



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

Estudio de microRNAs salivares en pacientes con cáncer de cuello y cabeza
en la población ecuatoriana



AUTOR

Jessica Viviana Arguello Carrera

AÑO

2017



FACULTAD DE INGENIERÍA Y CIENCIAS AGROPECUARIAS

ESTUDIO DE microRNAs SALIVARES EN PACIENTES CON CÁNCER DE
CUELLO Y CABEZA EN LA POBLACIÓN ECUATORIANA

Trabajo de Titulación presentado en conformidad con los requisitos
establecidos para optar por el título de Ingeniera en Biotecnología

Profesora guía
Dra. Vivian Morera Córdova

Autor
Jessica Viviana Arguello Carrera

Año
2017

DECLARACIÓN DEL PROFESOR GUÍA

“Declaro haber dirigido este trabajo a través de reuniones periódicas con el estudiante, orientando sus conocimientos y competencias para un eficiente desarrollo del tema escogido y dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”

Vivian Morera Córdova
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756346811

DECLARACIÓN DEL PROFESOR CORRECTOR

“Declaro haber revisado este trabajo, dando cumplimiento a todas las disposiciones vigentes que regulan los Trabajos de Titulación”.

Alina Aguirre Quevedo
Doctora en Ciencias Biológicas
CI: 1756594600

DECLARACIÓN DE AUTORÍA DEL ESTUDIANTE

“Declaro que este trabajo es original, de mi autoría, que se han citado las fuentes correspondientes y que en su ejecución se respetaron las disposiciones legales que protegen los derechos de autor vigente”.

Jessica Viviana Arguello Carrera

CI: 1726634767

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. César Paz y Miño por abrirme las puertas del laboratorio y permitirme elaborar mi trabajo de titulación.

A Carolina Salazar, por brindarme la oportunidad de participar en este proyecto y a todos los docentes que a lo largo de estos años me impartieron sus conocimientos y pasión por esta carrera.

DEDICATORIA

A mi madre, por su ejemplo de perseverancia, lucha y dedicación, por enseñarme que en la vida no existen límites y que todo se puede conseguir con amor y esfuerzo, pero sobre todo por su apoyo incondicional a lo largo de mi carrera y toda mi vida.

A mi padre, por su gran esfuerzo y trabajo para permitirme alcanzar esta meta y por toda la confianza depositada en mí. Por ser esa persona que siempre me va a motivar a llegar lejos y superarme en la vida.

A mi hermano Memo, por su amor y felicidad que siempre me contagia.

A mis amigos, que me apoyaron siempre en cada momento de esta etapa y por las lindas historias que pudimos compartir.

Este es el primer sueño cumplido de muchos, con inmenso amor para ustedes.

RESUMEN

El cáncer de cabeza y cuello es una enfermedad que compromete varias estructuras a nivel de esta región, y por lo tanto puede provocar secuelas funcionales y estéticas. En la mayoría de los casos esta enfermedad es diagnosticada en etapas avanzadas, por lo que se considera como una enfermedad desafiante, ya que los métodos convencionales para su diagnóstico son agresivos e incapaces de detectarla en una etapa temprana, por ende es importante el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico a partir de la búsqueda de biomarcadores. Los microRNAs son secuencias pequeñas de ARN de cadena simple no codificante, capaces de regular la expresión de genes diana en procesos biológicos como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular. Asimismo, se ha visto que están involucrados en el desarrollo de enfermedades como el cáncer. El objetivo de este trabajo fue validar cinco miRNAs previamente identificados, comparando su expresión a partir de la saliva de cincuenta y cinco pacientes con cáncer de cuello y cabeza, y cincuenta individuos sanos mediante PCR en tiempo real. Se comparó la presencia de estos miRNAs con estudios realizados en otras poblaciones. Se obtuvo un panel de biomarcadores de cuatro miRNAs con valores de p estadísticamente significativos ($p < 0.05$), obtenidos a partir de una prueba t-student: miR-92a ($p = 0.0025$), miR-124 ($p = 0.0077$), miR-122 ($p = 0.0001$), miR-146a ($p = 0.0387$). Sin embargo, miR-205 no presentó un valor estadísticamente significativo ($p = 0.7546$). Se concluyó que este panel de cuatro miRNAs puede ser utilizado como biomarcadores en el diagnóstico de cáncer de cuello y cabeza usando la saliva como fluido de diagnóstico. Estos miRNAs no presentaron diferencias en su regulación en estudios realizados en otras poblaciones, a excepción de miR-92a, cuya expresión se encontró desregulada en individuos de la población brasileña.

ABSTRACT

Head and neck cancer is a disease that compromises several structures in this region, and therefore can cause functional and aesthetic effects. In most cases is diagnosed in advanced stages, so it is considered a challenging disease. The conventional methods for the diagnosis are aggressive and incapable of detecting it at an early stage, so is important to develop new diagnostic methods based on the search of biomarkers. The microRNAs are small sequences of non-coding single-stranded RNA capable of regulating the expression of target genes in biological processes such as cell proliferation, differentiation and apoptosis. Also, are involved in the development of diseases such as cancer. The objective of this investigation was to validate five previously identified miRNAs, comparing their expression from the saliva of fifty five patients with neck and head cancer, and fifty healthy individuals using real-time PCR, and compared the presence of these miRNAs with studies in other populations. A panel of biomarkers of four miRNAs with statistically significant p values ($p < 0.05$) were obtained from a t-student test: miR-92a ($p = 0.0025$), miR-124 ($p=0.0077$), miR-122 ($p=0.0001$), miR-146a ($p=0.0387$). However, miR-205 did not present a statistically significant value ($p=0.7546$). In conclusion, this panel of four miRNAs can be used as biomarkers in the diagnosis of neck and head cancer using saliva as diagnostic fluid. These miRNAs did not show differences in their regulation in studies performed in other populations, except miR-92a, which was deregulated in Brazilian individuals.

ÍNDICE

1. Capítulo I. Introducción.....	1
1.1. Antecedentes.....	1
1.2. Planteamiento del problema.....	3
1.3. Objetivos del trabajo.....	4
1.3.1. Objetivo general.....	4
1.3.2. Objetivos específicos.....	4
1.4. Justificación.....	4
2. Capítulo II. Marco teórico.....	5
2.1. Cáncer de cuello y cabeza.....	5
2.2. MicroRNAs.....	9
2.3. Saliva como método de diagnóstico.....	11
3. Capítulo III. Diseño del plan experimental.....	14
4. Capítulo IV. Procedimientos.....	15
4.1. Población y muestra.....	15
4.1.1. Población.....	15
4.1.2. Muestra.....	15
4.2. Materiales y métodos para la obtención de datos...	15
4.2.1. Extracción de los microRNAs.....	15
4.2.2. Análisis cuantitativo de los microRNA extraídos.....	16
4.2.3. Síntesis de cDNA.....	16
4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real.....	17
4.3. Evaluación estadística de los resultados.....	18
4.3.1. Normalización de datos.....	18
4.3.2. Valor de $\Delta\Delta Ct$	19
4.3.3. Análisis estadístico.....	19

5. Capítulo V. Resultados y Discusión.....	20
5.1. Validación de los cinco miRNAs analizados.....	20
5.2. miRNAs analizados presentes en la población ecuatoriana en comparación con otras poblaciones.....	25
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	28
6.1. Conclusiones.....	28
6.2. Recomendaciones.....	28
Referencias.....	29
Anexos.....	39

Capítulo I. Introducción

1.1. Antecedentes

El cáncer de cuello y cabeza (CCC) está relacionado con un diverso grupo de enfermedades, que puede comprometer diferentes estructuras como órganos y glándulas. A este grupo pertenecen el cáncer de laringe, faringe y de la cavidad oral, que son de tipo epidermoide, y el cáncer de tiroides y de las glándulas salivales, considerados neoplasias glandulares. Se considera una enfermedad desafiante, pues debido a la complejidad anatómica de esta región puede traer como consecuencia afecciones desde el punto de vista funcional y estético (Nazar et al., 2007).

Los pacientes con estadios avanzados de la enfermedad tienen gran probabilidad de desarrollar una recidiva tumoral o metástasis, por lo que la tasa de supervivencia a 5 años es del 60% (Courthod et al., 2014). Entre los factores de riesgo más comunes que pueden causar este tipo de cáncer están el consumo de alcohol y de cigarrillos, así como el virus del papiloma humano (D'Souza et al., 2007). En la actualidad existen varios métodos de diagnóstico como la tomografía axial computarizada, la resonancia magnética, la tomografía por emisión de positrones, el ultrasonido o la biopsia del tumor (Mehanna & Paleri., 2011). Sin embargo, estos métodos pueden resultar agresivos o poco confiables cuando se los realiza en etapas tempranas de la enfermedad.

Los microRNAs (miRNAs) son secuencias pequeñas de ARN de cadena simple no codificante, que están constituidos por secuencias de 18 a 25 nucleótidos, capaces de regular la expresión de genes diana en procesos biológicos normales como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular (Courthod et al., 2014). El estudio de miRNAs se ha empleado principalmente en la búsqueda de biomarcadores para métodos de diagnóstico y para el estudio de varios procesos biológicos. La desregulación

de los mismos está asociada con enfermedades como el cáncer, la diabetes, la pancreatitis, enfermedades tiroideas, la menopausia, la hipertensión, la obesidad, la cirrosis alcohólica, la malnutrición y el Parkinson. (Yoshizawa & Wong, 2013). Los miRNAs están involucrados en varios procesos patológicos, además de ser reguladores del sistema inmune y la angiogénesis. (Courthod et al., 2014).

La saliva es una mezcla de secreciones provenientes de las glándulas salivales mayores y menores, fluidos gingivales, suero y sangre provenientes de heridas bucales, células epiteliales descamadas, expectoraciones bronquiales y secreciones nasales, además, de virus, bacterias, productos bacterianos, hongos y otros componentes celulares.

Asimismo, la saliva en su composición contiene hormonas, enzimas, proteínas, anticuerpos, componentes antimicrobianos, ADN, ARN mensajero, microARNs y citoquinas. El transporte de biomoléculas a través del endotelio arterial hacia la saliva, puede ocurrir por vía transcelular, por difusión intracelular pasiva y transporte activo, o por medio de ultrafiltración extracelular a través de las glándulas salivales o a través del surco gingival. (Punyadeera et al., 2016).

La saliva ha sido utilizada para la detección y predicción de la progresión de enfermedades (Punyadeera et al., 2016). Existen varios dispositivos de diagnóstico que utilizan la saliva, un ejemplo es el dispositivo Philips-CoZarat, utilizado para detectar el abuso de drogas, que consiste en un cartucho plástico descartable que se carga automáticamente con una gota de sangre o saliva; otros ejemplos son el Oasis diagnostics®, que permite la detección de patógenos mediante la saliva y el OraSure que facilita la detección del VIH mediante este biofluido (Carrio et al., 2015).

El uso de la saliva para el diagnóstico presenta grandes ventajas, pues su recolección es fácil y no invasiva, se pueden tomar varias muestras al mismo

tiempo, es viable en situaciones clínicamente difíciles, existe un mínimo riesgo de contagio de enfermedades letales y es ideal para países en vías de desarrollo (Malamud, 2011).

Los cinco miRNAs validados en este trabajo fueron identificados previamente en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UDLA, a partir de la saliva de pacientes con CCC e individuos sanos mediante arreglos de PCR arraymiScript™. Estos son: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-122-5p y hsa-miR-146a-5p.

1.2. Planteamiento del problema

El CCC es una de las enfermedades diagnosticadas con mayor frecuencia a nivel mundial, siendo el sexto cáncer más común (Courthod et al., 2014).

En los pacientes en los que se realiza un diagnóstico temprano, la cirugía o radioterapia pueden resultar curativas en la mayoría de los casos. Sin embargo, los individuos que presentan un estadio avanzado de la enfermedad requieren tratamientos integrados, que incluyen la quimioterapia, la radioterapia y la yodoterapia. Estos tratamientos afectan al sistema inmune y presentan efectos secundarios altamente agresivos (Escobedo, 2001). Lamentablemente, el CCC se diagnostica con mayor frecuencia en etapas avanzadas, cuando ya existe metástasis en los ganglios linfáticos regionales, razón por la cual los pacientes tienen un elevado riesgo de recurrencia (Courthod et al., 2014).

En la actualidad, no existen pruebas para el diagnóstico temprano y poco invasivo en el CCC. La saliva es un fluido biológico que constituye una buena alternativa para el diagnóstico precoz de distintas enfermedades en comparación con la sangre y la orina.

1.3. Objetivos del trabajo

1.3.1. Objetivo general

Determinar miRNAs salivales desregulados y específicos de pacientes con cáncer de cuello y cabeza en la población ecuatoriana.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Validar la expresión diferencial de cinco miRNAs en estudio mediante RT-qPCR.
2. Comparar la expresión de los miRNAs en la saliva de individuos con CCC de la población ecuatoriana con otras poblaciones a nivel mundial.

1.4. Justificación

Un diagnóstico temprano para pacientes con cáncer de cuello y cabeza, significa una disminución en la mortalidad y morbilidad a causa de esta enfermedad. Por lo tanto, es importante desarrollar métodos diagnóstico capaces de detectar la enfermedad en etapas tempranas, y este objetivo se puede lograr mediante la identificación de biomarcadores como los miRNAs (Wang et al., 2015). Además, los miRNAs están presentes de forma estable en varios fluidos corporales como la saliva, sangre, orina, e incluso en el aire expirado durante el proceso de la respiración. (Park et al., 2009).

El desarrollo de un método de diagnóstico basado en el análisis molecular a partir de marcadores biológicos como los miRNAs, puede proporcionar a los pacientes con CCC resultados tempranos, a partir de métodos no invasivos. Esto es importante, pues los métodos convencionales, a pesar de utilizar equipos de última generación, no son capaces de detectar la

enfermedad cuando el desarrollo del tumor no es evidente (Palka, Slebos & Chung, 2009). Además, en el caso de la biopsia del tumor puede implicar un procedimiento quirúrgico, altamente invasivo. Otra gran ventaja para países subdesarrollados es que no se requiere de tecnología sofisticada y cara. Cabe mencionar, que este estudio se realizará por primera vez en la población ecuatoriana.

Capítulo II. Marco Teórico

2.1. Cáncer de cuello y Cabeza

En la mucosa de las vías aerodigestivas superiores (VADS), que es la que recubre la zona de cabeza y cuello, se desarrolla el 85% de los casos de este tipo de cáncer, el 15% restante, incluye a los tumores en los huesos faciales, de la glándula tiroides, la piel, las partes blandas y cartílagos.

Las VADS, incluyen estructuras tales como la cavidad oral, la faringe, el esófago, las glándulas salivales, el oído medio y los conductos respiratorios: las fosas nasales, tráquea, laringe y senos paranasales (Gallegos, 2006) .

Hace varias décadas, el desarrollo de ciertos tipos de CCC se encontraba estrechamente relacionado con factores de riesgo tales como el consumo de alcohol y de cigarrillos. En el cigarrillo, la actividad carcinogénica está relacionada con las partículas existentes en el humo del tabaco, las cuales actúan como iniciadores o cocarcinógenos. El riesgo de incidencia de CCC en pacientes fumadores, con respecto a los no fumadores es de tres a quince veces más, y está relacionado con el tiempo de consumo, la dosis y la edad de iniciación. Con respecto al consumo de alcohol, se ha observado que depende del tipo del alcohol, ya que los licores oscuros contienen mayor cantidad de carcinógenos como éster y acetaldehído en comparación con los licores claros. Además, bebidas como la cerveza contienen nitrosodimetilamina, y los licores destilados y el vino contienen

ciertos tipos de taninos. Sin embargo, la incidencia de CCC actualmente se encuentra vinculada con la infección oral por el virus del virus humano, específicamente el VPH-16, debido a las nuevas tendencias en las prácticas sexuales de las últimas décadas (Patel et al., 2011).

No obstante, no todos los pacientes con cáncer de cuello y cabeza son fumadores o bebedores, por lo que se ha evidenciado que existe también una predisposición genética, que puede estar relacionada con problemas en la metabolización de carcinógenos, alteraciones en la apoptosis celular o en los sistemas de reparación de ADN (Gallegos, 2006).

La sintomatología que puede dar indicios de la enfermedad es la presencia de manchas rojas o blancas y rojas en la mucosa oral, que persistan durante más de veintiún días, ulceraciones en la orofaringe o en la mucosa oral o inflamaciones orales persistentes, movilidad dentales no asociadas con complicaciones periodontales, molestias en la garganta por más de un mes y problemas al tragar que no pueden resolverse con antibióticos, ronquera, masa o abultamiento en el cuello y debilidad o dolor facial severo (Duffy et al., 2011).

Un diagnóstico temprano de los diferentes tipos de cáncer de cuello y cabeza puede mejorar el pronóstico de la enfermedad y por lo tanto, reducir la mortalidad y morbilidad de los pacientes. Además, los tratamientos serían menos agresivos y más efectivos, evitando recidivas tumorales o metástasis. Sin embargo, en muchos casos los síntomas tardan en presentarse y los pacientes demoran en acudir a un médico general (Jones, 2002).

Los métodos de diagnóstico actuales para este tipo de cáncer comienzan con un examen físico, en el cual el médico se encarga de examinar minuciosamente la cavidad bucal, la orofaringe, el cuello, los oídos y ojos. Dependiendo de los resultado de este examen , se puede realizar una

tomografía computarizada con el fin de evaluar el alcance del cáncer, sin embargo, muchas veces se suministra yodo al paciente con el fin de que las imágenes sean más claras, pues éste sirve como contraste (Fagan, 2015).

También, se puede realizar una resonancia magnética, la cual utiliza ondas de radio y magnetismo para construir imágenes detalladas de secciones transversales del cuerpo. Esta prueba no causa dolor, sin embargo, el ruido que produce el equipo puede causar molestias en el paciente.

Otra alternativa que se utiliza es la tomografía por emisión de positrones o PET, que se emplea frecuentemente para diagnosticar cáncer oral, cáncer de faringe y cáncer de laringe, o para observar si el cáncer se ha diseminado. Para la ejecución de este examen, se le inyecta al paciente una solución de glucosa que contiene material radioactivo, la cual se propaga por todo el organismo y se acumula en las células, incluyendo las células cancerígenas, las cuales usan más energía, por lo que aparecen como “puntos calientes” en el resultado. A pesar de la efectividad de esta prueba su costo es muy alto y el acceso a los equipos es limitado (Duffy et al., 2011).

En ciertos casos también se realiza un ultrasonido, especialmente para evaluar el cáncer de faringe o a su vez, para ver si otro tipo de cáncer se ha diseminado. Para esta prueba se emplea un gel que se extiende por el cuello y se utiliza un aparato denominado transductor, el cual genera ondas de sonido que son capaces de enfocar masas como órganos o tumores (Mehanna & Paleri, 2011).

Asimismo, se pueden utilizar rayos X para el diagnóstico de CCC con el fin de comprobar si hay presencia de tumores o daños en los huesos. Se emplea la ortopantomografía, que es usada para examinar los dientes y la

mandíbula en pacientes que padecen cáncer de boca; la radiografía de tórax, para descartar que el cáncer se haya propagado a los pulmones y comprobar el estado de salud en pacientes con cáncer de boca, laringe o faringe; además, en pacientes con cáncer nasal o de senos paranasales se suele realizar una radiografía de huesos faciales.

En una etapa muy avanzada de la enfermedad, se procede a realizar una biopsia del tumor, lo cual implica un procedimiento quirúrgico, que es altamente invasivo. Sin embargo, los métodos mencionados anteriormente solo son capaces de diagnosticar el CCC cuando ya la enfermedad se ha desarrollado notablemente y hay presencia del tumor, es decir, en un estadio avanzado (Fagan, 2015).

Es importante mencionar que para determinar el estadio del cáncer se utiliza el sistema TNM (Tumor, Nódulo/s, Metástasis), el cual es utilizado tanto en CCC como en otros tipos de cáncer. Dicho sistema nos permite saber el tamaño del tumor y si se ha propagado a otras partes del cuerpo, basándose en un método cualitativo en el que T se refiere al tamaño del tumor primario, donde se asignan números del uno al cuatro, siendo cuatro el que implica el mayor tamaño tumoral. N indica si el cáncer se ha propagado a los ganglios linfáticos regionales del cuello. Si no hay nódulos afectados se asigna el número cero y dependiendo el grado de diseminación a los nódulos se asignan números del uno al tres; y por último, la M indica si el cáncer ha hecho metástasis, siendo cero si el resultado es negativo y uno si el resultado es positivo (Duffy et al., 2011).

El tratamiento del CCC depende del tipo de cáncer, su estadio y su ubicación. Por ejemplo, el cáncer oral se trata mediante cirugía y si es necesario posteriormente con radioterapia. En ciertas ocasiones, la quimioterapia se aplica en combinación con estos tratamientos. Por otra parte, el cáncer en las glándulas salivales, igualmente es tratado con cirugía, seguida de radioterapia. La quimioterapia se recomienda

solamente si el cáncer se ha diseminado (Kruse et al., 2011). Del mismo modo, el cáncer de faringe se trata con cirugía o radioterapia y en ciertos casos con quimioterapia. Por otra parte, el cáncer de laringe se trata con cirugía láser o radioterapia cuando se encuentra en las primeras etapas. Cuando está más avanzado se combina la radioterapia con la quimioterapia y se realiza cirugía si la radioterapia no ha funcionado del todo o si el cáncer ha recidivado seguido de radioterapia o radioterapia y quimioterapia combinados. Además, en casos de cáncer nasal o senos paranasales, se trata mediante cirugía, seguido de radioterapia y/o quimioterapia (Duffy et al., 2011).

2.2. miRNAs

Los miRNAs se localizan principalmente en intrones de genes codificantes o en regiones intergénicas y son transcritos por la ARN polimerasa II para formar un miRNA primario (pri-ARNm) que se caracteriza principalmente por un cambio de nucleótido en el extremo 5' y una cola poliA en el extremo 3', para posteriormente convertir este pri-ARNm en un segundo precursor (pre-miARN) mediado por una proteína nuclear (DGCR8) y una ribonucleasa denominada Drosha (Lee et al., 2004). Este pre-miARN, es posteriormente llevado hacia el citoplasma por medio del transportador Ran-GTP dependiente de exportina-5, para luego ser cortado mediante el complejo Dicer a un miRNA de 18 a 25 nucleótidos (Kwak, Iwasaki, & Tomari, 2010). Finalmente, se une a la proteína Argonauta que activa el complejo RISC, el cual orientará a los miRNAs encargados de la expresión génica del ARNm diana de unión y su posterior degradación (Courthod et al., 2014).

Varios estudios han comprobado la expresión de miRNAs en varios tipos de cáncer, y se ha encontrado que juegan un papel como supresores de tumores o como oncogenes (Healy et al., 2012). En pacientes con cáncer, los miRNAs que actuaban como supresores tumorales presentaban una

baja expresión, mientras que los que funcionaban como oncogenes tenían una alta expresión (Kwak et al., 2010). Existen evidencias de que los miRNAs endógenos son estables, están protegidos de RNAsas y permanecen inalterables incluso tras ser sometidos a condiciones desfavorables (Hu et al., 2010).

Muchos miRNAs se expresan diferencialmente en células cancerígenas en comparación con las células normales, lo que sugiere que los miRNAs pueden ser usados con fines diagnóstico en el cáncer (Lu et al., 2005). Esto se debe a que existen ciertos mecanismos de alteración de los miRNAs que se relacionan directamente con el desarrollo de algunas enfermedades, como por ejemplo, modificaciones en el número de copias y la ubicación de los miRNAs. Muchos de estos están en localizaciones genómicas que se encuentran relacionados con el cáncer o sitios vulnerables, razón por la cual son más susceptibles a alteraciones debido a deleciones, amplificaciones o traslocaciones de estas regiones cromosómicas (Pabón, 2011).

Cuando se producen alteraciones en el proceso de regulación transcripcional de los miRNAs se puede desencadenar el desarrollo de enfermedades. Ciertos miRNAs que se expresan de forma autónoma poseen regiones promotoras, las cuales regulan la expresión de estos en un determinado tipo de células. En casos de traslocación cromosómica se puede producir una elevada expresión de oncogenes. Asimismo, algunos miRNAs están vinculados con su autoregulación, por lo que la pérdida de la misma promueve el desarrollo del cáncer (Farazi et al., 2011).

Las aplicaciones de los miRNAs han sido ampliamente estudiadas a partir de su descubrimiento, una de estas es el desarrollo de esquemas terapéuticos. Por ejemplo, se ha demostrado que el miR-375 tiene altos niveles de expresión a nivel de los islotes pancreáticos, por lo que en animales se observa hiperglicemia cuando existe carencia de este miRNA,

lo cual disminuye la suficiencia endócrina pancreática provocando diabetes (Poy et al., 2009). Además, el miR-30d aumenta la producción de insulina y por lo tanto su inhibición bloquea la transcripción del gen de insulina. Lo que contribuye al desarrollo de terapias para el tratamiento de la diabetes (Tang et al., 2009).

Por otra parte, también se ha propuesto el uso de miRNAs en terapia génica como el miR-203, luego de haber comprobado que el gen ABL es diana de la represión que ejerce este miRNA en varias enfermedades oncogénicas como la leucemia (Bueno et al., 2008).

Asimismo, se ha demostrado la capacidad del bloqueo en la síntesis de ciertos miRNAs como blanco farmacológico. Por ejemplo, el miR-21 está involucrado en algunos tipos de cáncer como mama, pulmón y ovario. Se ha visto que su síntesis se ve bloqueada por la molécula diazobenzona 2, con lo que se espera que en un futuro la aplicación de ciertos miRNAs sintéticos o el bloqueo en su síntesis pueda ayudar al desarrollo de tratamientos más eficaces y con menos efectos secundarios en ciertas enfermedades (Lugo & Trujillo., 2009). Sin embargo, otra aplicación muy interesante, es el análisis de perfiles de expresión de miRNAs en ciertas enfermedades, como CCC, cáncer de pulmón y cáncer de colon, lo que sirve potencialmente para el diagnóstico (Avisar et al., 2009).

2.3. Saliva como método de diagnóstico

El diagnóstico temprano del cáncer es importante para evitar complicaciones que podrían afectar la calidad de vida del paciente. Sin embargo, en el caso del CCC, solamente se detecta en fases tardías de la enfermedad. Una solución a este problema es el uso biomarcadores entre los cuales se incluye material genético y moléculas que reflejen el estado fisiológico del paciente (Lee & Wong., 2009).

Estos biomarcadores se pueden extraer a partir de algunos fluidos corporales tales como la sangre, la orina y también del líquido cefalorraquídeo. Sin embargo, la ausencia de métodos de recolección no invasivos y de bajo costo, así como la detección precisa y portátil pueden significar un inconveniente. No obstante, el análisis a partir de la saliva puede usarse como una herramienta de diagnóstico potencial, debido a su facilidad de recolección y poco invasiva, además que posee en su composición marcadores biológicos como ADN, ARN y proteínas (Muhammad et al., 2015). Una prueba del éxito del diagnóstico por vía oral, es el hecho de que en las últimas décadas, el termómetro oral ha reemplazado por completo al termómetro rectal, además de una prueba salival para la detección del VIH, que es tan específica y sensible como las pruebas de sangre. Asimismo, posee grandes ventajas el uso de saliva como método de diagnóstico, ya que su recolección es poco invasiva y libre de estrés para el paciente, por lo que se pueden realizar varias recolecciones a varios pacientes a la vez. Su recolección, almacenamiento y transporte es fácil y no requiere de personal altamente capacitado, además, de ser mucho más seguro su manejo en comparación con la sangre, orina y demás fluidos (Malamud, 2011).

Otra gran ventaja es que la saliva es un líquido en tiempo real, ya que las glándulas salivales son glándulas exocrinas que son capaces de producir perfiles de proteínas que demuestran el estado de salud del paciente justamente en el momento de la recolección. Es importante mencionar que debido a estas características, el uso de la saliva para el diagnóstico se puede emplear en todo tipo de pacientes, desde bebés y niños hasta ancianos, igualmente, en pacientes en los cuales el muestreo de sangre u orina sean clínicamente difíciles (Pfaffe et al., 2011).

La saliva puede ser recogida con o sin estimulación. Las dos mejores maneras de recoger toda la saliva son el método de drenaje, en el que se hace a la saliva gotear fuera del labio inferior; y el método de escupir, en el

que el paciente expectora saliva usando un tubo de ensayo o tubo falcon (Mandel, 1993). Sin embargo, existen otros métodos como el hisopado y el método de aspiración, además en pacientes que su flujo de saliva es bajo, se puede estimular mediante la masticación de un trozo de parafina o la aplicación de aproximadamente una gota de ácido cítrico de 0.1 a 0.2 mol/L directamente en la lengua (Pfaffe et al., 2011).

La mayor parte de las moléculas orgánicas presentes en la saliva son producidas en las glándulas salivales. Sin embargo, otras son transportadas desde la sangre, lo cual se realiza por medio de algunos mecanismos. Uno de ellos es la difusión, para lo cual la molécula debe atravesar ciertas barreras como las paredes capilares, el espacio intersticial, la membrana celular basal, el citoplasma y la membrana celular luminal. Además, depende de ciertas características de la biomolécula como su tamaño y polaridad, por lo que si una biomolécula es de naturaleza polar no podrá atravesar la membrana de fosfolípidos. Un claro ejemplo es la difusión de hormonas esteroides, las cuales son relativamente pequeñas y están compuestas de ácidos grasos por lo que es fácil su paso a través de difusión, pero si se trata de algunas proteínas como la albúmina del suero, es difícil debido a su gran tamaño (Vining & McGinley & Symons., 2013).

Otro mecanismo de transporte de moléculas hacia la saliva, es el transporte activo. Por ejemplo, la IgA polimérica es secretada por los linfocitos B en proximidad con las células salivales, la cual se une a los receptores de IgA presentes en las células de los acinos, y posteriormente se libera a la saliva (Kugler & Hess & Haake., 2012). Por último, las biomoléculas también pueden ser transportadas por filtración a través de los espacios intercelulares. Sólo las moléculas que presentan un peso molecular <1900 Da, como agua, iones, catecolaminas y esteroides, se transfieren a través este mecanismo (Pfaffe et al., 2011).

Capítulo III. DISEÑO DEL PLAN EXPERIMENTAL

En el presente trabajo se validaron marcadores moleculares (miRNAs) para el diagnóstico de CCC, que pudieran estar desregulados en pacientes en comparación con individuos sanos. A continuación se presenta un esquema que representa el diseño experimental del trabajo.

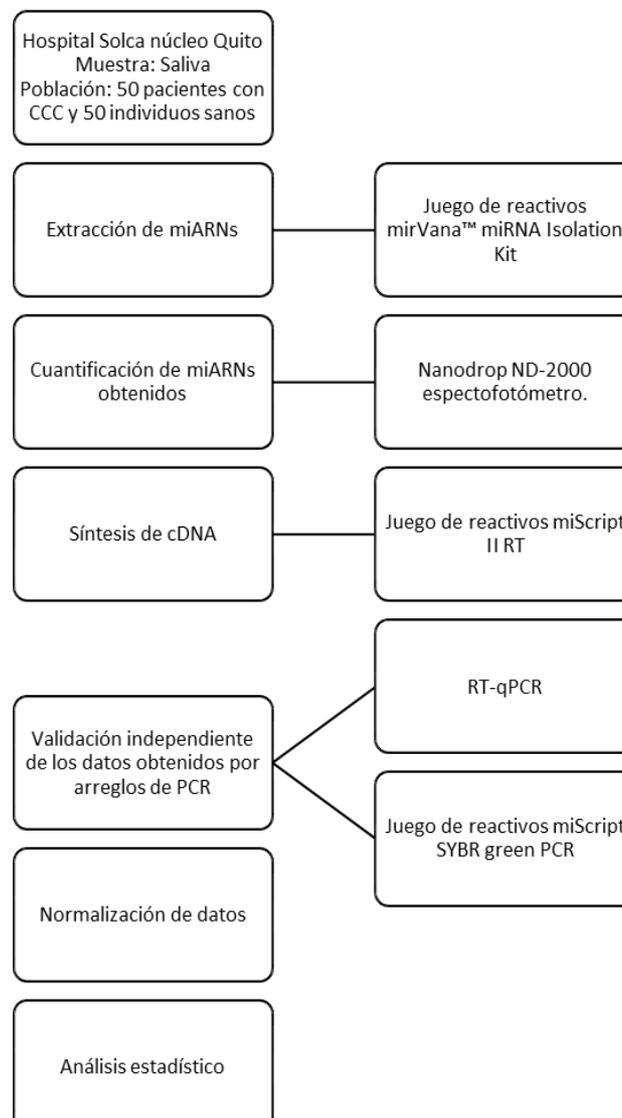


Figura 1. Diagrama de flujo del diseño experimental para la validación de miRNAs salivales en pacientes con CCC.

Capítulo IV. Procedimientos

4.1. Población y muestra

4.1.1. Población

Para el estudio se seleccionaron 55 individuos diagnosticados con CCC en el hospital Solca, núcleo Quito. Estos pacientes cumplían con la condición de no haber recibido ningún tratamiento previo. Para el grupo control se escogieron 50 individuos sanos, no fumadores, con buena higiene bucal y sin antecedentes de la enfermedad.

4.1.2. Muestra

La muestra utilizada fue saliva. Se pidió a los pacientes tomar asiento, colocar la espalda hacia adelante y con su mano sostener un tubo falcon de cincuenta mililitros frente a la boca y escupir. Si al paciente se le dificultaba la producción de saliva se le pedía realizar movimientos con la lengua y las mejillas con el fin de estimular las glándulas salivales, recolectando aproximadamente de tres a cinco mililitros de saliva. Las muestras fueron conservadas en hielo seco y se trasladaron directamente al laboratorio para ser procesadas.

4.2. Materiales y métodos para la obtención de los datos

4.2.1. Extracción de los microRNAs

Para la extracción de los miRNAs se utilizó el juego de reactivos mirVana™ miRNA Isolation (ThermoFisher Scientific, CA, EEUU).

Antes de empezar con el procedimiento, se calentó la solución de elución en el bloque térmico AccuBlock™ Digital Dry Block (Labnet, NJ, EEUU) a 95°C. En un tubo eppendorf de 1.5 mL se colocaron 300 µL de saliva y se añadieron 30µL

del aditivo homogenizado, contenido en el juego de reactivos. Esta mezcla se agitó en el vórtex. Posteriormente, se dejó reposar durante diez minutos en hielo, y se añadieron 200 μL de Trizol y se agitó en el vórtex durante 60 segundos. Luego, se centrifugó durante cinco minutos a 10000 rcf y transcurrido este tiempo se tomó el sobrenadante y se depositó en un nuevo tubo. Se agregó etanol al 100%, (una tercera parte del volumen contenido previamente) y se agitó en el vórtex. Seguidamente, se colocó un filtro en un tubo por cada muestra, y se pipeteó hasta 700 μL del lisado y se llevó al filtro. El filtro, que está compuesto de fibra de vidrio, se encarga de la inmovilización del ARN para purificarlo posteriormente. Se centrifugó durante 15 segundos a 10000 rcf y se pasó el filtrado a un nuevo tubo, conservando el filtro, y se añadieron dos terceras partes del volumen de alcohol al 100% y se agitó en el vórtex. Terminado este proceso, se pipeteó todo el volumen y se pasó al filtro nuevamente. A continuación se centrifugó durante quince segundos a 10000 rcf y se descartó el filtrado. Luego, se añadieron a la columna 700 μL de la solución de lavado 1, incluida en el juego de reactivos y se centrifugó durante diez segundos a 10000 rcf y se eliminó el filtrado. Posteriormente, se añadieron a la columna 500 μL de la solución de lavado 2/3, también incluida en el juego de reactivos y se centrifugó por diez segundos a 10000 rcf y se eliminó el filtrado. Se repitió una segunda vez este último paso. Luego, se centrifugó la columna durante un minuto a 10000 rcf. Por último, se transfirió la columna a un nuevo tubo y se añadieron 30 μL de la solución de elución precalentada y se centrifugó durante 30 segundos a 3000 rcf.

4.2.2. Análisis cuantitativo de los microRNA extraídos

Las muestras de miRNA extraídos fueron cuantificadas en NanoDrop 2000 (ThermoScientific, Waltham, EEUU). Se utilizó 1 μL de la muestra y se cuantificó la concentración de ARN en ng/ μL . y la absorbancia a 260/280 nm. La lectura arrojó la concentración de los miRNAs en ng/ μL .

4.2.3. Síntesis de cDNA

La síntesis de cDNA se llevó a cabo empleando el juego de reactivos miScript II RT con tampón Hispec (Qiagen, Valencia, CA, EE.UU). Se descongelaron los tubos de ARN y los reactivos del juego de reactivos y se centrifugó rápidamente para recolectar todo el reactivo en el tubo.

Posteriormente, se preparó el master mix añadiendo 4 μ L de la solución tampón HiSpec miScript, 2 μ L del 10x mezcla de ácidos nucleicos, 2 μ L de Transcriptasa reversa miScript y el volumen de la solución de miRNA extraído, previamente diluido a 5 μ M; se calculó dividiendo 125 para la concentración de cada miRNA, y se añadió el volumen restante de agua libre de RNAsa para alcanzar un volumen total de 20 μ L. Terminado este paso, se añadió la solución tampón modelo de RNA a cada tubo y se centrifugó brevemente cada tubo y se colocaron en hielo. Luego, utilizando el termociclador SureCycler8000 (Agilent, Santa Clara, EEUU), se incubó durante 60 minutos a 37°C y durante 5 minutos a 95°C y por último se añadieron 200 μ L de agua libre de RNAsas.

4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa en tiempo real

Los miRNAs específicos para CCC, identificados previamente mediante arreglos de PCR en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, fueron :

hsa-miR-92a-3p (UAUUGCACUUGUCCCGGCCUGU) hsa-miR-205-5p (UCCUUCAUCCACCGGAGUCUG) hsa-miR-124-3p (UAAGGCACGCGGUGAAUGCC) hsa-miR-122-5p (UGGAGUGUGACAAUGGUGUUUG) hsa-miR-146a-5p (UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU).

Se utilizó un gen constitutivo, SNORD 96A

(CCUGGUGAUGACAGAUGGCAUUGUCAGCCAAUCCCAAGUGGGAG UGAGGACAUGUCCUGCAAUUCUGAAGG), que se caracteriza por mantener

su nivel de expresión constante en todas las células independientemente de las condiciones del organismo (Salazar et al., 2014).

Para la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR) se utilizó el juego de reactivos miScript SYBR Green PCR (Qiagen, CA, EEUU). Se preparó la solución madre con un volumen final de 25 μ L, que contenía: 12.5 μ L de SYBR Green PCR Master Mix, 2.5 μ L de 10x miScript Universal Primer, 2.5 μ L de cada uno de los cebadores a concentración 5 μ M, 5 μ L de agua libre de RNAsa y 2,5 μ L de cDNA. A continuación, para medir el nivel de expresión mediante el valor de Ct, se utilizó el equipo de PCR en tiempo real, Stratagene Mx3005P (Agilent, CA, EEUU), se incubaron las muestras a 95°C durante 15 minutos para activar la ADN Taq polimerasa, seguido de 40 ciclos de 94°C durante 15 segundos, 55°C durante 30 segundos y 70°C durante 30 segundos; y por último, un ciclo de 95°C por 15 segundos, 60°C durante un minuto y 95°C por 15 segundos.

Tabla 1

Condiciones experimentales para evaluar la expresión de miRNAs mediante RTq-PCR utilizando el juego de reactivos miScript SYBR green PCR.

Número de ciclos	Tiempo	Temperatura
1	Tiempo de espera	
	15 minutos	95°C
40	PCR	
	15 segundos	94°C
	30 segundos	55°C
	30 segundos	70°C (colección de datos)
1	Curva de fusión	
	15 segundos	95°C
	1 minuto	60°C
	15 segundos	95°C (colección de datos)

4.3. Evaluación estadística de los resultados

4.3.1. Normalización de los Datos

El valor de Ct nos muestra el nivel de expresión del miRNA, muy intenso y positivo (<29), débil (30-37), contaminación (38-40) El valor de ΔCt es la diferencia de expresión entre dos miRNAs, el que estamos ensayando y el gen endógeno (Salazar et al., 2014). Calculando este valor podemos llevar a cabo la normalización de los datos.

Para esto, se procedió a organizar los valores de Ct de las muestras de acuerdo a cada miRNA, luego, se restó el valor de cada muestra con el valor de Ct del SNORD.

4.3.2. Valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$

El valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$ nos permite evaluar el cambio en la expresión de cada miRNA con respecto al grupo control, o también denominado "Fold change" (Salazar et al., 2014).

Una vez normalizados los datos, se restaron los valores de Ct de los pacientes menos los de los controles, valor que se define como ΔCt . Para el valor de $\Delta\Delta\text{Ct}$ se elevó dos al número de ΔCt negativo.

4.3.3. Análisis estadístico

Utilizando el programa GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, 2016), disponible en www.graphpad.com/scientific-software/prism/, se analizaron los parámetros estadísticos como el valor t-student para cada uno de los miRNAs, para comprobar la validez de estos biomarcadores para el diagnóstico de CCC.

Capítulo V. Resultados Y Discusión

Actualmente es importante la búsqueda de biomarcadores presentes en el CCC que nos permitan proporcionar un diagnóstico en las etapas iniciales de la enfermedad. En el presente trabajo se validó la expresión diferencial de cinco miRNAs entre pacientes con CCC e individuos sanos de la población ecuatoriana.

5.1. Validación de los cinco miRNAs analizados

De acuerdo a la metodología realizada, a partir de los valores de Ct de muestras y controles, se obtuvieron los valores normalizados y el $\Delta\Delta Ct$ de cada miRNA estudiado.

Con los resultados obtenidos de Ct y $\Delta\Delta Ct$, se obtuvo el análisis estadístico utilizando el software GraphPad Prism 6, mediante el cual podemos analizar cada miRNA como posible biomarcador en el panel de diagnóstico.

Tabla 2.

Panel de miRNAs con su respectivo valor de p obtenido a partir de un análisis estadístico t-student, y la regulación “a la alta” o “a la baja” (el valor negativo muestra una regulación hacia abajo).

miRNA	Valor de p ($p < 0.05$)	Regulación “a la alta” o “a la baja”
hsa-miR-92a-3p	0.0025	-10.30
hsa-miR-124-3p	0.0077	-18.95
hsa-miR-122-5p	0.0001	-10.36
hsa-miR-146a-5p	0.0387	-7.85
hsa-miR-205-5p	0.7546	-3.04

En el caso de hsa-miR-92a-3p, en el análisis estadístico se obtuvo un valor de p de 0.0025 y una regulación negativa de -10.30. Teniendo en cuenta el valor de p, la expresión diferencial es estadísticamente significativa al ser $p < 0.05$, lo cual quiere decir que existe un 0.25% de probabilidad de que este biomarcador falle en el diagnóstico de CCC. En estudios anteriores se describe a miR-92a como un microARN perteneciente al grupo miR-17~92, el cual fue descrito como un grupo de miRNAs oncogénico. Sin embargo, estudios posteriores han analizado los miRNAs pertenecientes a este grupo, indicando que no todos actúan como oncogenes (Mogilyansky & Rigoutsos., 2013).

Un posible vínculo entre la expresión del miR-92a y la tumorigénesis se ha demostrado a partir de estudios de los niveles de miR-92a en el plasma de pacientes con diferentes tipos de neoplasias malignas. En la leucemia, este miRNA se ha identificado como un biomarcador eficaz para distinguir entre pacientes con la enfermedad e individuos sanos (Tanaka et al., 2009). Este biomarcador también presentó una expresión diferencial en personas con cáncer colorrectal (Huang et al., 2010).

Además, en pacientes con cáncer hepatocelular, se pudo observar que el miR-92a presentaba una regulación más baja en comparación con los controles sanos (Shigoka et al., 2010), lo cual concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo, ya que igualmente se obtuvo una regulación hacia abajo. Asimismo, varios experimentos han mostrado cómo actúa miR-92a en la proliferación de las células cancerígenas, concluyendo que actúa en el crecimiento tumoral, la inhibición de la apoptosis celular y la metástasis (Molin et al., 2014).

En el caso de CCC, el miR-92a no ha sido ampliamente estudiado (Li et al., 2014). En el presente trabajo se observó que en individuos de la población ecuatoriana, este biomarcador presentaba diferencias en la regulación en comparación con individuos sanos. Este resultado es similar a un estudio realizado en Brasil, donde se comprobó que el grupo miR-17~92 tuvo una expresión diferencial en pacientes con CCC en comparación con individuos

sanos (Severino et al., 2013). Por lo tanto, este miRNA puede ser utilizado en el panel de biomarcadores de CCC para el diagnóstico en la población ecuatoriana.

En el caso de miR-124, se obtuvo un valor de $p=0.0077$ y una regulación a la baja de -18.95 . El valor de p obtenido a partir de la prueba t-student fue estadísticamente significativo, por lo que este miRNA podría ser usado como biomarcador en el diagnóstico de CCC. Estudios anteriores han informado que este miRNA controla la angiogénesis, la quimiosensibilidad y la proliferación de células cancerosas (Woods et al., 2007). Un estudio realizado por Mestadagh et al., (2010), mostró que miR-124 regulaba negativamente los transductores de señal y activadores de la transcripción 3 (STAT3) para reducir la tumorigenicidad de las células de carcinoma colorrectal y hepatocelular. Se ha evidenciado que miR-124 se presenta como un supresor tumoral y la baja expresión de este miRNA puede desencadenar la iniciación o la progresión tumoral (Manchao et al., 2015), lo que concuerda con los resultados obtenidos en este trabajo. En un estudio realizado en Estados Unidos, miR-124 se presentó regulado a la baja en pacientes con CCC en comparación con individuos sanos, además, se observó que dicho miRNA se une a la región 3'-UTR para regular negativamente los niveles de ESX (restricción epitelial con una caja de serina) que es un miembro de la familia del factor de transcripción ETS, responsable de regular el receptor del factor de crecimiento epidérmico en células escamosas de cáncer de cabeza y cuello. Para este estudio se emplearon líneas celulares de individuos con CCC y controles sanos, y se obtuvieron resultados similares a los obtenidos en este trabajo.

En cuanto al hsa-miR-122-5p, se obtuvo un valor de p de 0.0001 y una regulación a la baja de -10.36 . Al ser el valor de $p < 0.05$, al igual que en los analizados anteriormente es estadísticamente significativo. Un estudio realizado por Ma et al., (2010), evidenció que la sobreexpresión de miR-122 podría inducir la apoptosis frenar el desarrollo de células cancerosas a través de la disminución de la expresión de los genes *Bcl-W* y / o *CCNG1*. Estos hallazgos

sugieren que miR-122 puede comportarse como un supresor tumoral en los diferentes tipos de cáncer. En un estudio previo también se demostró que miR-122 juega un papel importante en la inhibición de la tumorigénesis a través la regulación de la vía PI3K / Akt / mTOR / p70S6K (Biyun et al., 2012). Estos resultados concuerdan con los obtenidos en este estudio, ya que este miRNA se presentó como un supresor tumoral al tener una regulación a la baja en comparación con individuos sanos.

Sin embargo, este miRNA ha sido reportado principalmente en cáncer hepático y su estudio en CCC ha sido limitado, por lo que este hallazgo puede definir al miR-122 como un biomarcador para el diagnóstico de CCC, específicamente en individuos de la población ecuatoriana.

Por otra parte, hsa-miR-146a-5p, presentó un valor de $p=0.0387$ y una regulación negativa igual a -7.85 . Teniendo en cuenta el valor de p obtenido, su regulación diferencial es estadísticamente significativa. Este miRNA está implicado en la regulación de la diferenciación celular y en la formación de células cancerosas (Rusca & Monticelli, 2011). Ha sido ampliamente caracterizado en cáncer de cuello y cabeza a partir de varios estudios. En cáncer de tiroides, se ha observado que miR-146a tiene una diferencia en la expresión de 3.9 veces menos en personas que padecen la enfermedad en comparación con individuos sanos (Jazdzewski et al., 2008). Otra investigación mostró que existe una relación entre la expresión a la baja de miR-146a y la progresión a tumores metastásicos en pacientes con cáncer nasofaríngeo (Wong et al., 2011). Este resultado concuerda con los obtenidos en este trabajo, ya que se obtuvo un valor de regulación negativo, lo que indica que este miRNA actúa como un supresor tumoral, y su expresión por debajo de los valores normales puede inducir a la propagación de células cancerígenas. Por otra parte, la participación de miR-146a en la carcinogénesis se demuestra por su expresión alterada en varios tipos de tumor, como el cáncer de tiroides, próstata, pancreático, gástrico, oral y otros tipos de cáncer como el CCC (Zsuzsa et al., 2013). miR-146a actúa suprimiendo la expresión de la quinasa-1

asociada al receptor de interleucina-1, implicada en la vía (NF- κ B), la cual se ha evidenciado que está implicada en los procesos de carcinogénesis en humanos (Hirsch & Varella & Capuzzo, 2009).

Por último, el miRNA hsa-miR-205-5p presentó un valor de $p=0.7546$ y una regulación negativa igual a -3.04 . El valor de p obtenido no fue estadísticamente significativo ($p>0.05$). Se ha descrito que miR-205 es un miRNA tejido-específico altamente expresado en la epidermis, pero no en los folículos pilosos. (Teta et al., 2012). Este miRNA es esencial tanto en la biogénesis epitelial como en el mantenimiento del epitelio, por lo que una regulación a la baja del mismo puede suponer alteraciones como la proliferación de células cancerígenas. (Sempere et al., 2007). En varios estudios, miR205 ha demostrado ser un prometedor biomarcador en CCC, de alta sensibilidad y especificidad (Tran et al., 2007). Estos resultados también se confirman en un estudio realizado por Childs et al., (2009), quienes concluyeron que miR-205 parece actuar como un supresor de tumores en CCC, y la expresión reducida de este miRNA puede dar lugar a una mayor expresión de los oncogenes diana.

En nuestro estudio se analizaron muestras de pacientes con diferentes tipos de CCC, y al ser miR-205 tejido-específico de células epiteliales, su expresión no está relacionada con las muestras de pacientes con cáncer de tipo glandular. Gran parte de los pacientes presentaban cáncer papilar de tiroides, por lo que se debería aumentar el tamaño muestral de pacientes con cáncer de células escamosas, que es el que más compromete al tejido epitelial, para así poder estudiar la expresión de este miR .

En la siguiente figura se muestra la diferencia en la regulación de cada miRNA comparándolos con el grupo control. Como se observa en el gráfico SNORD 96A posee una regulación igual al grupo control. Se puede visualizar los cambios en la regulación de todos los miRNAs analizados. Todos poseen una regulación hacia abajo. MiR-205, a pesar de estar por debajo de la regulación

del grupo control, posee una regulación mayor a la de los demás miRNAs analizados.

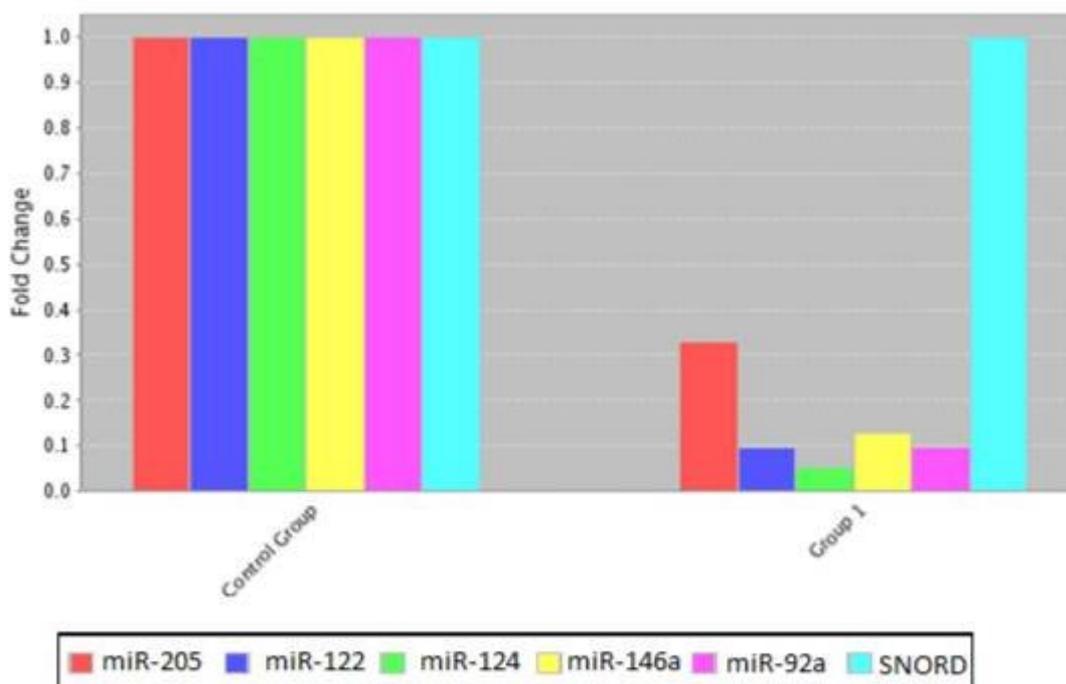


Figura 2. Cambios en la regulación de los miRNAs estudiados comparados con el grupo control. El grupo control tiene asignado un valor de uno.

5.2. MiRNAs analizados presentes en la población ecuatoriana en comparación con otras poblaciones.

En este trabajo se obtuvo un panel de cuatro biomarcadores para el diagnóstico temprano de CCC (hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-122-5p, hsa-miR-146a-5p) en individuos de la población ecuatoriana. Sin embargo, en estudios realizados en diferentes poblaciones, se ha encontrado una expresión diferencial de otros miRNAs.

Según el estudio de Li et al., (2009), en pacientes chinos con CCC, se demostró que un aumento en la expresión de miR-21 provoca una disminución en la expresión de fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), un supresor

tumoral; y su regulador transcripcional Grhl3. Además, observaron que miR-31 , se encuentra desregulado y activa el factor inducible por hipoxia (HIF), lo que promueve la angiogénesis tumoral (Liu et al., 2010) y favorece el desarrollo de cáncer de cuello y cabeza, al igual que en otros tipos de cáncer

Según una investigación realizada por Xie et al. (2013), en la población china, se identificaron varios miARNs. Mediante microarreglos, se seleccionaron seis miRNAs desregulados (miR-144, miR-21, miR-451, miR-634, miR-486-5p, y miR-10b) a partir de siete individuos con cáncer de esófago y tres individuos sanos para posteriormente validarlos por RTq-PCR en 39 pacientes enfermos y 19 controles. Tras la validación se comprobó que existían varios miRNAs reguladores; miR-10b, miR-144 y miR-451 en toda la saliva y miR-10b, miR-144, miR-21 y miR-451 en el sobrenadante de la saliva. Con este estudio se pudo establecer la presencia de miRNAs en todas las fracciones salivares para la detección de cáncer de esófago.

Por otra parte, en un estudio realizado en Canadá por Hui et al., (2010) observaron que en el 91% de las muestras de pacientes con CCC, existía una baja regulación de miR-375, lo cual desencadena la inhibición de la apoptosis y el crecimiento tumoral. También obtuvieron una sobreexpresión de miR-106b-25, el cual podría desempeñar un papel oncogénico en CCC.

Además, en un estudio realizado por Salazar et al., (2014), en ciudadanos australianos, que se centró en desarrollar un método eficaz para aislar miRNAs a partir de pequeños volúmenes de saliva, y crear un panel de biomarcadores para el diagnóstico de cáncer de cuello y cabeza. En el estudio mediante arreglos de productos de PCR, fueron seleccionados cinco miARNs expresados diferencialmente, lo que se confirmó posteriormente mediante RTq-PCR a partir de muestras de 56 individuos sanos y 56 pacientes con cáncer de cuello y cabeza. Posteriormente, se delimitó el panel de diagnóstico a tres miRNAs (miR-9, miR-134, miR-191), por lo que se concluyó que en ciudadanos

australianos estos tres miRNAs, pueden servir como biomarcadores para un método de diagnóstico fiable en cáncer de cuello y cabeza.

Park et al., (2009), en una investigación realizada en Estados Unidos, midieron la presencia de miRNAs en saliva con el fin de determinar su potencial como biomarcadores en cáncer oral. Se analizaron 314 miRNAs mediante RTq-PCR en doce individuos sanos, para posteriormente medir el patrón de degradación de miRNAs salivares endógenos y exógenos. Los miRNAs seleccionados se validaron utilizando saliva de 50 pacientes con carcinoma escamoso y 50 individuos sanos, y se encontró que los miRNAs salivales exógenos se degradan más rápido que los endógenos, y que además, existían dos miRNAs (miR-125a y miR-200a) que se encontraban en niveles significativamente inferiores en la saliva en pacientes con cáncer oral en comparación con los individuos sanos. En este estudio se concluyó que estos miRNAs se podrían utilizar como biomarcadores para la detección de cáncer oral.

Sin embargo, los miRNAs mencionados no son los mismos que los que se encontraron en la población ecuatoriana. Los estudios realizados en nuestra región son casi nulos, a excepción de un estudio realizado en ciudadanos brasileños, donde se analizó un perfil de expresión de dos miRNAs en pacientes con CCC. Estos investigadores observaron que miR-196a y miR-10b, pueden desempeñar un rol oncogénico a través de la desregulación de la proliferación celular (Severino et al., 2013), resultados que concuerdan con los obtenidos el presente trabajo, ya que en ambos se presentó una desregularización de miR-196a.

6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. Conclusiones

En la validación de los miRNAs estudiados, se obtuvo un panel de cuatro biomarcadores: hsa-miR-92a-3p, hsa-miR-124-3p, hsa-miR-122-5p y hsa-miR-146a-5p, los cuales presentaron una expresión diferencial estadísticamente significativa en pacientes con CCC en comparación con individuos sanos. Además, los cuatro biomarcadores presentaron una regulación negativa, lo que indica que actúan como supresores tumorales.

Los miRNAs estudiados no se han reportado como biomarcadores en pacientes con CCC en otras poblaciones, a excepción de miR-92a que presenta una diferencia en su regulación en pacientes con CCC en comparación con individuos sanos de la población brasileña.

6.2. Recomendaciones

La expresión de hsa-miR205-5p no resultó estadísticamente significativa. Se recomienda aumentar el número muestral de pacientes con cáncer de CCC que involucre células epiteliales. Para la validación de hsa-miR205-5p, se recomienda realizar este estudio ampliando el tamaño muestral y separando el análisis por la localización de las células cancerígenas, el estadio, y si está o no vinculado con la presencia de HPV.

Se recomienda realizar este estudio en individuos de poblaciones cercanas a nuestra región.

REFERENCIAS

- Avissar, M. Christensen, B. Kelsey, K. MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 15(5), 2850. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2669849/>
- Carrio, A. Sampedro, C. Sanchez, J. Pimienta, M. Campoy, P. (2015). Automated Low-Cost Smartphone-Based Lateral Flow Saliva Test Reader for Drugs-of-Abuse Detection. *Sensors.* 15(11), 29569-29593. Recuperado el 26 de septiembre de 2016 <http://www.mdpi.com/1424-8220/15/11/29569>.
- Childs, G. Fazzari, M. Kung, G. Kawachi, N. Brandwein, M. McLemore, M. Chen, Q. Burk, R. Smith, R. Prystowsky, M. Belbin, T. Schlecht, N. (2009). Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol.* 174(3), 736-745.
- Courthod, G. Franco, P. Palermo, L. Pisconti, S. & Numico, G. (2014). The role of microRNA in head and neck cancer: current knowledge and perspectives. *Molecules,* 19(5), 5704-5716. Recuperado el 27 de noviembre del 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24802984>.
- D'Souza, G. Kreimer, A. Miscidi, R. Pawlita, M. Fakhry, C. Koch, W. Westra, W. Gillison, M. (2007). Case–Control Study of Human Papillomavirus and Oropharyngeal Cancer. *NEJM.* 356, 1944-1956. Recuperado el 11 de octubre de 2016 de <http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJMoa065497#t=article>.

- Duffy, S. Mumtaz, R. Khan, J. Ronis, D. Fowler, K. Stephen, B. (2011). Health behaviors of head and neck cancer patients. The first year after diagnosis. *Head & Neck*, 30(1), 93-102. Recuperado el 15 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17685451>.
- Escobedo, A. (2001). Efectos colaterales del tratamiento sistémico del cáncer de mama. *Elsevier*. 28(11), 475-477. Recuperado el 28 de septiembre de 2016 de <http://www.elsevier.es/es-revista-medicina-integral-63-articulo-efectos-colaterales-del-tratamiento-sistemico-13024492>.
- Fagan, J. (2015). Open Access Atlas Of Otolaryngology, Head & Neck Operative Surgery. *Head Neck*. 37(2), 9-255. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://vula.uct.ac.za/access/content/group/ba5fb1bd-be95-48e5-81be-586fbaeba29d/Parathyroidectomy.pdf>.
- Farazi, T. Spitzer, J. Morozov, P. Tuschl, T. (2011). MiRNAs in human cancer. *J Pathol*, 223(2), 102-115. Recuperado el 18 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23377965>.
- Gallegos, F. (2006). El cáncer de cabeza y cuello: Factores de riesgo y prevención. *Medigraphic Artemisa*, 74, 287-293. Recuperado el 25 de octubre de 2016 de <http://www.medigraphic.com/pdfs/circir/cc-2006/cc064m.pdf>.
- Healy, N. Heneghan, H. Miller, N. Osborne, C. Schiff, R. Kerin, M. (2012). "Systemic miRNAs as potential biomarkers for malignancy. *Int.J.Cancer*, 131(10), 2215-2222. Recuperado el 22 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22618667>.

- Hirsch, F. Varella, M. Cappuzzo, F. (2009). Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small cell lung cancer. *Oncogene*. 28, 32-37. Recuperado el 30 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19680294>.
- Hu, Z. Chen, X. Zhao, Y. Tian, T. Jin, G. Shu, Y. Shen, H. (2010). Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28(10), 1721-1726. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20194856>.
- Huang, Z. Huang, D. Ni, S. Peng, Z. Sheng, W. (2010). Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 127, 118–126. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19876917>.
- Hui, A. Lenarduzzi, M. Krushel, T. Waldron, L. Pintilie, M. Shi, W. Liu, F. (2010). Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 16(4), 1129-1139. Recuperado el 11 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145181>.
- Jones, T. Hargrove, O. Lancaster, J. Fenton, J. Shenoy, A. Roland N. (2002). Waiting times during the management of head and neck tumours. *J Laryngol Otol*, 116(4), 275-9. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11945188>.
- Kluger, J. Hess, M. Haake, D. (2012). Secretion of salivary immunoglobulin A in relation to age, saliva flow, mood states, secretion of albumin, cortisol, and catecholamines in saliva. *J Clin Immunol*. 12(1), 9-45. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1551941>.

- Kruse, A. Bredell, M. Luebbers, H. Grätz, K. (2011). Head and neck cancer in the elderly: a retrospective study over 10 years (1999 - 2008). *Head Neck Oncol.* 13(3), 2-25. Recuperado el 28 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20923547>.
- Kwak, P. Iwasaki, S. Tomari, Y. (2010). The microRNA pathway and cancer. *Cancer Sci.* 101(11), 2309-2315. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20726859>.
- Li, J. Huang, H. Sun, L. Yang, M. Pan, C. Chen, W. Wu, D. Lin, Z. Zeng, C. Yao, Y. miR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin. Cancer Res.* 15(12), 3998–4008. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19509158>.
- Liu, C. Tsai, M. Hung, P. Kao, S. Liu, T. Wu, K. Chang, K. (2010). miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer Res.* 70(4), 1635-1644. Recuperado el 1 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20145132>.
- Lu, J. Getz, G. Miska, E. Alvarez-Saavedra, E. Lamb, J. Peck, D. Golub, T. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature.* 435(7043), 834-838. Recuperado el 3 de noviembre de 2016 de <http://www.nature.com/nature/journal/v435/n7043/full/nature03702.html>.
- Lugo, A. Trujillo, K. (2009). MicroRNAs: reguladores clave de la expresión génica. *Medicina universitaria.* 11(44), 187-192. Recuperado el 28 de septiembre de 2016 de <http://eprints.uanl.mx/8554/>.

- Ma, L. Liu, J. Shen, J. Liu, L. Wu, J. (2010). Expression of miR-122 mediated by adenoviral vector induces apoptosis and cell cycle arrest of cancer cells. *Cancer Bio.* 9, 554–561. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20150764>.
- Malamud, D. (2011). Saliva as a diagnostic fluid. *Dent Clin North Am.* 55(1), 78-159. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21094724>.
- Mehanna, H. Paleri, V. (2011). Epidemiología, presentación y prevención de cáncer de cabeza y cuello. Revisión de las presentaciones frecuentes, estudios comunes y nuevas técnicas de diagnóstico. Detección y prevención. *BMJ.* 341(1), 4684. Recuperado el 28 de septiembre de 2016 de <http://www.intramed.net/>
- Meng, F. Henson, R. Wehbe-Janek, H. Ghoshal, K. Jacob, S. Patel, T. (2007). MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology.* 133(2), 647-658. Recuperado el 6 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17681183>.
- Mestdagh, P. Bostrom, A. Impens, F. Fredlund, E. Van Peer, G. De Antonellis, P. Stedingk, K. Ghesquiere, B. Schulte, S. Dews, M. (2010). The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell.* 40(5),762–773. Recuperado el 6 8 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21145484>.
- Mogilyansky, E. Rigoutsos, I. (2013). The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death and*

Differentiation. 20, 1603-1614. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de <http://www.nature.com/cdd/journal/v20/n12/full/cdd2013125a.html>.

Molin, L. Xingfang, G. Yuqiang, S. Jun, M. Xiaohong, S. Fang, L. Chuangang, L. (2013). miR-92a family and their target genes in tumorigenesis and metastasis. *ScienceDirect*. 323(1), 1-6. Recuperado el 3 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24394541>.

Nazar, G. Vial, G. Ibarra, A. Cabezas, L. (2007). Tumores de Cabeza y Cuello. *Revista Médica Clin. Condes*. 18(4), 408-418. Recuperado el 18 de septiembre de 2016 de <http://www.clinicalascondes.com/area-academica/pdf/18-Tumores-de-cabeza-y-cuello.pdf>.

Palka, K. Slebos, R. Chung, C. (2009). Update in Molecular Diagnostic Tests in Head and Neck Cancer. *Semin Oncol*. 35(3), 198-210. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18544435>.

Park, N. Zhou, H. Elashoff, D. Henson, B. Kastratovic, D. Abemayor, E. Wong, D. (2009). Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*. 15(17), 5473-5477. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19706812>.

Patel, S. Carpenter, W. Tyree, S. Couch, M. Weissler, M. Hackman, T. (2011). Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol*. 29(11), 1488-1494. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383286>.

Pfaffe, T. Cooper-White, J. Beyerlein, P. Kostner, K. Punyadeera, C. (2011). Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future *Applications. Clinical Chemistry*. 57(5). 65-87. Recuperado el 6 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21383043>.

Poy, M. Hausser, J. Trajkovski, M. (2009). miR-375 maintains normal pancreatic alpha- and beta-cell mass. *Proc Natl Acad Sci USA*. 106(8), 5813-5816. Recuperado el 19 de enero de 2017 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19289822>.

Punyadeera, C. (2016). New frontiers in heart failure detection: saliva testing. Recuperado el 22 de septiembre de 2016 de <http://innovations.bmj.com/content/early/2016/05/24/bmjinnov-2015-000105.full>.

Rusca, N. Monticelli, S. (2011). miR-146a in immunity and disease. *Mol Biol I*. Recuperado el 3 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22091404>.

Salazar, C. Nagadia, R. Pandit, P. Cooper-White, J. Banerjee, N. Dimitrova, Punyadeera, C. (2014). A novel saliva based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell Oncol (Dordr)*. 37(5), 331-338. Recuperado el 8 de marzo de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25156495>.

Sempere, L. Christensen, M. Silahtaroglu, A. Bak, M. Heath, C. Schwartz, Wells, W. Kauppinen, S. Cole, C. (2007). Altered MicroRNA expression confined to specific epithelial cell subpopulations in breast cancer. *Cancer Res*. 67(1), 11612-11620. Recuperado el 28 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18089790>.

- Severino, P. Brüggemann, H. Maziero, F. Camps, C. Garrido, M. Oliveira, W. Macahado, R. Moyses, R. Wünsch-Filho, V. Mathor, M. Daumas, F. Ragoussis, J. Tajara, E. (2013). MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation. *BMC Cancer*. 13(1), 533-539. Recuperado el 13 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24209638>.
- Shigoka, M. Tsuchida, A. Matsudo, T. Nagakawa, Y. Saito, H. (2010). Deregulation of miR-92a expression is implicated in hepatocellular carcinoma development. *Pathol Int*. 60(1), 351–357. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20518884>.
- Tanaka, M. Oikawa, K. Takanashi, M. Kudo, M. Ohyashiki, J. (2009). Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 4. 4(5), 1-8. Recuperado el 25 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19440243>.
- Tang, X. Muniappan, L. Tang, G. (2009). Identification of glucoseregulated miRNAs from pancreatic {beta} cells reveals a role for miR-30d in insulin transcription. *Rna*. 15(1),287-293. Recuperado el 22 de noviembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19096044>.
- Teta, M. Choi, Y. Okegbe, T. Wong, G. Tam, O. Chong, M. Seykora, J. Nagy, A. Littman, D. Andl, T. Millar, S. (2012). Inducible deletion of epidermal Dicer and Drosha reveals multiple functions for miRNAs in postnatal skin. *Development*. 139(1), 1405–1416. Recuperado el 17 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22434867>.

- Tran, N. McLean, T. Zhang, X. Zhao, C. Thomson, J. O'Brien, C. Rose, B. (2007). MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. *Biochem Biophys.* 358(1), 12–17. Recuperado el 27 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475218>.
- Vining, R. McGinley, R. Symons, R. (2013). Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem.* 29(6), 1752-1756. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6225566>.
- Wang, J. Chen, J. Sen, S. (2015). MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *Journal of Cellular Physiology.* 231(1), 25-30. Recuperado el 12 de septiembre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26031493>.
- Woods, K. Thomson, J. Hammond, S. (2007). Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J Biol Chem.* 282(4), 2130–2134. Recuperado el 16 de octubre de 2016 de <http://www.jbc.org/content/282/4/2130>.
- Xie, Z. Chen, G. Zhang, X. Li, D. Huang, J. Yang, C. Li, Z. (2013). Salivary microRNAs as promising biomarkers for detection of esophageal cancer. *PLoS One.* 8(4), 1-6. Recuperado el 22 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3613402/>.
- Yoshizawa, J. Wong, D. (2013). Salivary microRNAs and oral cancer detection. *Methods Mol Biol.* 936(1), 313-324. Recuperado el 15 de octubre de 2016 de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23007518>.
- Zsuzsa, O. István, S. András, C. Imre, G. István, E. István, K. (2013). Association of pre-miR-146a rs2910164 Polymorphism with the Risk of Head and Neck Cancer. *Anticancer Research.* 341-346.

Recuperado el 18 de octubre de 2016 de
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23267167>.

ANEXOS

Anexo 1. Valores de Ct de pacientes y controles obtenidos por RTq-PCR y cálculos realizados para la normalización de datos y $\Delta\Delta Ct$ del primer hsa-miR-92a-3p

	Ct Paciente	SNORD	P-S	CT Control	SNORD	C-S	NORM	$\Delta\Delta Ct$
C3	27,72	22,1	5,62	29,01	26,5	2,51	3,11	0,11582351
C3	27,28	21,74	5,54	29,51	26,63	2,88	2,66	0,15821957
C6	33,45	33,35	0,1	31,14	28,13	3,01	-2,91	7,51618199
C6	33,15	36,98	-3,83	31,23	28,04	3,19	-7,02	129,786813
C7	32,13	27,91	4,22	26,61	25,3	1,31	2,91	0,13304627
C7	36,72	28,22	8,5	26,93	25,56	1,37	7,13	0,00713931
C10	32,27	35	-2,73	26,15	25,06	1,09	-3,82	14,1232479
C10	33,1	35,27	-2,17	26,06	24,97	1,09	-3,26	9,57982964
C13	31,19	26,68	4,51	24,74	22,7	2,04	2,47	0,18049115
C13	30,59	27,24	3,35	25,41	23,32	2,09	1,26	0,41754396
C14	25,4	26,89	-1,49	23,21	22,11	1,1	-2,59	6,02098699
C14	24,99	25,91	-0,92	23,79	22,74	1,05	-1,97	3,91768119
C15	22,83	22,39	0,44	28,12	23,94	4,18	-3,74	13,3614067
C15	22,73	23,02	-0,29	27,88	23,99	3,89	-4,18	18,1261422
C16	29,24	33,21	-3,97	27,12	26,85	0,27	-4,24	18,8958826
C16	27,28	32,24	-4,96	27,25	26,78	0,47	-5,43	43,1114745
C17	22,14	22,25	-0,11	21,28	21,76	-0,48	0,37	0,7737825
C17	22,6	22,88	-0,28	20,92	21,41	-0,49	0,21	0,86453723
C20	28,26	24,1	4,16	27,63	26,69	0,94	3,22	0,10732068
C20	27,28	24,02	3,26	27,94	26,65	1,29	1,97	0,25525303
C21	29,74	19,62	10,12	20,53	22,18	-1,65	11,77	0,00028634
C21	25	19,54	5,46	21,21	22	-0,79	6,25	0,01313901
C22	26,6	22,64	3,96	22,44	26,12	-3,68	7,64	0,00501338
C22	26,65	23,9	2,75	22,37	26,15	-3,78	6,53	0,01082117
C24	27,87	23,17	4,7	21,71	22,19	-0,48	5,18	0,02758447
C24	27,99	22,43	5,56	22,24	22,89	-0,65	6,21	0,01350839
C25	28,4	24,35	4,05	25,28	27,15	-1,87	5,92	0,01651591
C25	28,76	23,47	5,29	25,42	26,9	-1,48	6,77	0,00916277
C27	31,6	27,43	4,17	20,14	22,06	-1,92	6,09	0,01468004
C27	32,23	27,35	4,88	20,17	21,97	-1,8	6,68	0,00975258
C28	27,61	24,76	2,85	25,9	23,72	2,18	0,67	0,62850669
C28	26,94	24,56	2,38	25,47	23,38	2,09	0,29	0,81790206
C29	24,86	28,65	-3,79	25,34	17,69	7,65	-11,44	2778,32566
C29	24,21	28,46	-4,25	25,8	17,81	7,99	-12,24	4837,34594
C30	17,51	30,1	-12,59	24,18	18,64	5,54	-18,13	286862,528
C30	17,27	30,2	-12,93	23,67	18,32	5,35	-18,28	318293,904

C32	23,12	29,36	-6,24	24,25	17,81	6,44	-12,68	6562,36444
C32	23,41	28,95	-5,54	24,78	17,56	7,22	-12,76	6936,5376
C34	24,03	23,98	0,05	24,91	18,5	6,41	-6,36	82,1392574
C34	23,73	23,35	0,38	24,83	18,72	6,11	-5,73	53,0764509
C36	25,1	28,83	-3,73	24,65	18,16	6,49	-10,22	1192,68719
C36	24,98	29,71	-4,73	24,89	19,11	5,78	-10,51	1458,2274
C37	24,43	25,65	-1,22	25,22	20,88	4,34	-5,56	47,176615
C37	24,56	26,72	-2,16	26,36	20,51	5,85	-8,01	257,780621
C38	20,4	27,87	-7,47	27,02	17,1	9,92	-17,39	171755,884
C38	19,97	27,6	-7,63	26,99	16,97	10,02	-17,65	205674,014
C41	22,95	26,89	-3,94	24,56	16,35	8,21	-12,15	4544,79656
C41	23,03	29,45	-6,42	24,83	16,77	8,06	-14,48	22851,4802
C43	33,75	32,6	1,15	23,89	19,15	4,74	-3,59	12,041974
C43	32,94	33,08	-0,14	24,26	19,07	5,19	-5,33	40,224428
C45	32,03	27,09	4,94	25,41	19,81	5,6	-0,66	1,58008262
C45	32,19	27,31	4,88	24,66	18,98	5,68	-0,8	1,74110113
C46	22,61	14,93	7,68	24,41	19,19	5,22	2,46	0,18174656
C46	22,95	15,77	7,18	24,44	18,99	5,45	1,73	0,30145196
C47	24,11	23,63	0,48	28,06	24,39	3,67	-3,19	9,12610973
C47	23,77	23,5	0,27	27,96	24,83	3,13	-2,86	7,26015324
C48	24,81	20,36	4,45	27,38	23,85	3,53	0,92	0,52850902
C48	25,9	20,96	4,94	28,05	23,93	4,12	0,82	0,56644194
C49	34,39	31,97	2,42	27,98	25,38	2,6	-0,18	1,13288389
C49	32,85	31,5	1,35	28,8	24,94	3,86	-2,51	5,69620078
C50	23,8	21,72	2,08	24,88	17,28	7,6	-5,52	45,8865679
C50	23,92	21,48	2,44	23,96	16,97	6,99	-4,55	23,4253711
C51	23,83	23,11	0,72	23,59	18,29	5,3	-4,58	23,917588
C51	23,49	23,53	-0,04	23,23	17,81	5,42	-5,46	44,0173382
C52	32,4	31	1,4	25,49	20,26	5,23	-3,83	14,2214829
C52	32,76	31,56	1,2	25,54	20,46	5,08	-3,88	14,7230024
C54	24,69	23,07	1,62	25,3	22,72	2,58	-0,96	1,94530989
C54	24,07	22,02	2,05	24,95	22,59	2,36	-0,31	1,2397077
C55	21,17	19,59	1,58	26,46	21,64	4,82	-3,24	9,44794129
C55	20,1	19,03	1,07	25,95	21,76	4,19	-3,12	8,6938789
C56	22,6	20,43	2,17	30,47	24,97	5,5	-3,33	10,056107
C56	22,97	20,64	2,33	30,11	24,84	5,27	-2,94	7,67411295
C57	22,91	23,9	-0,99	24,39	19,78	4,61	-5,6	48,5029301
C57	23,52	23,71	-0,19	23,68	19,53	4,15	-4,34	20,2521055
C59	26,76	24,23	2,53	25,78	22,35	3,43	-0,9	1,86606598
C59	26,6	24	2,6	26,32	22,56	3,76	-1,16	2,23457428
C60	39,13	19,55	19,58	27,23	21,64	5,59	13,99	6,146E-05
C60	22,56	19,76	2,8	27,66	21,97	5,69	-2,89	7,4127045
C61	26,56	21,69	4,87	28,49	24,78	3,71	1,16	0,44751254
C61	25,69	20,74	4,95	28,37	24,58	3,79	1,16	0,44751254
C64	29,71	19,48	10,23	24,52	17,47	7,05	3,18	0,11033787

C64	29,4	19,95	9,45	23,17	16,77	6,4	3,05	0,12074204
C66	24,59	20,57	4,02	24,11	18,15	5,96	-1,94	3,83705648
C66	23,92	20,3	3,62	23,88	18,52	5,36	-1,74	3,34035168
C70	20,91	15,66	5,25	23,81	17,35	6,46	-1,21	2,31337637
C70	21,48	14,31	7,17	23,37	18,55	4,82	2,35	0,19614602
C72	34,41	30,33	4,08	22,9	17,78	5,12	-1,04	2,05622765
C72	33,94	30,32	3,62	22,95	17,85	5,1	-1,48	2,78948733
C73	23,95	24,69	-0,74	25,68	18,88	6,8	-7,54	186,108482
C73	22,66	23,35	-0,69	25,02	18,85	6,17	-6,86	116,162452
C78	23,26	17,38	5,88	27,85	21,7	6,15	-0,27	1,20580783
C78	23,34	17,12	6,22	25,42	21,66	3,76	2,46	0,18174656
C81	23,17	16,7	6,47	23,27	16,89	6,38	0,09	0,93952275
C81	22,58	16,3	6,28	23,55	16,67	6,88	-0,6	1,51571657
C83	22,51	15,95	6,56	23,62	18,6	5,02	1,54	0,34388545
C83	22,43	16,02	6,41	23,91	18,48	5,43	0,98	0,50697974
C85	23,19	16,98	6,21	22,79	17,25	5,54	0,67	0,62850669
C85	23,23	17,65	5,58	22,73	18,33	4,4	1,18	0,4413515
C86	23,66	16,53	7,13	21,77	15,9	5,87	1,26	0,41754396
C86	22,76	16,11	6,65	23,2	15,94	7,26	-0,61	1,52625921
C87	21,93	14,65	7,28	29,01	26,5	2,51	4,77	0,03665109
C87	19,98	14,59	5,39	29,51	26,63	2,88	2,51	0,17555561
C88	24,7	17,55	7,15	31,14	28,13	3,01	4,14	0,05671995
C88	24,08	16,76	7,32	31,23	28,04	3,19	4,13	0,05711447
C90	25,03	18,48	6,55	26,61	25,3	1,31	5,24	0,02646079
C90	25,27	19,32	5,95	26,93	25,56	1,37	4,58	0,04181024
C91	26,05	28,96	-2,91	26,15	25,06	1,09	-4	16
C91	26,5	25,75	0,75	26,06	24,97	1,09	-0,34	1,26575659

Anexo 2. Valores de Ct de los pacientes y Snord obtenidos por RTq-PCR y cálculos realizados para la normalización de datos y $\Delta\Delta Ct$ del primer hsa-miR-205-5p

	Ct Paciente	SNORD	P-S	CT CONTROLES	SNORD	C-S	NORM	Ct
C3	22,52	22,1	0,42	22,87	26,5	-3,63	4,05	0,06037102
C3	22,71	21,74	0,97	24,9	26,63	-1,73	2,7	0,15389305
C6	32,72	33,35	-0,63	25,87	28,13	-2,26	1,63	0,32308821
C6	31,85	36,98	-5,13	26,16	28,04	-1,88	-3,25	9,51365692
C7	24,5	27,91	-3,41	21,33	25,3	-3,97	0,56	0,67830216
C7	25,4	28,22	-2,82	21,43	25,56	-4,13	1,31	0,40332088
C10	31,8	35	-3,2	25,85	25,06	0,79	-3,99	15,8894799

C10	31,85	35,27	-3,42	26,45	24,97	1,48	-4,9	29,8570557
C13	28,41	26,68	1,73	19,94	22,7	-2,76	4,49	0,04450157
C13	28,72	27,24	1,48	20,61	23,32	-2,71	4,19	0,05478786
C14	21,52	26,89	-5,37	20,26	22,11	-1,85	-3,52	11,471642
C14	21,39	25,91	-4,52	20,17	22,74	-2,57	-1,95	3,86374532
C15	21,46	22,39	-0,93	22,8	23,94	-1,14	0,21	0,86453723
C15	21,87	23,02	-1,15	23,66	23,99	-0,33	-0,82	1,76540599
C16	27,62	33,21	-5,59	24,33	26,85	-2,52	-3,07	8,39773347
C16	27,14	32,24	-5,1	23,89	26,78	-2,89	-2,21	4,62675274
C17	18,8	22,25	-3,45	17,1	21,76	-4,66	1,21	0,43226862
C17	19,14	22,88	-3,74	17,59	21,41	-3,82	0,08	0,94605765
C20	25,38	24,1	1,28	26,56	26,69	-0,13	1,41	0,37631169
C20	24,66	24,02	0,64	26,89	26,65	0,24	0,4	0,75785828
C21	23,37	19,62	3,75	17,56	22,18	-4,62	8,37	0,00302259
C21	23,99	19,54	4,45	18,33	22	-3,67	8,12	0,00359448
C22	25,07	22,64	2,43	21,54	26,12	-4,58	7,01	0,00775854
C22	25,49	23,9	1,59	21,85	26,15	-4,3	5,89	0,01686294
C24	25,56	23,17	2,39	20,42	22,19	-1,77	4,16	0,05593907
C24	25,74	22,43	3,31	21,39	22,89	-1,5	4,81	0,03564887
C25	26,32	24,35	1,97	23,38	27,15	-3,77	5,74	0,0187106
C25	25,83	23,47	2,36	23,37	26,9	-3,53	5,89	0,01686294
C27	37,96	27,43	10,53	18,88	22,06	-3,18	13,71	7,4624E-05
C27	35,86	27,35	8,51	18,64	21,97	-3,33	11,84	0,00027278
C28	32,31	24,76	7,55	23,04	23,72	-0,68	8,23	0,00333061
C28	31,69	24,56	7,13	23,16	23,38	-0,22	7,35	0,00612956
C29	29,34	28,65	0,69	23,3	17,69	5,61	-4,92	30,2738447
C29	29,39	28,46	0,93	22,85	17,81	5,04	-4,11	17,2676518
C30	23,72	30,1	-6,38	21,95	18,64	3,31	-9,69	826,001161
C30	23,24	30,2	-6,96	22,31	18,32	3,99	-10,95	1978,2376
C32	27,66	29,36	-1,7	21,81	17,81	4	-5,7	51,9841534
C32	27,89	28,95	-1,06	21,9	17,56	4,34	-5,4	42,2242531
C34	22,46	23,98	-1,52	22,4	18,5	3,9	-5,42	42,8136818
C34	22,54	23,35	-0,81	22,1	18,72	3,38	-4,19	18,2522195
C36	27,44	28,83	-1,39	23,77	18,16	5,61	-7	128
C36	28,02	29,71	-1,69	23,77	19,11	4,66	-6,35	81,5718801
C37	24,71	25,65	-0,94	25,01	20,88	4,13	-5,07	33,5909339
C37	24,31	26,72	-2,41	24,37	20,51	3,86	-6,27	77,171701
C38	23,3	27,87	-4,57	25,35	17,1	8,25	-12,82	7231,10295
C38	22,77	27,6	-4,83	24,86	16,97	7,89	-12,72	6746,85761
C41	25,06	26,89	-1,83	22,53	16,35	6,18	-8,01	257,780621
C41	25,08	29,45	-4,37	21,57	16,77	4,8	-9,17	576,029944
C43	31,28	32,6	-1,32	21,57	19,15	2,42	-3,74	13,3614067
C43	31,5	33,08	-1,58	21,6	19,07	2,53	-4,11	17,2676518

C45	34,62	27,09	7,53	21,19	19,81	1,38	6,15	0,01408204
C45	35,59	27,31	8,28	21,66	18,98	2,68	5,6	0,02061731
C46	20,71	14,93	5,78	21,81	19,19	2,62	3,16	0,11187813
C46	20,24	15,77	4,47	21,62	18,99	2,63	1,84	0,27932178
C47	27,19	23,63	3,56	26,94	24,39	2,55	1,01	0,49654625
C47	26,6	23,5	3,1	26,13	24,83	1,3	1,8	0,28717459
C48	27,67	20,36	7,31	27,81	23,85	3,96	3,35	0,09807301
C48	27,74	20,96	6,78	26,82	23,93	2,89	3,89	0,06745176
C49	35,61	31,97	3,64	28,41	25,38	3,03	0,61	0,6551967
C49	34,47	31,5	2,97	28,08	24,94	3,14	-0,17	1,12505848
C50	22,9	21,72	1,18	22,75	17,28	5,47	-4,29	19,5622444
C50	22,43	21,48	0,95	21,63	16,97	4,66	-3,71	13,0864329
C51	24,92	23,11	1,81	23,02	18,29	4,73	-2,92	7,56846117
C51	24,7	23,53	1,17	22,57	17,81	4,76	-3,59	12,041974
C52	34,33	31	3,33	25,3	20,26	5,04	-1,71	3,27160823
C52	34,55	31,56	2,99	25,02	20,46	4,56	-1,57	2,96904714
C54	25,36	23,07	2,29	23,45	22,72	0,73	1,56	0,33915108
C54	25,12	22,02	3,1	22,99	22,59	0,4	2,7	0,15389305
C55	23,2	19,59	3,61	25,34	21,64	3,7	-0,09	1,06437018
C55	23,6	19,03	4,57	25,55	21,76	3,79	0,78	0,58236679
C56	24,59	20,43	4,16	28,59	24,97	3,62	0,54	0,68777091
C56	24,47	20,64	3,83	27,78	24,84	2,94	0,89	0,53961412
C57	26,31	23,9	2,41	23,59	19,78	3,81	-1,4	2,63901582
C57	26,92	23,71	3,21	23	19,53	3,47	-0,26	1,1974787
C59	27,04	24,23	2,81	24,75	22,35	2,4	0,41	0,75262337
C59	27,19	24	3,19	24,81	22,56	2,25	0,94	0,52123288
C60	23,91	19,55	4,36	28,69	21,64	7,05	-2,69	6,45313407
C60	23,64	19,76	3,88	26,94	21,97	4,97	-1,09	2,12874036
C61	24,76	21,69	3,07	24,24	24,78	-0,54	3,61	0,08189959
C61	23,48	20,74	2,74	25,04	24,58	0,46	2,28	0,20589775
C64	27,82	19,48	8,34	21,84	17,47	4,37	3,97	0,06381326
C64	27,94	19,95	7,99	21,01	16,77	4,24	3,75	0,07432544
C66	26,47	20,57	5,9	23,99	18,15	5,84	0,06	0,95926412
C66	26,09	20,3	5,79	23,23	18,52	4,71	1,08	0,47302882
C70	20,07	15,66	4,41	22,47	17,35	5,12	-0,71	1,63580412
C70	19,93	14,31	5,62	21,98	18,55	3,43	2,19	0,21915143
C72	32,6	30,33	2,27	23,25	17,78	5,47	-3,2	9,18958684
C72	31,83	30,32	1,51	23,16	17,85	5,31	-3,8	13,928809
C73	25,91	24,69	1,22	25,13	18,88	6,25	-5,03	32,672388
C73	24,76	23,35	1,41	25,67	18,85	6,82	-5,41	42,5179461
C78	21,56	17,38	4,18	25,94	21,7	4,24	-0,06	1,04246576
C78	21,72	17,12	4,6	25,38	21,66	3,72	0,88	0,54336743
C81	21,47	16,7	4,77	22,18	16,89	5,29	-0,52	1,43395525

C81	21,71	16,3	5,41	21,43	16,67	4,76	0,65	0,63728031
C83	20,7	15,95	4,75	24,71	18,6	6,11	-1,36	2,5668518
C83	20,42	16,02	4,4	24,4	18,48	5,92	-1,52	2,8679105
C85	22,38	16,98	5,4	22,47	17,25	5,22	0,18	0,882703
C85	22,45	17,65	4,8	21,64	18,33	3,31	1,49	0,35601255
C86	20,91	16,53	4,38	21,38	15,9	5,48	-1,1	2,14354693
C86	19,92	16,11	3,81	20,96	15,94	5,02	-1,21	2,31337637
C87	17,82	14,65	3,17	22,87	26,5	-3,63	6,8	0,00897421
C87	19	14,59	4,41	24,9	26,63	-1,73	6,14	0,01417999
C88	21,83	17,55	4,28	25,87	28,13	-2,26	6,54	0,01074642
C88	22,28	16,76	5,52	26,16	28,04	-1,88	7,4	0,00592077
C90	21,4	18,48	2,92	21,33	25,3	-3,97	6,89	0,00843147
C90	22,18	19,32	2,86	21,43	25,56	-4,13	6,99	0,00786684
C91	30,58	28,96	1,62	25,85	25,06	0,79	0,83	0,56252924
C91	30,35	25,75	4,6	26,45	24,97	1,48	3,12	0,11502346

Anexo 3. Valores de Ct de los pacientes y Snord obtenidos por RTq-PCR y cálculos realizados para la normalización de datos y $\Delta\Delta Ct$ del primer hsa-miR-124-3p

	Ct Paciente	SNORD	P-S	CT CONTROLES	SNORD	C-S	NORM	Ct
C3	28,28	22,1	6,18	26,4	26,5	-0,1	6,28	0,01286861
C3	27,88	21,74	6,14	26,07	26,63	-0,56	6,7	0,00961832
C6	32,28	33,35	-1,07	27,91	28,13	-0,22	-0,85	1,80250093
C6	33,82	36,98	-3,16	27,98	28,04	-0,06	-3,1	8,5741877
C7	28,32	27,91	0,41	28,39	25,3	3,09	-2,68	6,40855902
C7	29,47	28,22	1,25	28,52	25,56	2,96	-1,71	3,27160823
C10	33,35	35	-1,65	27,93	25,06	2,87	-4,52	22,943284
C10	32,56	35,27	-2,71	28,08	24,97	3,11	-5,82	56,4929918
C13	29,86	26,68	3,18	24,7	22,7	2	1,18	0,4413515
C13	31,48	27,24	4,24	25,57	23,32	2,25	1,99	0,25173889
C14	26,73	26,89	-0,16	24,28	22,11	2,17	-2,33	5,0280535
C14	26,51	25,91	0,6	24,78	22,74	2,04	-1,44	2,71320865
C15	23,93	22,39	1,54	26,75	23,94	2,81	-1,27	2,41161566
C15	23,99	23,02	0,97	26,03	23,99	2,04	-1,07	2,09943337
C16	27,13	33,21	-6,08	26,38	26,85	-0,47	-5,61	48,8402947
C16	27,55	32,24	-4,69	26,19	26,78	-0,59	-4,1	17,1483754
C17	21,77	22,25	-0,48	24,19	21,76	2,43	-2,91	7,51618199
C17	23,35	22,88	0,47	23,5	21,41	2,09	-1,62	3,07375036
C20	23,4	24,1	-0,7	27,87	26,69	1,18	-1,88	3,6807506
C20	22,94	24,02	-1,08	28,6	26,65	1,95	-3,03	8,16809701
C21	23,28	19,62	3,66	23,18	22,18	1	2,66	0,15821957

C21	22,73	19,54	3,19	23,08	22	1,08	2,11	0,23164702
C22	24,9	22,64	2,26	24,23	26,12	-1,89	4,15	0,05632815
C22	24,93	23,9	1,03	24,9	26,15	-1,25	2,28	0,20589775
C24	27,39	23,17	4,22	24,08	22,19	1,89	2,33	0,19888412
C24	27,14	22,43	4,71	24	22,89	1,11	3,6	0,08246924
C25	25,55	24,35	1,2	25,39	27,15	-1,76	2,96	0,12851423
C25	25,74	23,47	2,27	25,24	26,9	-1,66	3,93	0,06560729
C27	32,55	27,43	5,12	22,24	22,06	0,18	4,94	0,03257706
C27	31,89	27,35	4,54	22,71	21,97	0,74	3,8	0,07179365
C28	27,83	24,76	3,07	27,63	23,72	3,91	-0,84	1,79005014
C28	26,3	24,56	1,74	27,56	23,38	4,18	-2,44	5,42641731
C29	23,23	28,65	-5,42	25	17,69	7,31	-12,73	6793,78572
C29	22,91	28,46	-5,55	25,09	17,81	7,28	-12,83	7281,39924
C30	23,29	30,1	-6,81	20,71	18,64	2,07	-8,88	471,136077
C30	22,68	30,2	-7,52	20,81	18,32	2,49	-10,01	1031,12248
C32	28,19	29,36	-1,17	21,87	17,81	4,06	-5,23	37,5307184
C32	28,55	28,95	-0,4	21,58	17,56	4,02	-4,42	21,4068409
C34	24,28	23,98	0,3	20,39	18,5	1,89	-1,59	3,01049349
C34	23,77	23,35	0,42	20,68	18,72	1,96	-1,54	2,90794503
C36	22,73	28,83	-6,1	25,74	18,16	7,58	-13,68	13124,7289
C36	22,65	29,71	-7,06	25,95	19,11	6,84	-13,9	15286,8125
C37	20,21	25,65	-5,44	21,16	20,88	0,28	-5,72	52,7098251
C37	20,27	26,72	-6,45	22,09	20,51	1,58	-8,03	261,379104
C38	19,88	27,87	-7,99	21,08	17,1	3,98	-11,97	4011,70554
C38	20,23	27,6	-7,37	20,76	16,97	3,79	-11,16	2288,20406
C41	21,2	26,89	-5,69	20,18	16,35	3,83	-9,52	734,185087
C41	21,68	29,45	-7,77	19,48	16,77	2,71	-10,48	1428,21751
C43	33,9	32,6	1,3	19,76	19,15	0,61	0,69	0,61985385
C43	33,28	33,08	0,2	19,07	19,07	0	0,2	0,87055056
C45	24,31	27,09	-2,78	21,98	19,81	2,17	-4,95	30,9099625
C45	23,93	27,31	-3,38	21,83	18,98	2,85	-6,23	75,0614368
C46	18,91	14,93	3,98	21,22	19,19	2,03	1,95	0,25881623
C46	19,27	15,77	3,5	21,95	18,99	2,96	0,54	0,68777091
C47	23,23	23,63	-0,4	25,88	24,39	1,49	-1,89	3,70635225
C47	23,29	23,5	-0,21	27,36	24,83	2,53	-2,74	6,68070336
C48	20,52	20,36	0,16	24,8	23,85	0,95	-0,79	1,72907446
C48	20,4	20,96	-0,56	25,31	23,93	1,38	-1,94	3,83705648
C49	33,48	31,97	1,51	25,24	25,38	-0,14	1,65	0,31864016
C49	32,61	31,5	1,11	25,56	24,94	0,62	0,49	0,7120251
C50	21,84	21,72	0,12	24,03	17,28	6,75	-6,63	99,0441596
C50	21,62	21,48	0,14	22,89	16,97	5,92	-5,78	54,9481879
C51	23,16	23,11	0,05	19,96	18,29	1,67	-1,62	3,07375036
C51	23,15	23,53	-0,38	19,24	17,81	1,43	-1,81	3,50642289

C52	31,69	31	0,69	24,36	20,26	4,1	-3,41	10,6294865
C52	31,92	31,56	0,36	23,97	20,46	3,51	-3,15	8,87655578
C54	20,75	23,07	-2,32	25,52	22,72	2,8	-5,12	34,7755156
C54	20,92	22,02	-1,1	25,13	22,59	2,54	-3,64	12,4666333
C55	21,24	19,59	1,65	26,45	21,64	4,81	-3,16	8,9382971
C55	19,56	19,03	0,53	26,64	21,76	4,88	-4,35	20,39297
C56	21,53	20,43	1,1	33,14	24,97	8,17	-7,07	134,363736
C56	21,41	20,64	0,77	31,61	24,84	6,77	-6	64
C57	20,75	23,9	-3,15	23,8	19,78	4,02	-7,17	144,007486
C57	20,48	23,71	-3,23	23,62	19,53	4,09	-7,32	159,78631
C59	27,88	24,23	3,65	31,26	22,35	8,91	-5,26	38,3193185
C59	27,45	24	3,45	30,25	22,56	7,69	-4,24	18,8958826
C60	28,88	19,55	9,33	25,89	21,64	4,25	5,08	0,0295643
C60	28,76	19,76	9	25,45	21,97	3,48	5,52	0,02179287
C61	32,55	21,69	10,86	28,67	24,78	3,89	6,97	0,00797666
C61	31,54	20,74	10,8	28,92	24,58	4,34	6,46	0,01135916
C64	32,9	19,48	13,42	23,68	17,47	6,21	7,21	0,0067542
C64	33,57	19,95	13,62	23,29	16,77	6,52	7,1	0,00728932
C66	33,36	20,57	12,79	20,19	18,15	2,04	10,75	0,00058067
C66	32,9	20,3	12,6	20,5	18,52	1,98	10,62	0,00063542
C70	27,43	15,66	11,77	23,73	17,35	6,38	5,39	0,0238478
C70	27,04	14,31	12,73	23,42	18,55	4,87	7,86	0,00430432
C72	37,15	30,33	6,82	23,47	17,78	5,69	1,13	0,45691573
C72	38,43	30,32	8,11	23,26	17,85	5,41	2,7	0,15389305
C73	23,66	24,69	-1,03	28,38	18,88	9,5	-10,53	1478,5835
C73	22,38	23,35	-0,97	28,08	18,85	9,23	-10,2	1176,26712
C78	22,87	17,38	5,49	24,63	21,7	2,93	2,56	0,16957554
C78	22,81	17,12	5,69	23,77	21,66	2,11	3,58	0,08362047
C81	24,96	16,7	8,26	23,08	16,89	6,19	2,07	0,2381595
C81	24,84	16,3	8,54	23,11	16,67	6,44	2,1	0,23325825
C83	21,96	15,95	6,01	22,61	18,6	4,01	2	0,25
C83	22,03	16,02	6,01	22,53	18,48	4,05	1,96	0,25702846
C85	21,56	16,98	4,58	23,6	17,25	6,35	-1,77	3,41053957
C85	21,64	17,65	3,99	22,86	18,33	4,53	-0,54	1,45397252
C86	22,12	16,53	5,59	22,69	15,9	6,79	-1,2	2,29739671
C86	21,59	16,11	5,48	23,81	15,94	7,87	-2,39	5,24157362
C87	20,12	14,65	5,47	26,4	26,5	-0,1	5,57	0,02105052
C87	21,33	14,59	6,74	26,07	26,63	-0,56	7,3	0,00634572
C88	23,78	17,55	6,23	27,91	28,13	-0,22	6,45	0,01143817
C88	23,79	16,76	7,03	27,98	28,04	-0,06	7,09	0,00734002
C90	20,43	18,48	1,95	28,39	25,3	3,09	-1,14	2,20381023
C90	20,05	19,32	0,73	28,52	25,56	2,96	-2,23	4,6913398
C91	19,46	28,96	-9,5	27,93	25,06	2,87	-12,37	5293,47719

C91	20,11	25,75	-5,64	28,08	24,97	3,11	-8,75	430,538965
-----	-------	-------	-------	-------	-------	------	-------	------------

Anexo 4. Valores de Ct de los pacientes y Snord obtenidos por RTq-PCR y cálculos realizados para la normalización de datos y $\Delta\Delta Ct$ del primer hsa-miR-122-5p

	Ct Paciente	SNORD	P-S	CT CONTROLES	SNORD	C-S	NORM	$\Delta\Delta Ct$
C3	31,77	22,1	9,67	31,64	26,5	5,14	4,53	0,04328467
C3	31,32	21,74	9,58	32,4	26,63	5,77	3,81	0,07129773
C6	33,01	33,35	-0,34	27,67	28,13	-0,46	0,12	0,92018765
C6	30,77	36,98	-6,21	27,66	28,04	-0,38	-5,83	56,8859316
C7	32,22	27,91	4,31	29,39	25,3	4,09	0,22	0,85856544
C7	31,32	28,22	3,1	29,89	25,56	4,33	-1,23	2,3456699
C10	32,26	35	-2,74	32,11	25,06	7,05	-9,79	885,286125
C10	33,95	35,27	-1,32	31,98	24,97	7,01	-8,33	321,795424
C13	32,79	26,68	6,11	27,05	22,7	4,35	1,76	0,29524817
C13	31,61	27,24	4,37	27,52	23,32	4,2	0,17	0,88884268
C14	28,35	26,89	1,46	29,23	22,11	7,12	-5,66	50,562644
C14	27,48	25,91	1,57	30,52	22,74	7,78	-6,21	74,0280438
C15	26,42	22,39	4,03	30,11	23,94	6,17	-2,14	4,40762046
C15	26,38	23,02	3,36	30,49	23,99	6,5	-3,14	8,81524093
C16	31,97	33,21	-1,24	31,89	26,85	5,04	-6,28	77,7084726
C16	31,78	32,24	-0,46	31,63	26,78	4,85	-5,31	39,6706464
C17	25,87	22,25	3,62	27,7	21,76	5,94	-2,32	4,9933222
C17	26,8	22,88	3,92	27,72	21,41	6,31	-2,39	5,24157362
C20	28,66	24,1	4,56	30,2	26,69	3,51	1,05	0,48296816
C20	27,34	24,02	3,32	29,49	26,65	2,84	0,48	0,71697762
C21	28,61	19,62	8,99	28,7	22,18	6,52	2,47	0,18049115
C21	28,16	19,54	8,62	27,5	22	5,5	3,12	0,11502346
C22	29,48	22,64	6,84	32,49	26,12	6,37	0,47	0,7219646
C22	30,69	23,9	6,79	32,98	26,15	6,83	-0,04	1,02811383
C24	31,7	23,17	8,53	28,95	22,19	6,76	1,77	0,29320874
C24	32,11	22,43	9,68	29,1	22,89	6,21	3,47	0,09024557
C25	30,45	24,35	6,1	30,28	27,15	3,13	2,97	0,12762652
C25	32,56	23,47	9,09	29,68	26,9	2,78	6,31	0,01260378
C27	30,6	27,43	3,17	27,34	22,06	5,28	-2,11	4,31691295
C27	30,2	27,35	2,85	27,11	21,97	5,14	-2,29	4,89056111
C28	33,95	24,76	9,19	32,49	23,72	8,77	0,42	0,74742462
C28	34,92	24,56	10,36	32,25	23,38	8,87	1,49	0,35601255
C29	31,05	28,65	2,4	29,17	17,69	11,48	-9,08	541,193237
C29	31,36	28,46	2,9	29,76	17,81	11,95	-9,05	530,055641
C30	26,92	30,1	-3,18	23,56	18,64	4,92	-8,1	274,374006

C30	28,88	30,2	-1,32	23,43	18,32	5,11	-6,43	86,2229489
C32	35,72	29,36	6,36	24,97	17,81	7,16	-0,8	1,74110113
C32	31,7	28,95	2,75	24,33	17,56	6,77	-4,02	16,2233517
C34	29,17	23,98	5,19	25,44	18,5	6,94	-1,75	3,36358566
C34	29,79	23,35	6,44	26,25	18,72	7,53	-1,09	2,12874036
C36	29,66	28,83	0,83	27,86	18,16	9,7	-8,87	467,881703
C36	29,66	29,71	-0,05	27,37	19,11	8,26	-8,31	317,365171
C37	29,21	25,65	3,56	26,7	20,88	5,82	-2,26	4,78991482
C37	30,08	26,72	3,36	26,91	20,51	6,4	-3,04	8,22491061
C38	22,31	27,87	-5,56	30,95	17,1	13,85	-19,41	696614,028
C38	21,47	27,6	-6,13	28,54	16,97	11,57	-17,7	212927,092
C41	26,9	26,89	0,01	26,43	16,35	10,08	-10,07	1074,90988
C41	26,2	29,45	-3,25	27,33	16,77	10,56	-13,81	14362,3081
C43	30,25	32,6	-2,35	24,62	19,15	5,47	-7,82	225,971967
C43	30,78	33,08	-2,3	25,46	19,07	6,39	-8,69	413,000581
C45	34,53	27,09	7,44	26,76	19,81	6,95	0,49	0,7120251
C45	34,5	27,31	7,19	26,42	18,98	7,44	-0,25	1,18920712
C46	28,74	14,93	13,81	25,39	19,19	6,2	7,61	0,00511872
C46	28,9	15,77	13,13	26,09	18,99	7,1	6,03	0,01530344
C47	28,38	23,63	4,75	30,33	24,39	5,94	-1,19	2,28152743
C47	28,35	23,5	4,85	30,21	24,83	5,38	-0,53	1,4439292
C48	28,97	20,36	8,61	26,86	23,85	3,01	5,6	0,02061731
C48	29,57	20,96	8,61	27,89	23,93	3,96	4,65	0,03983002
C49	39,96	31,97	7,99	30,33	25,38	4,95	3,04	0,12158187
C49	34,76	31,5	3,26	29,61	24,94	4,67	-1,41	2,65737163
C50	27,37	21,72	5,65	26,91	17,28	9,63	-3,98	15,7797233
C50	27,98	21,48	6,5	25,91	16,97	8,94	-2,44	5,42641731
C51	28,36	23,11	5,25	23,44	18,29	5,15	0,1	0,93303299
C51	27,82	23,53	4,29	23,44	17,81	5,63	-1,34	2,53151319
C52	34,53	31	3,53	26,52	20,26	6,26	-2,73	6,63455637
C52	34,57	31,56	3,01	26,39	20,46	5,93	-2,92	7,56846117
C54	27,38	23,07	4,31	27,84	22,72	5,12	-0,81	1,75321144
C54	27,75	22,02	5,73	28,63	22,59	6,04	-0,31	1,2397077
C55	23,68	19,59	4,09	30,65	21,64	9,01	-4,92	30,2738447
C55	23,8	19,03	4,77	30,16	21,76	8,4	-3,63	12,3805199
C56	25,46	20,43	5,03	36,33	24,97	11,36	-6,33	80,448856
C56	25,05	20,64	4,41	34,25	24,84	9,41	-5	32
C57	26,57	23,9	2,67	25,97	19,78	6,19	-3,52	11,471642
C57	27,02	23,71	3,31	26	19,53	6,47	-3,16	8,9382971
C59	28,4	24,23	4,17	33,54	22,35	11,19	-7,02	129,786813
C59	28,37	24	4,37	34,16	22,56	11,6	-7,23	150,122874
C60	27,2	19,55	7,65	30,09	21,64	8,45	-0,8	1,74110113
C60	26,85	19,76	7,09	28,77	21,97	6,8	0,29	0,81790206

C61	26,21	21,69	4,52	35,47	24,78	10,69	-6,17	72,003743
C61	25,19	20,74	4,45	33,77	24,58	9,19	-4,74	26,7228134
C64	29,72	19,48	10,24	27,55	17,47	10,08	0,16	0,89502507
C64	28,66	19,95	8,71	26,31	16,77	9,54	-0,83	1,77768536
C66	28,36	20,57	7,79	25,48	18,15	7,33	0,46	0,72698626
C66	28,63	20,3	8,33	25,85	18,52	7,33	1	0,5
C70	24,89	15,66	9,23	27,49	17,35	10,14	-0,91	1,8790455
C70	24,33	14,31	10,02	26,85	18,55	8,3	1,72	0,30354872
C72	32	30,33	1,67	26,44	17,78	8,66	-6,99	127,115839
C72	31,74	30,32	1,42	25,98	17,85	8,13	-6,71	104,691463
C73	24,32	24,69	-0,37	31,67	18,88	12,79	-13,16	9152,81624
C73	24,35	23,35	1	32,72	18,85	13,87	-12,87	7486,10724
C78	26,99	17,38	9,61	30,75	21,7	9,05	0,56	0,67830216
C78	27,08	17,12	9,96	29,69	21,66	8,03	1,93	0,26242917
C81	27,51	16,7	10,81	25,47	16,89	8,58	2,23	0,21315872
C81	27,37	16,3	11,07	26,05	16,67	9,38	1,69	0,30992692
C83	25,38	15,95	9,43	24,47	18,6	5,87	3,56	0,08478777
C83	25,95	16,02	9,93	24,65	18,48	6,17	3,76	0,07381204
C85	22,7	16,98	5,72	25,51	17,25	8,26	-2,54	5,81589007
C85	22,83	17,65	5,18	25,13	18,33	6,8	-1,62	3,07375036
C86	26,3	16,53	9,77	28,09	15,9	12,19	-2,42	5,35171022
C86	24,93	16,11	8,82	27,56	15,94	11,62	-2,8	6,96440451
C87	24,28	14,65	9,63	31,64	26,5	5,14	4,49	0,04450157
C87	24,95	14,59	10,36	32,4	26,63	5,77	4,59	0,04152143
C88	28,89	17,55	11,34	27,67	28,13	-0,46	11,8	0,00028044
C88	28,34	16,76	11,58	27,66	28,04	-0,38	11,96	0,000251
C90	28,67	18,48	10,19	29,39	25,3	4,09	6,1	0,01457864
C90	28,76	19,32	9,44	29,89	25,56	4,33	5,11	0,02895588
C91	31,06	28,96	2,1	32,11	25,06	7,05	-4,95	30,9099625
C91	31,86	25,75	6,11	31,98	24,97	7,01	-0,9	1,86606598

Anexo 5. Valores de Ct de los pacientes y Snord obtenidos por RTq-PCR y cálculos realizados para la normalización de datos y $\Delta\Delta Ct$ del primer hsa-miR-146a-5p

	Ct Paciente	SNORD	P-S	CT CONTROLES	SNORD	C-S	NORM	Ct
C3	28,91	22,1	6,81	27,46	26,5	0,96	5,85	0,01733702
C3	28,65	21,74	6,91	27,69	26,63	1,06	5,85	0,01733702
C6	35,67	33,35	2,32	28,87	28,13	0,74	1,58	0,33448189
C6	32,35	36,98	-4,63	28,98	28,04	0,94	-5,57	47,5047543
C7	33,32	27,91	5,41	25,14	25,3	-0,2	5,57	0,02105052
C7	32,49	28,22	4,27	25,14	25,56	-0,4	4,69	0,03874087

C10	33,25	35	-1,75	28,57	25,06	3,51	-5,26	38,3193185
C10	32,4	35,27	-2,87	28,79	24,97	3,82	-6,69	103,250145
C13	33,49	26,68	6,81	27,5	22,7	4,8	2,01	0,24827312
C13	35,54	27,24	8,3	27,38	23,32	4,06	4,24	0,05292158
C14	26,73	26,89	-0,16	29,2	22,11	7,09	-7,25	152,218511
C14	26,51	25,91	0,6	29,28	22,74	6,54	-5,94	61,3929036
C15	23,93	22,39	1,54	31,12	23,94	7,18	-5,64	49,8665331
C15	23,99	23,02	0,97	30,64	23,99	6,65	-5,68	51,2684722
C16	31,89	33,21	-1,32	29,51	26,85	2,66	-3,98	15,7797233
C16	32,58	32,24	0,34	31,17	26,78	4,39	-4,05	16,5642388
C17	25,81	22,25	3,56	24,25	21,76	2,49	1,07	0,476319
C17	25,74	22,88	2,86	23,97	21,41	2,56	0,3	0,8122524
C20	32,18	24,1	8,08	31	26,69	4,31	3,77	0,07330218
C20	32,24	24,02	8,22	30,44	26,65	3,79	4,43	0,04639136
C21	31,5	19,62	11,88	24,3	22,18	2,12	9,76	0,00115331
C21	31,85	19,54	12,31	24,24	22	2,24	10,07	0,00093031
C22	32,82	22,64	10,18	29,75	26,12	3,63	6,55	0,01067219
C22	32,2	23,9	8,3	29,45	26,15	3,3	5	0,03125
C24	30,96	23,17	7,79	28,5	22,19	6,31	1,48	0,35848881
C24	32,15	22,43	9,72	28,34	22,89	5,45	4,27	0,05183247
C25	37,99	24,35	13,64	29,58	27,15	2,43	11,21	0,00042214
C25	33,99	23,47	10,52	29,4	26,9	2,5	8,02	0,00385247
C27	34,82	27,43	7,39	25,04	22,06	2,98	4,41	0,04703896
C27	35,49	27,35	8,14	24,89	21,97	2,92	5,22	0,02683017
C28	34,71	24,76	9,95	31,26	23,72	7,54	2,41	0,18815584
C28	34,52	24,56	9,96	30,84	23,38	7,46	2,5	0,1767767
C29	31,51	28,65	2,86	30,65	17,69	13	-10,1	1097,49603
C29	31,25	28,46	2,79	30,01	17,81	12,2	-9,41	680,287137
C30	28,3	30,1	-1,8	26,69	18,64	8,05	-9,85	922,880474
C30	28,79	30,2	-1,41	26,23	18,32	7,91	-9,32	639,145241
C32	33,55	29,36	4,19	27,6	17,81	9,79	-5,6	48,5029301
C32	32,81	28,95	3,86	27,46	17,56	9,9	-6,04	65,7992849
C34	29,32	23,98	5,34	29,22	18,5	10,7	-5,38	41,6429394
C34	29,64	23,35	6,29	28,61	18,72	9,89	-3,6	12,1257325
C36	30,67	28,83	1,84	31,61	18,16	13,5	-11,61	3125,77886
C36	31	29,71	1,29	30,84	19,11	11,7	-10,44	1389,16283
C37	31,36	25,65	5,71	28,56	20,88	7,68	-1,97	3,91768119
C37	29,65	26,72	2,93	27,91	20,51	7,4	-4,47	22,1617515
C38	23,41	27,87	-4,46	30,77	17,1	13,7	-18,13	286862,528
C38	23,62	27,6	-3,98	31,95	16,97	15	-18,96	509951,317
C41	27,88	26,89	0,99	29,56	16,35	13,2	-12,22	4770,74877
C41	27,97	29,45	-1,48	30,23	16,77	13,5	-14,94	31433,1667
C43	30,53	32,6	-2,07	26,82	19,15	7,67	-9,74	855,130029

C43	30,6	33,08	-2,48	27,05	19,07	7,98	-10,46	1408,55482
C45	35,32	27,09	8,23	28,64	19,81	8,83	-0,6	1,51571657
C45	36,19	27,31	8,88	28,2	18,98	9,22	-0,34	1,26575659
C46	27,01	14,93	12,08	27,12	19,19	7,93	4,15	0,05632815
C46	27,31	15,77	11,54	27,27	18,99	8,28	3,26	0,10438599
C47	29,68	23,63	6,05	31,14	24,39	6,75	-0,7	1,62450479
C47	29,1	23,5	5,6	31,63	24,83	6,8	-1,2	2,29739671
C48	30,81	20,36	10,45	30,11	23,85	6,26	4,19	0,05478786
C48	31	20,96	10,04	29,96	23,93	6,03	4,01	0,06206828
C49	34,55	31,97	2,58	32,08	25,38	6,7	-4,12	17,3877578
C49	38,54	31,5	7,04	30,93	24,94	5,99	1,05	0,48296816
C50	28,52	21,72	6,8	28,75	17,28	11,5	-4,67	25,4571675
C50	28,79	21,48	7,31	27,75	16,97	10,8	-3,47	11,0808757
C51	29,75	23,11	6,64	24,92	18,29	6,63	0,01	0,9930925
C51	29,76	23,53	6,23	24,46	17,81	6,65	-0,42	1,33792755
C52	35,16	31	4,16	27,94	20,26	7,68	-3,52	11,471642
C52	34,87	31,56	3,31	28,89	20,46	8,43	-5,12	34,7755156
C54	29,27	23,07	6,2	31,15	22,72	8,43	-2,23	4,6913398
C54	29,12	22,02	7,1	33,19	22,59	10,6	-3,5	11,3137085
C55	25,64	19,59	6,05	31,65	21,64	10	-3,96	15,5624792
C55	24,44	19,03	5,41	30,14	21,76	8,38	-2,97	7,83536238
C56	26,86	20,43	6,43	35,86	24,97	10,9	-4,46	22,0086691
C56	27,4	20,64	6,76	36,06	24,84	11,2	-4,46	22,0086691
C57	28,54	23,9	4,64	28,68	19,78	8,9	-4,26	19,1596593
C57	28,17	23,71	4,46	28,15	19,53	8,62	-4,16	17,8765942
C59	30,68	24,23	6,45	32,04	22,35	9,69	-3,24	9,44794129
C59	31,64	24	7,64	32,85	22,56	10,3	-2,65	6,27667278
C60	27,68	19,55	8,13	31,32	21,64	9,68	-1,55	2,92817139
C60	27,69	19,76	7,93	30,26	21,97	8,29	-0,36	1,2834259
C61	23,19	21,69	1,5	31,37	24,78	6,59	-5,09	34,0598458
C61	22,66	20,74	1,92	30,32	24,58	5,74	-3,82	14,1232479
C64	27	19,48	7,52	28,92	17,47	11,5	-3,93	15,2422208
C64	26,94	19,95	6,99	27,49	16,77	10,7	-3,73	13,2691127
C66	26,46	20,57	5,89	27,74	18,15	9,59	-3,7	12,9960383
C66	25,98	20,3	5,68	27,42	18,52	8,9	-3,22	9,31786869
C70	24,41	15,66	8,75	27,8	17,35	10,5	-1,7	3,24900959
C70	24,68	14,31	10,37	27,58	18,55	9,03	1,34	0,39502066
C72	32,26	30,33	1,93	27,8	17,78	10	-8,09	272,478767
C72	32,22	30,32	1,9	27,97	17,85	10,1	-8,22	298,171798
C73	26,78	24,69	2,09	29,94	18,88	11,1	-8,97	501,463192
C73	26,46	23,35	3,11	28,88	18,85	10	-6,92	121,095379
C78	27,64	17,38	10,26	33,61	21,7	11,9	-1,65	3,13833639
C78	27,13	17,12	10,01	31,15	21,66	9,49	0,52	0,69737183

C81	28,37	16,7	11,67	26,06	16,89	9,17	2,5	0,1767767
C81	28,39	16,3	12,09	26,56	16,67	9,89	2,2	0,21763764
C83	27,55	15,95	11,6	27,77	18,6	9,17	2,43	0,18556545
C83	27,13	16,02	11,11	26,72	18,48	8,24	2,87	0,13678671
C85	28,46	16,98	11,48	27,33	17,25	10,1	1,4	0,37892914
C85	28,02	17,65	10,37	27,87	18,33	9,54	0,83	0,56252924
C86	28,75	16,53	12,22	27,71	15,9	11,8	0,41	0,75262337
C86	27,35	16,11	11,24	27,45	15,94	11,5	-0,27	1,20580783
C87	26,22	14,65	11,57	27,46	26,5	0,96	10,61	0,00063984
C87	25,65	14,59	11,06	27,69	26,63	1,06	10	0,00097656
C88	30,52	17,55	12,97	28,87	28,13	0,74	12,23	0,00020816
C88	30,86	16,76	14,1	28,98	28,04	0,94	13,16	0,00010926
C90	30,32	18,48	11,84	25,14	25,3	-0,2	12	0,00024414
C90	30,85	19,32	11,53	25,14	25,56	-0,4	11,95	0,00025275
C91	33,8	28,96	4,84	28,57	25,06	3,51	1,33	0,39776824
C91	33,91	25,75	8,16	28,79	24,97	3,82	4,34	0,04937758

Anexo 6. Datos de los pacientes con CCC del hospital Solca núcleo de Quito que colaboraron en este estudio.

Cód.	Cod. Hospital	Edad	Sexo	Lugar de Nacimiento	Hábitos		Diagnóstico
					Tabaco	Alcohol	
C03	213537	66	F	Chimborazo	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C06	213742	52	F	Riobamba	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C07	215226	23	F	Quito	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C09	214691	35	M	Quito	2/día		Cáncer papilar de tiroides
C10	213219	52	F	Loja	No	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C13	138910	64	F	Quito	No	No	Cáncer basocelular de ala nasal derecha
C14	52262	81	M		2/día	No	Cáncer papilar de tiroides
C15	156139	38	F	Quito			Cáncer papilar de tiroides
C16	213947	30	F	Angamarca	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C17	214727	61	F	Quito	1 cajetilla a la semana desde los 14 años	Social	Cáncer papilar de tiroides
C20	214358	60	F	Sto. Domingo	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C21	215816	39	F	Quito	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C22	215256	25	F	Quito	No	Social	Cáncer papilar de tiroides

C24	214963	49	F	Puyo/Quito	No	No	Cáncer de las glándulas salivales.
C25	213361	66	F	Quito	No	Social hace 30 años	Cáncer papilar de tiroides
C27	215629	45	M	Riobamba	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C28	212696	30	M	Loja	No	Alcohólico	Cáncer escamoso de lengua
C29	96863	73	M	Cotacachi	No	Social	Cáncer papilar de tiroides
C30	212823	68	F	San José de Minas	1 diario	No	Cáncer papilar de tiroides
C32	214321	48	F	Quito	Hace 30 años 3 cigarrillos/día	No	Cáncer papilar de tiroides
C34	215789	56	M	Bolívar	No	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C36	204863	45	F	Carchi	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C37	216876	61	F	Guayllabamba	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C38	216731	27	F	Quito	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C41	215541	81	M	Cuenca	Media cajetilla diaria	Alcohólico hasta hace 8 años	Cáncer escamoso en la comisura labial
C43	30969	33	F	Portoviejo	Ocasional	No	Cáncer escamoso de paladar
C45	214494	30	F	Machachi	No	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C46	217438	34	F	Píllaro	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C47	218055	42	F	Balzar	No	No	Carcinoma de maxilar izquierdo
C48	193803	45	F	Latacunga	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C49	101425	52	F	Quito	2-3/ día	No	Metástasis en ganglios linfáticos del cuello
C50	217406	55	F	Guano	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C51	22451	23	F	Quito	No	No	Cáncer escamoso de lengua
C52	219586	49	F	Quito	Ocasional	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C54	220083	51	F	Azogues	No	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C55	220160	24	F	Latacunga	No	No	Cáncer condroblástico del maxilar.
C56	209280	57	M	Latacunga	1 cajetilla/día	3 veces/semana	Cáncer de laringe
C57	218997	54	F	Tulcán	No	No	Carcinoma medular del lóbulo tiroideo derecho
C59	158825	55	M	Ibarra	Ocasional	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C60	13756	66	M	Riobamba	1 cajetilla/día	Ocasional	Cáncer escamoso de lengua
C61	227746	84	M	Pelileo	Media cajetilla diaria	1 Vez/semana	Cáncer de Laringe
C64	110361	46	F	Quito	No	Ocasional	Cáncer de laringe
C66	228197	86	F	Tena	No	No	Cáncer en el maxilar

C70	228314	8	F	Quito	No	No	Cáncer en el maxilar
C72	223593	48	F	Sangolquí	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C73	149162	48	M	Quito	3/día	Ocasional	Cáncer de laringe
C78	228966	26	F	Quito	No	No	Cáncer de laringe
C81	142796	57	F	Sangolquí	No	Ocasional	Cáncer papilar de tiroides
C83	228426	50	M	Ambato	No	1 vez/mes	Cáncer de cuerdas vocales y faringe
C85	224471	57	M	Esmeraldas	Desde los 15 años	Desde los 15 años	Cáncer de laringe
C86	228306	40	F	Bolivar	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C87	228780	54	F	Napo	No	No	Carcinoma escamoso de lengua
C88	225022	33	F	Ibarra	No	No	Cáncer del maxilar inferior izquierdo
C90	766384	53	F	Quito	No	No	Cáncer papilar de tiroides
C91	59435	60	F	Guayaquil	Ocasional	Ocasional	Cáncer escamoso de piso de boca

