

MicroRNAs como herramienta diagnóstica en el cáncer de pulmón

MicroRNAs as a diagnostic tool
for lung cancer. *Abstract*

Informe de síntesis de tecnología
emergente

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2010 / 2-3

INFORMES, ESTUDIOS E INVESTIGACIÓN



MINISTERIO
DE ECONOMÍA
Y COMPETITIVIDAD



Ministerio de Economía y Competitividad
IIS
Alf. Arce & Francisco
Instituto
de Salud
Carlos III



MINISTERIO
DE SANIDAD, SERVICIOS SOCIALES
E IGUALDAD

Plan de Calidad
del Sistema
Nacional
de Salud



JUNTA DE ANDALUCÍA
CONSEJO DE SALUD

MicroRNAs como herramienta diagnóstica en el cáncer de pulmón

MicroRNAs as a diagnostic
tool for lung cancer. *Abstract*

Informe de síntesis de
tecnología emergente

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2010 / 2-3

Cuadros Celorrio, Marta

MicroRNAs como herramienta diagnóstica en el cáncer de pulmón. Marta Cuadros Celorrio y Aurora Llanos Méndez — Sevilla: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía, 2012.

44 p; 24 cm. (Colección: Informes, estudios e investigación. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad. Serie: Informes de Evaluación de Tecnologías Sanitarias)

1. Carcinoma de pulmón de células no pequeñas / diagnóstico
2. MicroARNI. Llanos Méndez, Aurora II. Andalucía. Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias III. España. Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad IV. España. Ministerio de Economía y Competitividad

Autores: Marta Cuadros Celorrio y Aurora Llanos Méndez

Este documento se ha realizado en el marco de colaboración previsto en el Plan de Calidad para el Sistema Nacional de Salud elaborado por el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad, al amparo del convenio de colaboración suscrito por el Instituto de Salud Carlos III, organismo autónomo del Ministerio de Economía y Competitividad y la Fundación Progreso y Salud de Andalucía

Edita: Agencia de Evaluación de Tecnologías Sanitarias de Andalucía
Avda. Luis Montoto,,89. 4ª planta
4107 Sevilla
España – Spain

ISBN: 978-84-96990-93-7

NIPO: 725-12-009-3 (MEC). 680-12-005-7 (MSSSI).

Este documento puede ser reproducido en todo o en parte, por cualquier medio, siempre que se cite explícitamente su procedencia

MicroRNAs como herramienta diagnóstica en el cáncer de pulmón

MicroRNAs as a diagnostic
tool for lung cancer. *Abstract*

Informe de síntesis de
tecnología emergente

INFORMES DE EVALUACIÓN DE TECNOLOGÍAS SANITARIAS
AETSA 2010 / 2-3



Conflicto de interés

Las autoras declaran que no tienen intereses que puedan competir con el interés primario y los objetivos de este informe e influir en su juicio profesional al respecto.

Índice

Índice de tablas y figuras.....	7
Puntos clave.....	9
Key points	11
Descripción de la tecnología.....	13
Características clínicas	17
Objetivos	19
Material y métodos	21
Resultados	23
Resultado de la búsqueda	23
Descripción y calidad de los artículos	24
Principales resultados	30
Riesgos y seguridad.....	32
Estudios en marcha.....	32
Aspectos económicos	33
Referencias	35
Anexo 1. Estrategias de búsqueda	39
Anexo 2. Artículos excluidos de la revisión sistemática tras la lectura del título y resumen.....	41
Anexo 3. Calidad de los artículos incluidos en la revisión sistemática	43

Índice de tablas y figuras

Tabla 1. Descripción de los documentos eliminados a texto completo	23
Tabla 2. Descripción de los estudios incluidos	27
Tabla 3. Resultados de validez diagnóstica de miRNA en la detección de carcinoma escamoso.....	31
Figura 1. Resultados de la estrategia de búsqueda	24

Puntos clave

- La medicina personalizada, que estudia al paciente y en función de los resultados le administra un tipo u otro de tratamiento, está llevando a la búsqueda de nuevos marcadores biológicos que mejoren el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades, especialmente del cáncer. En el caso de algunos procesos tumorales ya es posible hacer predicciones sobre las probabilidades de desarrollar la enfermedad en el futuro, metástasis o qué tratamiento será más eficaz.
- La importancia de los microARN (miARN) en el campo de la medicina personalizada ha aumentado durante los últimos 10 años, ya que en muchas enfermedades existe una desregulación de la actividad proteica a través de los miARNs.
- miRview® squamous mide la expresión del miRNA hsa-miR-205 usando la técnica denominada RT-PCR cuantitativa. El resultado permitiría llevar a cabo un diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón no microcítico: cáncer de pulmón de células grandes escamoso *versus* no escamoso.
- Se realizó una revisión sistemática de la literatura en las bases de datos referenciales Embase y Medline, que fueron consultadas sin límite de fecha hasta marzo de 2010. Además, se examinaron *Centre for Reviews and Dissemination* (CRD HTA Database), Cochrane Library y ECRJ. Se estudió eficacia del microRNA hsa-miR-205 en el diagnóstico diferencial entre los subtipos histológicos carcinoma escamosos y adenocarcinoma de pulmón.
- Se seleccionaron 5 estudios de los 102 documentos localizados. Sólo dos trabajos evaluaron la validez analítica de miRview® squamous en pacientes con cáncer de pulmón no microcítico.
- La sensibilidad del miRNA para la detección de carcinoma escamoso estuvo entre 96% y 100% y la especificidad entre 90% y 100%. El área bajo la curva ROC fue cercana a la unidad y los cocientes de probabilidad positivo y negativo mostraron una alta capacidad diagnóstica ($\geq 9,6$ y $\leq 0,04$, respectivamente). Aunque la calidad de los estudios fue moderada-alta, la sensibilidad de la prueba diagnóstica podría estar sobre estimada al tratarse de un diseño caso-control.

Key points

- Personalized medicine, in which the patient is studied and treated according to results, is leading to the search for new biomarkers to improve the diagnosis and treatment of diseases, especially cancer. In the case of some tumoral processes it is now possible to make predictions about the likely development of the disease, metastasis, or which treatment will be most effective.
- The importance of microRNAs (miRNAs) in the field of personalized medicine has increased over the past 10 years, as in many diseases there is a dysregulation of protein activity mediated through miRNAs.
- miRview™ squamous measures the expression of the miRNA, hsa-miR-205, using quantitative RT-PCR. The result allows the differentiation of squamous from non-squamous non-small cell lung cancer.
- A systematic review of the literature was made in the Embase and Medline reference databases, without date limit up to March 2010. In addition, the Centre for Reviews and Dissemination (CRD HTA Database), Cochrane Library and ECRI were examined. The review searched for work on the efficacy of microRNA hsa-miR-205 in the differential diagnosis of the histological subtypes of squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the lung.
- From the 102 papers found, 5 studies were selected. Only two studies assessed the analytical validity of miRview™ in patients with non-small cell lung cancer.
- The sensitivity of the miRNA for the detection of carcinoma was between 96% and 100% and the specificity was between 90% and 100%. The area under the ROC curve was close to unity and the positive and negative probability ratios showed a high diagnostic accuracy (9.6 and 0.04, respectively). Although the quality of the studies was moderate to high, the sensitivity of the diagnostic test may be overestimated as it is a case-control design.

Descripción de la tecnología

Nombre de la tecnología

miRview® squamous, Rosetta Genomics, Ltd. (Rehovot, Israel).

Descripción

El sistema miRview® squamous es una prueba diagnóstica de laboratorio que permitiría diferenciar el subtipo histológico escamoso o no escamoso del tumor de pulmón de células no pequeñas (NSCLC, *Not Small Cell Lung Cancer*)¹.

Mediante la tecnología RT-PCR (reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa) cuantitativa (qRT-PCR), técnica a tiempo real precisa y potente para cuantificar la cantidad de ADN o ARN de un determinado gen que se ha usado en una reacción de PCR, se cuantifican los microARNs (miARNs). Los miARNs son ARNs (ácido ribonucleico) no codificantes de una longitud de entre 21 y 25 nucleótidos que tienen la capacidad de regular la expresión de otros genes mediante diversos procesos². Además, están implicados en la diferenciación tisular durante el desarrollo normal y la tumorigénesis. En concreto, miRview® squamous mide el nivel de expresión del biomarcador hsa-miR-205, hsa-mir-21 y U6 *small* ARN en muestras procedentes de tumores de pulmón de células no pequeñas o no microcítico. El resultado se calcula substrayendo la media de los ciclos tiempo (CT) de hsa-mir-21 y U6 a hsa-mir-205. Valores por debajo de 2,5 se interpretan como prueba del subtipo histológico escamoso mientras que valores por encima de 2,5 como no escamoso.

Limitaciones de la tecnología

Las limitaciones de miRview® squamous son las propias de la técnica (qRT-PCR) y del material empleado (tejido parafinado). La qRT-PCR tiene poco poder de discriminación cuando existe baja expresión o cuando el tumor presenta una distribución heterogénea. En estos casos es conveniente realizar previamente una micro disección de la zona representativa tumoral, aunque este procedimiento es costoso en cuanto a

tiempo y equipamiento y no permite a veces obtener ARN de calidad. Asimismo, el ARN empleado en la prueba debe tener una calidad óptima.

Estado de desarrollo

Hasta la fecha, miRview® squamous no tiene la aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA) ni la marca CE de la Unión Europea.

Difusión

No se han localizado datos sobre la difusión de Rosetta Genomics en el Sistema Nacional de Salud.

Tecnologías alternativas

Los métodos generales para reconocer las diferencias entre los diferentes cánceres de pulmón y poder llevar a cabo un diagnóstico certero no están estandarizados, son difíciles de reproducir y tienen poca exactitud³.

- Anatomía patológica: en la práctica clínica, el estándar para la clasificación de los tumores de pulmón es el estudio histopatológico de secciones de tumores embebidos en bloques de parafina. Para ello, se precisa de una muestra de tejido pulmonar para confirmar el diagnóstico. La muestra puede obtenerse a través de una biopsia (por aspiración con aguja fina o mediante broncoscopia) o por resección quirúrgica. Se ha observado que sólo existe un acuerdo en el diagnóstico anatómo-patológico de un 60%-70%³. Como resultado, más de 40% de los tumores de pulmón NSCLC está incorrectamente clasificado.
- Inmunohistoquímica: prueba de laboratorio en la que se agrega un anticuerpo, un tinte o un radioisótopo a una muestra de tejido canceroso para verificar la presencia de determinados antígenos característicos de distintas líneas de diferenciación y función celular. Su correlación con los parámetros morfológicos permite aumentar la sensibilidad y especificidad del estudio patológico. Sus principales limitaciones son la sensibilidad y especificidad de los marcadores empleados^{4,5}, la elección inadecuada del panel de anticuerpos y la falta de objetividad en los resultados, ya que la

interpretación debe efectuarse conjuntamente con el contexto clínico y morfológico.

Características clínicas

Tipo de tecnología

Diagnóstico.

Ámbito de aplicación de la tecnología

Hospitalario.

Indicaciones

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de pulmón es la primera causa de mortalidad por cáncer en el varón y la tercera, después del de colon y mama, en la mujer⁶. En España, según un informe de la Asociación Española contra el cáncer, se diagnostican anualmente unos 20.000 casos de cáncer de pulmón, lo que representa el 18,4% de los tumores entre los hombres (18.000 casos) y el 3,2% entre las mujeres (2.000 casos)⁷.

A pesar de los avances diagnósticos y terapéuticos, el cáncer de pulmón sigue siendo altamente letal⁸. El tratamiento efectivo del NSCLC requiere un diagnóstico exacto para determinar si el tumor es escamoso o no escamoso, ya que el resultado conlleva implicaciones clínicas distintas. El cáncer pulmonar escamoso tiene un riesgo mayor de sangrado grave para determinadas terapias biológicas dirigidas, incluyendo el bevacizumab y otros fármacos en desarrollo. Otras terapias aprobadas como el pemetrexed están indicadas para el NSCLC no escamoso, únicamente⁹.

Como consecuencia, es importante que un patólogo con experiencia en cáncer de pulmón revise el material patológico de todo paciente con cáncer de pulmón antes de iniciar el tratamiento.

Tipos de cáncer de pulmón¹⁰

1. Cáncer de pulmón de células pequeñas, también llamado microcítico (SCLC, por sus siglas en inglés *Small Cell Lung Cancer*). Recibe este nombre por el tamaño de sus células vistas en

el microscopio. Se relaciona casi invariablemente con el hábito de fumar y se estima que alrededor del 20% de todos los cánceres son de células pequeñas. Éstas se multiplican rápidamente y se pueden formar grandes tumores; además, su capacidad de extenderse a otros órganos es mayor. El de células pequeñas es, casi siempre, un tumor muy agresivo.

2. Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC) o no microcítico. Representa casi el 80% del total de los cánceres de pulmón, con una incidencia ajustada por edad de 34/100.000 habitantes¹¹. Se extiende más lentamente que el de células pequeñas y, ocasionalmente, puede aparecer en personas que no fuman. Los tipos histológicos de cáncer no-microcítico de pulmón son:

- Carcinoma escamoso o epidermoide: clásicamente ha sido el tipo histológico más frecuente, aunque esa tendencia se ha modificado de forma que suponen alrededor del 20% en los EE.UU^{11,12}. En Europa los patrones varían aunque el carcinoma escamoso continúa siendo el tipo histológico más frecuente (33% de los cánceres de pulmón)¹².
- Adenocarcinoma: es ahora el subtipo histológico predominante en muchos países y supone, en EE.UU, alrededor del 45% de este grupo¹¹.
- Carcinoma de células grandes: supone alrededor del 4%¹¹.
- Otros subtipos histológicos entre los que se encuentran el carcinoma adenoescamoso, carcinoma con elementos pleomórficos, sarcomatoides y tumor carcinoide¹³.

Objetivos

Los objetivos generales de los informes de síntesis de tecnologías emergentes son:

- Detectar precozmente nuevas tecnologías o cambios en las existentes con impacto potencial sobre el Sistema Sanitario.
- Sintetizar la información disponible sobre las tecnologías detectadas.
- Aportar información actualizada que ayude a la toma de decisiones en los distintos niveles del Sistema Sanitario.

Los objetivos específicos de este informe se centran en determinar la eficacia del estudio del microRNA hsa-miR-205 en el diagnóstico diferencial entre los subtipos histológicos carcinoma escamoso y adenocarcinoma de pulmón.

Material y métodos

Tipo de estudio

Revisión sistemática de la literatura. La metodología se basó en una búsqueda estructurada en bases prefijadas, lectura crítica de la literatura localizada, síntesis de los resultados y valoración de los mismos en relación al contexto del Sistema Sanitario Público.

Búsqueda bibliográfica

Se diseñaron estrategias de búsquedas (Anexo 1) para las bases de datos referenciales Embase y MedLine, que fueron consultadas sin límite de fecha (hasta marzo de 2010). También se buscó en la Red Internacional de Agencias de Evaluación de Tecnologías (INAHTA) a través del *Center for Reviews and Dissemination* (CRD HTA Database), en la Cochrane Library y en el *Emergency Care Research Institute* (ECRI) para localizar informes de evaluación y revisiones sistemáticas.

Se consultó el registro de ensayos clínicos norteamericano ClinicalTrials.gov^a para identificar ensayos clínicos completados o en curso. Además se buscó en el *Metaregister of Controlled Trials*^b y en el *International Clinical Trials Registry Platform* de la Organización Mundial de la Salud (OMS)^c.

Finalmente, se realizó búsqueda inversa de revisión de las referencias de los estudios identificados.

Criterios de inclusión/exclusión

Para la selección de los estudios se definieron los siguientes criterios de inclusión:

- **Población:** pacientes con cáncer de pulmón no microcítico (NSCLC).
- **Intervención:** hsa-miR-205 o miRview® squamous.

^a <http://www.clinicaltrials.org>

^b <http://www.controlled-trials.com/mrct/>

^c <http://www.who.int/trialsearch/Default.aspx>

- **Comparación:** cualquier alternativa.
- **Resultados:** validez diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos, cocientes de probabilidad, etc.) del diagnóstico diferencial.
- **Idioma:** español e inglés.

Asimismo, se eliminaron trabajos con animales, estudios *in vitro*, protocolos, encuestas, cartas al editor, comentarios y comunicaciones a congresos.

La selección se hizo por dos revisores independientes, resolviendo las discrepancias por consenso.

Lectura crítica

La calidad metodológica se valoró utilizando los criterios CASPe (*Critical Appraisal Skills Programme* Español)^d para pruebas diagnóstica (<http://www.redcaspe.org/herramientas/>) y la herramienta QUADAS¹⁴. Dos revisores independientes analizaron la calidad de los estudios y resolvieron las discrepancias por consenso.

^d Guías CASPe de Lectura Crítica de la Literatura [Internet]. Alicante: CASPe España, Coordinación General, 2005. URL:<http://www.redcaspe.org/que-hacemos/herramientas/>. Acceso: 04-12-2010. (Archived by WebCite® at <http://www.webcitation.org/5ujLWDSgU>)

Resultados

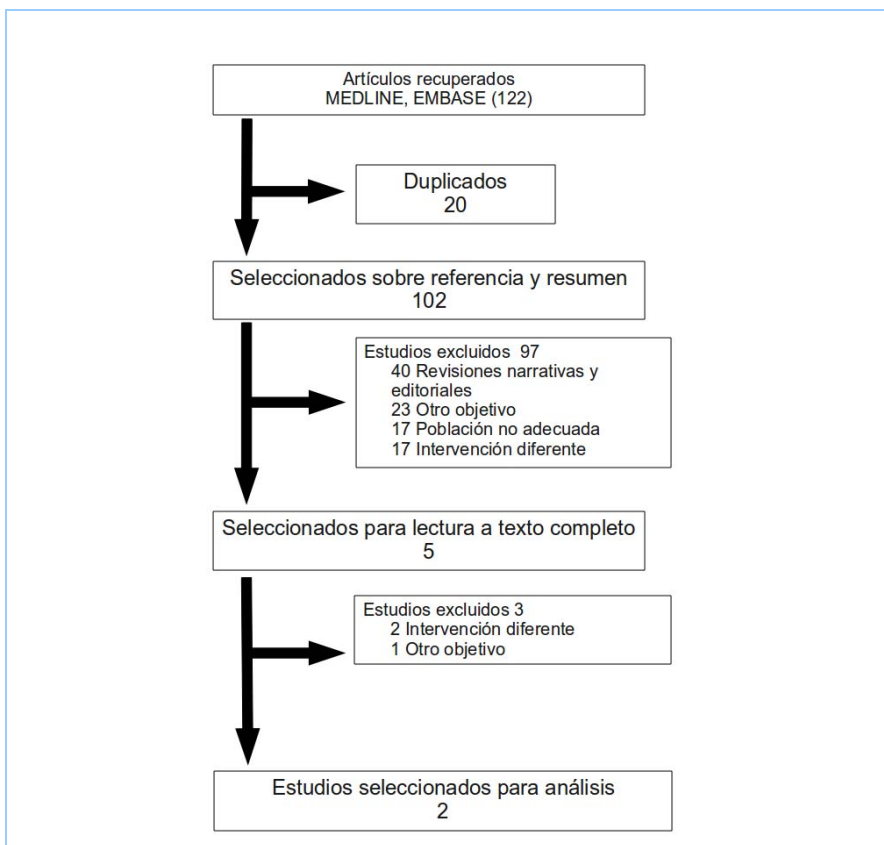
Resultado de la búsqueda

Se localizaron 102 documentos distintos procedentes de todas las bases de datos empleadas (Figura 1). Se realizó una primera selección sobre título y resumen, descartándose inicialmente 90 documentos por no cumplir con los criterios de inclusión o por cumplir con alguno de los criterios de exclusión (Anexo 2). Se seleccionaron 5 estudios que analizaron el hsa-mir-205 o utilizaron la expresión de algún miRNA para establecer un diagnóstico diferencial del cáncer de pulmón¹⁵⁻¹⁹. Tras leerlos a texto completo, sólo tres documentos¹⁵⁻¹⁷, analizaban la expresión del miRNA hsa-mir-205 en pacientes con cáncer de pulmón y sólo dos^{15,16} utilizaron los resultados de expresión para llevar a cabo un diagnóstico diferencial. Finalmente, esta revisión sistemática incluyó dos artículos originales.

Tabla 1. Descripción de los documentos eliminados tras su lectura a texto completo

Autor, año	Técnicas	microRNAs	Resultado	Criterio exclusión
Markou 2008 ¹⁷	RT-PCR	miR-21 miR-205	Factores pronóstico	Objetivo diferente al propuesto
Xie 2010 ¹⁸	RT-PCR	miR-21 mirR-155	Diagnóstico diferencial	Intervención diferente a la propuesta
Yanaihara 2006 ¹⁹	Arrays RT-PCR	hsa-let-7a-2 hsa-miR-155	Diagnóstico, pronóstico	Intervención diferente a la propuesta

Figura 1. Resultados de la estrategia de búsqueda



Descripción y calidad de los artículos

Descripción

El trabajo de Lebanony *et al.* (2009)¹⁶ es un estudio multicéntrico coordinado por el laboratorio Rosetta Genomics cuyo objetivo fue identificar los biomarcadores específicos miRNA para el diagnóstico del carcinoma de células escamosas y posteriormente utilizar esos marcadores para desarrollar un método estandarizado de diagnóstico.

Para estos dos objetivos se realizaron dos estudios con diferentes diseños.

En el primero de ellos, intentaron identificar biomarcadores (miRNAs) expresados de forma significativamente diferente entre 60 adenocarcinomas y 62 carcinomas escamosos de pulmón. Los tumores fueron seleccionados de una muestra de pacientes con NSCLC de hospitales de Israel (Tel Hashomer, Beer-Sheva, Tikva) y New York. El diagnóstico se basó en los registros médicos. Una vez establecidos los grupos, compararon los niveles de expresión de los miRNAs, obtenidos de los experimentos con *microarrays*, de los dos subtipos de NSCLC. Para ello aplicaron un test estadístico (*t-test*) que identificó aquellos miRNAs expresados de forma distinta entre los tumores escamosos y los adenocarcinomas. Para confirmar estas diferencias, posteriormente se realizó otra técnica molecular (qRT-PCR) en 36 de las muestras anteriores y en una nueva serie de 20 NSCLC.

La segunda etapa consistió en:

1. La definición de los valores umbrales para establecer el diagnóstico de carcinoma escamoso, determinados siguiendo la fórmula mostrada en la Tabla 2 (valor normalizado de hsa-miR-205 menos la mitad del valor normalizado de miR-21). Para este objetivo se utilizaron 27 muestras (12 adenocarcinomas y 15 escamosos) cuyo diagnóstico se realizó, siguiendo la última clasificación de la OMS, por dos patólogos independientes procedentes de la Universidad de New York o por un solo patólogo de la Universidad de Columbia. En este último caso, el diagnóstico se comparó con el diagnóstico que constaba en la historia clínica. Sólo en un caso hubo desacuerdo con el diagnóstico inicial que fue revisado por otros tres patólogos de la Universidad de Columbia.
2. La validación del método diagnóstico siguiendo los valores de corte obtenidos en el paso previo. En este caso, los investigadores desconocían el subtipo histológico de las 79 muestras, estableciendo el diagnóstico diferencial siguiendo el sistema anteriormente explicado.

El objetivo de Bishop *et al.* (2010)¹⁵ fue establecer la sensibilidad y especificidad de la expresión de los miRNAs por qRT-PCR para el diagnóstico diferencial de NSCLC. Para ello, realizaron un estudio de pruebas diagnósticas de diseño caso-control (fase II) con 102 muestras tumorales (81 resecciones tumorales y 21 biopsias preoperatorias)

precedentes del *Hospital Johns Hopkins* de Baltimore (USA), con diagnóstico histológico establecido de adenocarcinoma o carcinoma escamoso de pulmón. A estas muestras se les extrajo el RNA para la cuantificación de los miRNAs hsa-miR-205, hsa-miR-21 y U6 snRNA. Las mediciones se hicieron por triplicado para obtener la media de los Ct excluyendo las medidas *outliers* (cuando diferían más de un ciclo de la mediana). La puntuación final se obtuvo usando la fórmula $Ct\ miR205 - [(Ct\ miR21 + Ct\ miRU6)/2]$.

El método estándar utilizado para el diagnóstico con el que se realizaron las comparaciones consistió en la histología más los resultados de un panel inmuno-histoquímico compuesto por marcadores (factor de transcripción tiroideo1 (TTF-1), la napsina A y P63) cuya expresión es usada para clasificar los NSCLC.

En la Tabla 2 se presentan algunos detalles sobre población, patología, y parámetros medidos de los dos estudios retrospectivos de pruebas diagnósticas incluidos en esta revisión sistemática.

Tabla 2. Descripción de los estudios incluidos						
Autor, año	Población		Exclusión	Cuantificación de los miRNAs	Valor umbral	Prueba referencia
	Escamoso	Adenocarcinoma				
Lebanony 2009 ⁶	27 (34,2%)	52 (65,8%)	<40% de tumor en la muestra	$Ct_{miR205} - [(Ct_{miR21} + Ct_{miR106})/2] = Ct_{205} - (Ct_{21}/2) \#$	2,5	Histología
Bishop 2010 ⁵	52 (49%)	50 (51%)	<50% de tumor en la muestra	$Ct_{miR205} - [(Ct_{miR21} + Ct_{miR106})/2] \#$	2,5	Histología más panel inmunohistoquímico

Ct: ciclo umbral
 NSCLC: cáncer de pulmón de células no pequeñas o no microcítico
 qRT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa retrotranscriptasa cuantitativa
 # En la prueba qRT-PCR, se cuantificaron los miRNA por triplicado, eliminándose aquellos resultados que difieran en más de un ciclo de la mediana. El Ct utilizado fue la media obtenida de las 3 mediciones. Los valores de expresión de hsa-miR-205 fueron normalizados sustrayéndoles los valores de U6 y miR-201

Calidad de los artículos

De acuerdo a los criterios del *Critical Appraisal Skills Programme* Español y la herramienta QUADAS¹⁴, los artículos originales recuperados en esta revisión sistemática se clasificaron de moderada calidad metodológica.

Validez interna

Aspectos relacionados con la prueba de referencia

Todos los individuos se sometieron a la misma prueba de referencia para la confirmación del diagnóstico, ya que el diseño del estudio fue retrospectivo partiendo del diagnóstico realizado por la anatomía patológica.

Para asegurar que la condición a estudio está o no presente, el patrón de referencia tiene que contar con una validez contrastada o, al menos, aceptada por consenso. El patrón de referencia consensuado para el diagnóstico de los tumores de pulmón es el diagnóstico anatomopatológico, que está sujeto a una gran variabilidad inter-observador, falta de especificidad y estandarización. Esto podría introducir sesgos en las estimaciones de validez de la prueba diagnóstica. Por esta razón y para evitar diagnósticos equívocos, los casos incluidos en el estudio de Lebanony *et al.* (2009)¹⁶ fueron revisados por dos patólogos de forma independiente y en los casos en los que no hubo un acuerdo en el diagnóstico se recurrió a un tercer patólogo⁸. En el caso de Bishop *et al.* (2010)¹⁵, la anatomía patológica se completó con un diagnóstico inmunohistoquímico.

La comparación con la prueba a estudio sólo estuvo cegada en el trabajo de Lebanony *et al.* (2009)¹⁶. Sin embargo, al tratarse el resultado del miRNA de una puntuación obtenida de forma objetiva, no cabe la posibilidad teórica de verse influenciada por el conocimiento previo del diagnóstico definitivo.

No se proporcionó información sobre el periodo de tiempo transcurrido entre la prueba de referencia y la prueba a estudio, aunque en este caso parece poco probable que la condición a estudio se haya modificado con el tiempo.

Aspectos relacionados con el espectro de pacientes

En ambos trabajos, el espectro de pacientes no fue representativo de los pacientes que se someterán a la prueba a estudio en la práctica clínica habitual. La razón principal radica en el diseño caso-control de uno de los

estudios, por lo que quedaron sin representación tumores con pobre diferenciación o con resultados histológicos inciertos. Esto podría dar lugar a una sobre estimación de la sensibilidad de la prueba diagnóstica, ya que las pruebas positivas estarían sobre representadas (sesgo de confirmación diagnóstica).

Sólo en uno de los estudios¹⁵ se proporcionó información sobre el grado de diferenciación tumoral, siendo en el otro trabajo imposible determinar la representatividad de la muestra en este aspecto.

Aspectos relacionados con reproducibilidad

Las características de los pacientes (edad, sexo, raza y diagnóstico), la realización de la prueba, interpretación y resultados se describieron de forma adecuada^{15,16}. Los anticuerpos y máquinas teñidoras empleadas en el estudio inmunohistoquímico de los tumores fueron especificados¹⁵, facilitando la reproducción este estudio.

Validez externa

Los estudios evaluaron sólo la validez analítica de miRview® squamous y no proporcionaron el tipo de información necesaria para determinar si el resultado de la prueba afectaba a la toma de decisiones en cuanto al diagnóstico y tratamiento de cada paciente.

Los autores no ofrecieron información sobre el estadio tumoral, factores de riesgo de cáncer de pulmón o localización de la muestra, que pueden influir en el diagnóstico de estos tumores.

El estudio de la expresión de hsa-miR-205 por qRT-PCR en pacientes con NSCLC está exento de riesgos y molestias para el paciente, pudiendo ser aceptable su uso para la población. Su uso podría encarecer los costes derivados del diagnóstico del cáncer de pulmón por la necesidad de adquirir nuevos reactivos. Sin embargo, los aparatos de biología molecular requeridos para su análisis están disponibles en la mayoría de las unidades de investigación de los hospitales de especialidades.

El posible conflicto de intereses (honorarios, posición laboral, fondos para la investigación) fue especificado en sendos trabajos.

Principales resultados

Biomarcadores identificados

Lebanony *et al.* (2009)¹⁶, en su estudio comparativo identificaron hsa-miR-205 como el miRNA cuyos niveles de expresión eran los que más diferencias presentaban, estadísticamente hablando, entre los dos subgrupos de tumores, encontrándose sobre expresado en el subtipo escamoso (la mediana de la fluorescencia normalizada fue 36 veces mayor en este grupo respecto al adenocarcinoma). Este resultado se confirmó utilizando la técnica qRT-PCR, encontrándose una alta correlación con la anterior (coeficiente de correlación de Pearson=0,94; IC95%: 0,88-0,97).

Valores umbral

De acuerdo a los valores de expresión normalizados obtenidos por qRT-PCR, se observó que el valor 2,5 separaba los NSCLC escamosos de los no escamosos. Muestras con valores inferiores a 2,5 se clasificaron como carcinomas escamosos. A continuación, se definieron los siguientes valores de corte para cada categoría¹⁶:

- Igual o menor de 1: alta certeza de carcinoma escamoso.
- Entre 1 y 2,5: baja certeza de carcinoma escamoso.
- Entre 4 y 2,5: baja certeza de carcinoma no escamoso.
- Mayores de 4: alta certeza de carcinoma no escamoso.

En el estudio de Bishop *et al.* (2010)¹⁵ se utilizó este valor umbral previamente establecido por Lebanony *et al.* (2009)¹⁶.

Parámetros de validez diagnóstica

- La **sensibilidad** para identificar carcinoma escamoso fue alta, entre 96% (IC95: 78,9%-99,9)¹⁵ y 100%¹⁴, con un 79% clasificados como tumor escamoso con valores ≤ 1 (alta certeza diagnóstica). Un carcinoma escamoso fue incorrectamente clasificado (falso negativo) en el estudio de Lebanony *et al.* (2009)¹⁶, cuyo valor obtenido en la prueba a estudio estuvo entre 4 y 2,5 (baja certeza de carcinoma no escamoso).
- La **especificidad** de la prueba para clasificar muestras tumorales como no escamosas osciló entre 90% (IC95%: 77,8%-96,6%)¹⁶ y

100%¹⁵. Todos los casos clasificados como alta certeza de carcinoma no escamoso (valor > 4) fueron diagnosticados como no escamosos por la revisión patológica¹⁶.

- Los **coeficientes de probabilidad positivos (CPP)** y **negativos (CPN)** calculados a partir de los datos obtenidos de los artículos, mostraron una alta capacidad diagnóstica de la prueba (CPP≥9,6 y CPN≤0,04)^{15,16}.
- El **área bajo la curva ROC** que indica la exactitud global de la prueba, fue de 0,96 (IC95%: 0,884-0,991)¹⁶.
- El **porcentaje de muestras con puntuación cercana al umbral** (entre 1 y 4) o de **baja certeza diagnóstica** estuvo entre 10%¹⁶ y 22%¹⁵. El grado de diferenciación tumoral no interfirió con la exactitud de la prueba, obteniendo la misma proporción de puntuaciones con baja certeza diagnóstica en los tumores pobremente diferenciados que en los bien diferenciados¹⁵.
- En una subpoblación en la que se utilizó la biopsia pulmonar preintervención y aspirados como muestra además de la resección del tumor, se observó una disminución de la especificidad (90%) con un 100% de sensibilidad¹⁵.

Tabla 3. Resultados de validez diagnóstica de miRNA en la detección de carcinoma escamoso

Autor y año	Sensibilidad (IC95%)	Especificidad (IC95%)	CPP	CPN
Lebanony 2009 ¹⁶	96% (78,9%-99,9%)	90% (77,8%-96,6%)	9,6	0,04
Bishop 2010 ¹⁵	100%	100%	-	-

IC: intervalo de confianza
 CPP: coeficiente de probabilidad positivo
 CPN: coeficiente de probabilidad negativo

Parámetros de precisión diagnóstica

Sólo Lebanony *et al.* (2009)¹⁶ calcularon la reproducibilidad de la técnica comparando las mediciones de 43 muestras en dos laboratorios diferentes. Se obtuvo una alta concordancia tanto en la puntuación como en la

clasificación final, con 41 de 43 casos con idéntica categoría asignada en ambos laboratorios.

Riesgos y seguridad

Los riesgos del diagnóstico mediante miRNA vienen determinados por la toma de la muestra tumoral, que sigue el mismo procedimiento que para el diagnóstico anatomopatológico.

Estudios en marcha

No se han localizado estudios en marcha.

Aspectos económicos

Estudios de evaluación económica

No se han recuperado estudios que evalúen desde el punto de vista económico este sistema.

Coste por unidad y precio

No se obtuvo información sobre el coste.

Referencias

1. RosettaGenomics [Internet]. Philadelphia: RosettaGenomics, 2008. URL: <https://www.rosettagenomics.com/index.asp>. Acceso: 30/04/2010. Archivada por WebCite® en <http://www.webcitation.org/5sbvRjmKb>.
2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004; 116(2):281-297.
3. Stang A, Pohlabein H, Muller KM, Jahn I, Giersiepen K, Jockel KH. Diagnostic agreement in the histopathological evaluation of lung cancer tissue in a population-based case-control study. *Lung Cancer*. 2006; 52(1):29-36.
4. Wang BY, Gil J, Kaufman D, Gan L, Kohtz DS, Burstein DE. P63 in pulmonary epithelium, pulmonary squamous neoplasms, and other pulmonary tumors. *Hum Pathol*. 2002; 33(9):921-926.
5. Maeshima AM, Omatsu M, Tsuta K, Asamura H, Matsuno Y. Immunohistochemical expression of TTF-1 in various cytological subtypes of primary lung adenocarcinoma, with special reference to intratumoral heterogeneity. *Pathol Int*. 2008; 58(1):31-37.
6. Organización Mundial de la Salud (OMS). Cáncer [Internet]. Geneve: OMS, 2010. Acceso: 10/03/2010. URL: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html>. Archivada por WebCite® en <http://www.webcitation.org/5sbvgCtr6>.
7. Asociación Española Contra el Cáncer (AECC). Cáncer de pulmón. Incidencia [Internet]. Madrid: AECC, 2010. Acceso: 30/04/2010. URL: <https://www.aecc.es/SobreElCancer/CancerPorLocalizacion/cancerdepulmon/Paginas/incidencia.aspx>. Archivada por WebCite® en <http://www.webcitation.org/5sbwDd815>
8. Berrino F. The EURO CARE Study: strengths, limitations and perspectives of population-based, comparative survival studies. *Ann Oncol*. 2003; 14 Suppl 5:v9-13.
9. Scagliotti G, Hanna N, Fossella F, Sugarman K, Blatter J, Peterson P, *et al*. The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two phase III studies. *The Oncologist*. 2009; 14(3):253-263.

10. National Cancer Institute (NCI). Cáncer de aparato respiratorio y tórax [Internet]. Bethesda: NCI, 2010. Acceso: 01/03/2010. URL: <http://www.cancer.gov/espanol/tipos/aparato-respiratorio-torax>. Archivada por WebCite® en <http://www.webcitation.org/5sbwZgHJP>
11. National Cancer Institute (NCI). SEER Cancer Statistics Review 1975-2007 [Internet]. Bethesda: NCI, 2008. Acceso: 01/03/2010. URL: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2007/results_merged/sect_15_lung_bronchus.pdf. Archivada por WebCite® en <http://www.webcitation.org/5sc0iAUPG>
12. Santos-Martínez MJ, Currull V, Blanco ML, Macià F, Mojal S, Vila J, *et al*. Características del cáncer de pulmón en un hospital universitario. Cambios epidemiológicos e histológicos en relación con un aserihistórica. Arch Bronconeumol. 2005;41:307-12.
13. National Cancer Institute (NCI). Cáncer de pulmón de células no pequeñas: Tratamiento (PDQ®) [Internet]. Bethesda: NCI, 2010. Acceso: 01/03/2010. URL: <http://www.cancer.gov/espanol/pdq/tratamiento/pulmon-celulas-no-pequenas/HealthProfessional/>. Archivada por WebCite® en <http://www.webcitation.org/5sc1ZjYY0>.
14. Whiting P, Rutjes AW, Reitsma JB, Bossuyt PM, Kleijnen J. The development of QUADAS: a tool for the quality assessment of studies of diagnostic accuracy included in systematic reviews. BMC Med Res Methodol. 2003;3:25.
15. Bishop JA, Benjamin H, Cholakh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. Clin Cancer Res. 2010; 16(2):610-619.
16. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, *et al*. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. J Clin Oncol. 2009; 27(12):2030-2037.
17. Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. Clin Chem. 2008; 54(10):1696-1704.
18. Xie Y, Todd NW, Liu Z, Zhan M, Fang H, Peng H, *et al*. Altered miRNA expression in sputum for diagnosis of non-small cell lung cancer. Lung Cancer. 2010; 67(2):170-176.

19. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9(3):189-98.

Anexo 1. Estrategias de búsqueda

Embase (marzo 2010)

- #7. #4 OR #6
- #6. #5 AND [humans]/lim AND [embase]/lim AND [1996-2010]/py
- #5. 'lung cancer'/exp/mj AND 'microrna'/exp
- #4. #1 AND #2 AND #3
- #3. sensitivity:ab,ti OR specificity:ab,ti OR 'predictive value':ab,ti OR concordance:ab,ti OR prognosis:ab,ti AND [1996-2010]/py
- #2. lung:ab,ti AND near2:ab,ti AND (carcinoma?:ab,ti OR cancer:ab,ti OR neoplasm?:ab,ti) OR nsclc:ab,ti OR sqcc:ab,ti AND [1996-2010]/py
- #1. micro?rna?:ab,ti OR mirna:ab,ti OR mirwew:ab,ti OR 'hsa-mir-205':ab,ti AND [1996-2010]/py

MedLine (marzo 2010)

- 1 "19273703".ui. (1)
- 2 (microRNA? or mirna or mirwiew or "has-mir-205").ti,ab.
- 3 (lung adj2 (carcinoma? or Cancer or neoplasm?)).ti,ab.)
- 4 (sensitivity or specificity or predictive or prognos* or concordance).ti,ab.
- 5 2 and 3 and 4
- 6 MicroRNAs/
- 7 exp *Lung Neoplasms/cl, di [Classification, Diagnosis]
- 8 "sensitivity and specificity"/
- 9 "predictive value of tests"/
- 10 diagnosis/ or diagnosis, differential/ or "diagnostic techniques and procedures"/ or prognosis/
- 11 8 or 9 or 10
- 12 6 and 7 and 11
- 13 5 or 12
- 14 from 13 keep 1-27

Center for Review and Dissemination (CRD) (febrero 2010)

RNA and lung cancer: 2, no relacionados.

microRNA and lung cancer: 0.

COCHRANE (febrero 2010)

RNA and lung cancer: 13, no relacionados.

microRNA and lung cancer: 0.

ECRI (febrero 2010)

Lung cancer: 3, no relacionados.

CLINICAL TRIALS (febrero 2010)

Lung cancer AND microRNA: 3 (1 en reclutamiento y 2 en no reclutamiento), no relacionados.

Anexo 2. Artículos excluidos de la revisión sistemática tras la lectura del título y resumen

Estudios eliminados por tratarse de estudios no originales (revisiones no sistemáticas, comentarios, editoriales, cartas al director) (n=40)	
Ariyoshi Y, 2006	Kuner R, 2009
Arriola E, 2009	Mansukhani MM, 2009
Beane J, 2009	McCarthy N, 2009
Cho WCS, 2009	Muller DW, 2009
Cho WCS, 2009	Nana-Sinkam SP, 2006
Cho WCS, 2009	Ortholan C, 2009
Cho WCS, 2009	Qi ZW, 2009
Cipriani NA, 2009	Rosell R, 2006
Du L, 2010	Rosell R, 2006
Eder M, 2005	Sempere LF, 2009
Fang WG, 2009	Rossi G, 2009
Garzon R, 2006	Tavazoie SF, 2008
Gong L, 2009	Tong AW, 2006
Hagan JP, 2007	Valastyan S, 2009
Hayes DN, 2008	Wang QZ, 2009
Herbst RS, 2008	Wei JL, 2009
Hurst DR, 2009	Wu X, 2009
Hutchinson R, 2006	Xu K, 2008
Jay C, 2007	Yu SL, 2007
Kratz JR, 2009	Zinner R, 2009

Estudios eliminados por no cumplir los criterios de inclusión referidos a la población a estudios (n=17)	
Crawford M, 2008	Nagayama K, 2007
Diederichs S, 2006	Nasser MW, 2008
Fang WJ, 2007	Oh JS, 2010
Fei J, 2009	Shin S, 2009
Hayashita Y, 2005	Su X, 2007
He X, 2009	Sun Y, 2010
Jiang L, 2009	Takahashi Y, 2009
Lee EM, 2009	Xu XM, 2009
Liu B, 2009	

Estudios eliminados por no cumplir los criterios de inclusión referidos al objetivo (n=23)	
Bandi N, 2009	Heller G, 2010
Brueckner B, 2007	Hu Z, 2008
Chin LJ, 2008	Kumar MS, 2008
Chiosea S, 2007	Ma L, 2010
Cho WCS, 2009	Mascaux C, 2009
Christensen BC, 2009	Rabinowits G, 2009
Crawford M, 2009	Tian T, 2009
Diederichs S, 2008	Wang CL, 2009
Ebi H, 2009	Wang G, 2008
Fabbri M, 2007	Wang G, 2009
Garofalo M, 2008	Wang L, 2010
Griffits EA, 2009	

Estudios eliminados por tratarse de una intervención diferente a la estudiada (n=17)	
Aharonov R, 2009	Osada H, 2009
Gallardo E, 2009	Patnaik SK, 2010
Inamura K, 2007	Raponi M, 2009
Karube Y, 2005	Seike M, 2009
Keller A, 2009	Son JW, 2009
Landi M, 2010	Takamizawa J, 2004
Liu X, 2009	Weiss GJ, 2008
Miko E, 2009	Yu SL, 2008
Navarro A, 2009	

Anexo 3. Calidad de los artículos incluidos en la revisión sistemática

Calidad de los estudios según la herramienta QUADAS	Lebanony 2009 ⁸	Bishop 2010 ⁷
¿El espectro de pacientes fue representativo de los pacientes que se someterán a la prueba a estudio en la práctica clínica habitual?	no	no
¿Los criterios de selección estuvieron claramente descritos?	Incierto	si
¿La prueba de referencia es la correcta para detectar la condición estudiada?	Si/no	si
¿El periodo de tiempo transcurrido entre la prueba de referencia y la prueba a estudio es suficientemente corto para asegurar razonablemente que la condición estudiada no cambia entre la realización de las dos pruebas?	no	no
¿Todos los individuos del estudio se sometieron a la prueba de referencia para la confirmación del diagnóstico?	si	si
¿ Los pacientes recibieron la misma prueba de referencia a pesar de los resultados de la prueba a estudio?	si	si
¿La prueba de referencia fue independiente de la prueba a estudio (la prueba a estudio no formó parte de la prueba de referencia)?	si	si
¿La ejecución de la prueba a estudio se describió con suficiente detalle como para permitir su replicación?	si	si
¿La ejecución de la prueba de referencia se describió con suficiente detalle como para permitir su replicación?	si	Incierto
¿Los resultados de la prueba a estudio se interpretaron sin conocimiento de los resultados obtenidos en la prueba de referencia?	si	no
¿Los resultados de la prueba de referencia se interpretaron sin conocimiento de los resultados obtenidos en la prueba a estudio?	si	si
¿Cuándo se interpretaron los resultados de la prueba a estudio, estuvieron disponibles los mismos datos clínicos de los que se dispondría en la práctica clínica habitual?	Incierto (resección tumoral vs biopsia)	Incierto (resección tumoral vs biopsia)
¿Se recogieron los resultados no-interpretables/intermedios de la prueba a estudio?	Incierto	No procede
¿Se explicaron las pérdidas del estudio?	no	No procede

