMALES 86](#_Toc487643882)

[1.6. ANÁLISIS FUNCIONALES - COHORTE DE PRUEBA 91](#_Toc487643883)

[2. ANÁLISIS DE VALIDACIÓN 92](#_Toc487643884)

[2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES 92](#_Toc487643885)

[2.1.1. Análisis del estado mutacional de EGFR y KRAS 94](#_Toc487643886)

[2.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MIRNAs 95](#_Toc487643887)

[2.2.1. Cuantificación y evaluación de la calidad 96](#_Toc487643888)

[2.2.2. Análisis de validación de la expresión de miARNs 96](#_Toc487643889)

[3. MIARNs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN CPNM 105](#_Toc487643890)

[3.1. CORRELACIÓN CON VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS 105](#_Toc487643891)

[3.2. CORRELACIÓN CON PRONÓSTICO 108](#_Toc487643892)

[3.2.1. Variables clinicopatológicas 108](#_Toc487643893)

[3.2.2. Análisis por subgrupos histológicos 109](#_Toc487643894)

[3.2.3. MiARNs 110](#_Toc487643895)

[3.2.4. Firmas pronósticas basadas en miARNs 121](#_Toc487643896)

[3.2.5. Firmas pronósticas de miARNs en subgrupos histológicos 122](#_Toc487643897)

[3.2.6. Análisis multivariante 123](#_Toc487643898)

[3.2.7. Análisis multivariante en subtipos histológicos 124](#_Toc487643899)

[4. VALIDACIÓN IN SILICO DE LA FIRMA PRONÓSTICA DE CPNM 125](#_Toc487643900)

[5. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS 128](#_Toc487643901)

[**V.** **CONCLUSIONES 133**](#_Toc487643902)

[**VI.** **BIBLIOGRAFÍA 137**](#_Toc487643903)

[**VII.** **ANEXOS 173**](#_Toc487643904)

[1. APROBACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO Y LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA INSTITUCIÓN 175](#_Toc487643905)

[2. FINANCIACIÓN 178](#_Toc487643906)

[3. COMUNICACIONES A GONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES 178](#_Toc487643907)

[4. PUBLICACIONES 181](#_Toc487643908)