

**UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA
ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA
AGRONÓMICA Y DEL MEDIO NATURAL**



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



**Análisis transcriptómico completo de miRNAs en
la progresión del carcinoma escamoso de piel
con tecnología EdgeSeq**

TRABAJO FIN DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Autora: Raquel Pérez Mateo

Tutora académica: Lynne Paula Yenush

Tutor externo: José Antonio López-Guerrero

Curso académico 2018/2019

Valencia, junio de 2019



Título. Análisis transcriptómico completo de miRNAs en la progresión del carcinoma escamoso de piel con tecnología EdgeSeq

Title. Whole transcriptome analysis of miRNAs in the progression of squamous cell carcinoma of the skin using EdgeSeq technology

Resumen. El carcinoma cutáneo de células escamosas (cSCC) es uno de los cánceres más comunes en humanos, incrementando su importancia en los últimos 50 años por el aumento de su incidencia. Es por ello que se hace necesario identificar nuevos biomarcadores con los que mejorar el pronóstico y tratamiento. Sabiendo que los microRNAs (miRNAs), cuando se expresan aberrantemente, pueden funcionar como biomarcador y que ciertos miRNAs se encuentran desregulados en cSCC, en este estudio se hace uso de la tecnología HTG EdgeSeq (con el panel WTA), para identificar un mapa de expresión diferencial característico para cada uno de los estadios de cSCC. Así pues, se identifican 12 potenciales miRNAs diferencialmente expresados a lo largo de las diferentes etapas de progresión del cSCC (carcinoma inicialmente invasivo, carcinoma de alto riesgo no metastásico y carcinoma metastásico) sin tener en cuenta la queratosis actínica (AK) por ser la lesión pre-maligna a la enfermedad. Se encuentran entre estos miRNAs, tres no descritos anteriormente en la literatura para cSCC, siendo estos miR-132-3P, miR-199B-5P y miR-214-5P. La información obtenida permitirá inferir en nuevos biomarcadores pronósticos de la enfermedad, así como a mejorar las terapias.

Abstract. Cutaneous squamous cell carcinoma (cSCC) is one of the most common cancers in humans, increasing its importance in the last 50 years due to the increase in its incidence. That is why it is necessary to identify new biomarkers with which to improve prognosis and treatment. Knowing that microRNAs (miRNAs), when expressed aberrantly, can function as a biomarker and that miRNAs are found to be deregulated in cSCC, in this study HTG EdgeSeq technology is used (with the WTA panel), for a differential expression map characteristic for each of the cSCC stadiums. Thus, 12 potential miRNAs differentially expressed throughout the different stages of progress of cSCC (non-invasive carcinoma, non-metastatic high-risk carcinoma and metastatic carcinoma) are identified without considering actinic keratosis (AK) because it is the pre-malignant injury at cSCC illness. They are among these miRNAs, three not previously in the literature for cSCC, being miR-132-3P, miR-199B-5P and miR-214-5P. The information refers to the new biomarkers of the disease, as well as to improve the therapies.

Palabras clave: miRNA; carcinoma escamoso de piel; NGS; queratosis actínica

Keywords: miRNA; squamous cell carcinoma; NGS; actinic keratosis

Alumna: Raquel Pérez Mateo

Tutor: Dr. José Antonio López-Guerrero

Co-tutora: Dra. Lynne Paula Yenush

Valencia, junio de 2019.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

En primer lugar, me gustaría agradecer a la Universitat Politècnica de València la formación recibida a lo largo de estos cuatro años. Sobre todo, a aquellos profesores que con paciencia y mimo por su trabajo han conseguido que tenga un punto de vista crítico con la información que recibo.

También se merece un agradecimiento el Instituto Valenciano de Oncología por permitirme no sólo realizar mis prácticas curriculares con ellos, sino también el Trabajo Final de Grado. En especial el laboratorio de Biología Molecular, liderado por el Doctor J.A. López-Guerrero.

Especial gratitud a mi tutora Lynne, por haberme ayudado a solventar todos los problemas que surgieron con dedicación. También por su amabilidad y tacto.

A mi padre, que siendo narcoléptico escuchó durante años temarios eternos de su hija.

A mi hermano, que solucionó mis problemas con la tecnología.

A mi hermana, por ser mi confidente y mejor amiga.

A mi madre, que siempre relativizó mis problemas.

*A las cuatro personas en las que habito,
por existir.*

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1.	EL CÁNCER COMO ENFERMEDAD.....	1
1.1.1.	Las cifras del cáncer.....	1
1.2.	CÁNCER DE PIEL.....	5
1.3.	CARCINOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS ESCAMOSAS (cSCC).....	6
1.3.1.	Incidencia.....	6
1.3.2.	Etiología.....	7
1.3.3.	De piel sana a carcinoma.....	8
1.4.	microRNA.....	10
1.4.1.	Biogénesis de los miRNA.....	11
1.4.2.	miRNA en cáncer	12
1.4.3.	Significado de la desregulación de miRNA	13
1.4.4.	miRNA en el carcinoma cutáneo de células escamosas (cSCC).....	14
2.	OBJETIVOS.....	15
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1.	Pacientes accesibles al estudio.....	16
3.2.	Muestras.....	18
3.3.	HTG EdgeSeq, <i>Whole Transcriptome Assay</i>	19
3.3.1.	Procesado de las muestras FFPE.....	20
3.3.2.	Procesador HTG EdgeSeq.....	20
3.3.2.1.	Ensayo de protección por nucleasas (qNPA).....	21
3.3.2.2.	Fabricación de la genoteca: etiquetado y adaptadores.....	22
3.3.2.3.	Cuantificación y normalización: HTG software.....	23
3.3.3.	Secuenciación con MiSeq System (Illumina) y ensamblaje de lecturas.....	23
3.3.4.	Análisis de datos.....	24
4.	RESULTADO Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS.....	26
4.1.	Secuenciación de los perfiles de expresión	26
4.2.	Análisis descriptivo.....	26
4.2.1.	Análisis de componentes principales.....	26
4.2.2.	Agrupamiento jerárquico y análisis de la expresión.....	28
4.2.3.	miRNAs diferencialmente expresados.....	33
4.3.	Discusión de los resultados.....	34
5.	CONCLUSIONES.....	40
6.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
7.	ANEXOS	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estimación del número de nuevos casos de cáncer en España para el año 2019, según tipo tumoral.	2
Figura 2. Estimación del número de nuevos casos de cáncer en varones en España para el año 2019 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma).....	3
Figura 3. Estimación del número de nuevos casos de cáncer en mujeres en España para el año 2019 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma).....	3
Figura 4. Estimación de la prevalencia de tumores en España para el año 2018.....	4
Figura 5. Fallecimientos por tumores en España para el año 2017, ambos sexos.	5
Figura 6. Probabilidad de que las lesiones neoplásicas cutáneas humanas progresen a carcinoma invasivo.	9
Figura 7. Comparación clínica, histológica y molecular de AKs, cSCC y cSCC metastásico.....	10
Figura 8. Biogénesis de los microRNA.....	12
Figura 9. Esquema de flujo de trabajo del sistema HTG EdgeSeq.	19
Figura 10. Fundamento de la tecnología HTG EdgeSeq.....	21
Figura 11. Esquema del ciclo de PCR para la amplificación del material.....	22
Figura 12. Gráfico de calidad del PCA.	26
Figura 13. Análisis de componentes principales de la matriz de expresión para los 24 pacientes analizados.	27
Figura 14. Análisis de componentes principales de la matriz de expresión eliminando los 5 pacientes que presentaban queratosis actínica.....	28
Figura 15. Gráfico heat map de pacientes con carcinoma inicialmente invasivo frente a los pacientes con el resto de fases en la progresión teniendo en cuenta los 50 genes más relevantes sin tener en cuenta AK.	30
Figura 16. Gráfico heat map de pacientes con carcinoma de alto riesgo no metastásico frente a los pacientes con el resto de fases en la progresión teniendo en cuenta los 50 genes más relevantes sin tener en cuenta AK..	31
Figura 17. Gráfico heat map de pacientes con carcinoma metastásico frente a los pacientes con el resto de fases en la progresión teniendo en cuenta los 50 genes más relevantes sin tener en cuenta AK..	32
Figura 18. Representación de las fases posibles en el cSCC y sus correspondientes vías.	33
Figura 19. Representación de la expresión diferencial de los 12 miRNAs a estudio (miR-10A-5P, miR-127-3P, miR-132-3P, miR-136-5P, miR-143-3P, miR-145-5P, miR-154-3P, miR-154-5P, miR-199A-5P, miR-199B-5P, miR-214-5P, miR-21-5P).....	34

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Factores de riesgo en el desarrollo del carcinoma cutáneo de células escamosas.	7
Tabla 2. Representación de ciertos miRNA infraexpresados según la literatura actual en cSCC. Se muestra su función habitual y la referencia.	14
Tabla 3. Representación de ciertos miRNA sobreexpresados según la literatura actual en cSCC. Se muestra su función habitual y la referencia.	15
Tabla 4. Tabla resumen de las características propias de los pacientes recogidos en el estudio	17
Tabla 5. Presentación de las características anatomopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio.	18
Tabla 6. Representación del número de miRNAs diferencialmente expresados en la fase correspondiente.....	32
Tabla 7.1. Descripción de los miRNAs que presentan una expresión diferencial a lo largo de la evolución de cSCC..	38
Tabla 7.2. Descripción de los miRNAs que presentan una expresión diferencial a lo largo de la evolución de cSCC.	39

LISTA DE ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

AK: queratosis actínica
BCC: carcinoma basocelular
CCNM: carcinoma cutáneo no melanoma
cSCC: carcinoma cutáneo de células escamosas
DGCR8: DiGeorge syndrome chromosomal [or critical] region 8
DNA: ácido desoxirribonucleico
DNMT: DNA metiltransferasa o metiltransferasa de ácido desoxirribonucleico
EMT: transición epitelial-mesenquimatosa
FFPE: Formalin-fixed Paraffin-Embedded
H&E: Hematoxilina y eosina
ILP: intervalo libre de progresión
INE: Instituto Nacional de Estadística
KIN: neoplasia intraepidérmica queratinocítica
mRNA: ácido ribonucleico mensajero
miRNA/miR: micro ácido ribonucleico
NGS: secuenciación de segunda generación
OMS: Organización Mundial de la Salud
PCA: Análisis de Componentes Principales
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
qNTA: quantitative Nuclease-Protection Assay
qPCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa cuantitativa
RNA: ácido ribonucleico
SBS: Secuenciación por síntesis
SE: elastosis severa
SG: supervivencia global
SNPs: polimorfismos de un sólo nucleótido
TNM: tumor-nodo-metástasis
XPO5: exportina 5
WTA: Whole Transcriptome Assay

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EL CÁNCER COMO ENFERMEDAD

Una vez finalizado el desarrollo del organismo, existe un tipo de células que son capaces de proliferar y participar así en la morfogénesis, permitiendo el mantenimiento de los tejidos a lo largo de toda la vida del mismo. Esta autonomía dada tiene por contra la utilización de la información genética que portan dichas células ya no hacia el mantenimiento y función del tejido normal del individuo sino en beneficio propio, hacia el crecimiento anormal (Weinberg, 2014).

Así pues, tal y como define Ruddon, R. (2007) el cáncer es una enfermedad propia de los organismos multicelulares que se caracteriza por un *“crecimiento anormal de células causado por múltiples cambios en la expresión de los genes, dando lugar a un desequilibrio en la proliferación y muerte celular que, en último lugar, evolucionará hacia una población de células las cuales serán capaces de invadir tejidos y metastatizar en sitios distantes, causando una significativa morbilidad y en ciertos casos, la muerte del huésped”*. A medida que el crecimiento canceroso progresa se da lugar a una heterogeneidad celular en, por ejemplo, la antigenicidad celular, potencial metastásico, invasividad, grado de diferenciación o respuesta a agentes quimioterapéuticos. Interesantemente, a nivel molecular los diferentes tipos de cáncer comparten aspectos en común, lo cual puede sugerir que, si bien no de forma intrínseca, las lesiones bioquímicas pueden estar producidas por alteraciones o redistribuciones de genes comunes, o por lo menos, similares.

Desde el punto de vista clínico, el cáncer son una serie de diferentes enfermedades que varían en función de la ratio de crecimiento, potencial metastásico, pronóstico, respuesta al tratamiento, etc. Sin embargo, haciendo una visión molecular y celular, estaría formado por un pequeño grupo de enfermedades que son causadas por defectos moleculares similares en la función de los genes generando unas alteraciones comunes en los genes de las células. Teniendo en cuenta las diferentes rutas por las cuales se puede alterar esta expresión de genes, se podría nombrar daños directos al DNA como la mutación génica o los mecanismos de translocación, amplificación o delección, así como la transcripción o traducción anormal de los genes. Estos mecanismos dan lugar a una desregulación en la replicación y muerte en una población de células, permitiendo así la expansión del tumor en el tejido (Ruddon R., 2007).

1.1.1. Las cifras del cáncer

Esta enfermedad configura una de las primeras causas de morbilidad del mundo y la segunda causa de mortalidad a nivel mundial, siendo responsable de un total de 9,6 millones de muertes en 2018 según la OMS (SEOM 2019). Además, desde el año 2000 ha pasado a ser la principal causa de muerte en hombres, superando a las enfermedades del aparato circulatorio (REDECAN). Si bien es cierto que esta alteración puede ser sufrida a cualquier edad, ha demostrado estar relacionada con el envejecimiento por lo que el aumento de las muertes debidas a cáncer se debe, en parte, a que las personas hoy en día tienen una vida lo suficientemente larga como para aviejar y tener esta enfermedad (Ruddon, 2007).

Entendiendo como **incidencia** el número de casos nuevos de una enfermedad en una población y un periodo de tiempo determinado, en 2012 (últimos datos disponibles a nivel mundial por los proyectos EUCAN y GLOBOCAN, de la OMS) se contabilizó alrededor de 14 millones de casos nuevos. De forma similar, para 2035 se espera una cifra cercana a 24 millones de nuevos casos mundiales (SEOM 2018). Así bien, en España, para 2019 se ha estimado un total de 277.234 nuevos casos, de los cuales 161.064 se darán en hombres y 116.170 en mujeres. Los cánceres más frecuentes, presentados por orden de importancia serían el de colon y recto (44.937 casos nuevos de los cuales 30.606 pertenecen a colon y 14.331 a recto), el de próstata (34.394), el de mama (32.536) y el de pulmón (29.503). Se muestra en la figura 1.

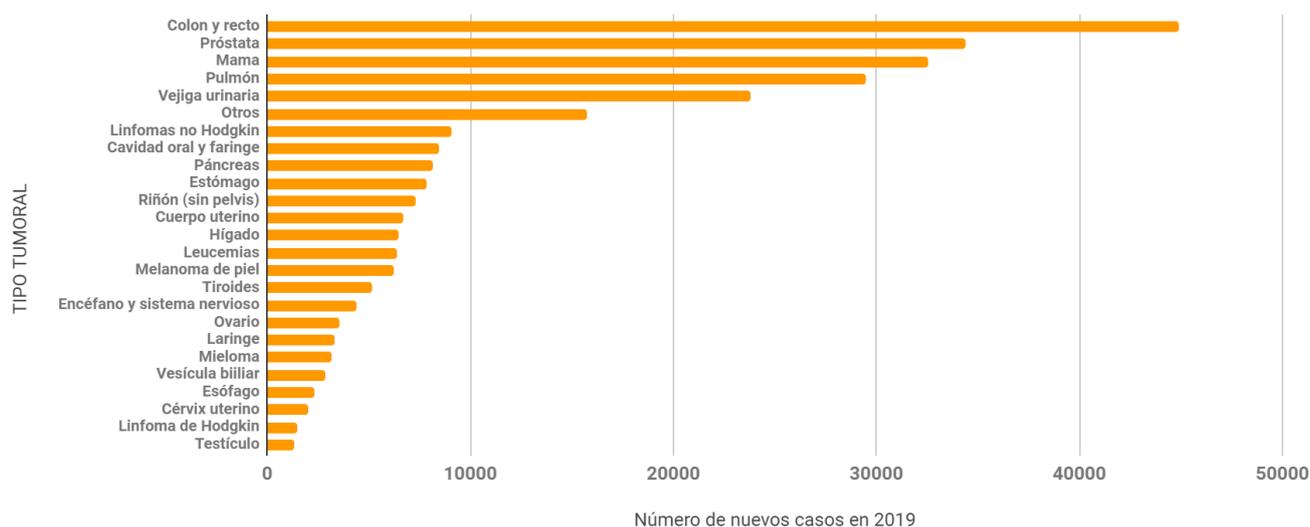


Figura 1. Estimación del número de nuevos casos de cáncer en España para el año 2019, según tipo tumoral (excluidos los tumores cutáneos no melanoma) (ambos sexos). Adaptada de Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

Desglosando por sexos, tal y como se observa en las figuras 2 y 3, los cánceres más comunes en hombres fueron el de próstata (34.394), colon y recto (26.746), pulmón (22.083) y vejiga urinaria (19.467) mientras que en mujeres lo fueron el de mama (32.536), colon y recto (11.191), pulmón (7.420) y cuerpo uterino (6.682), habiendo un aumento en el de pulmón respecto del de cuerpo uterino debido a un incremento en la tendencia del tabaquismo en las últimas décadas en el sexo femenino (REDECAN).

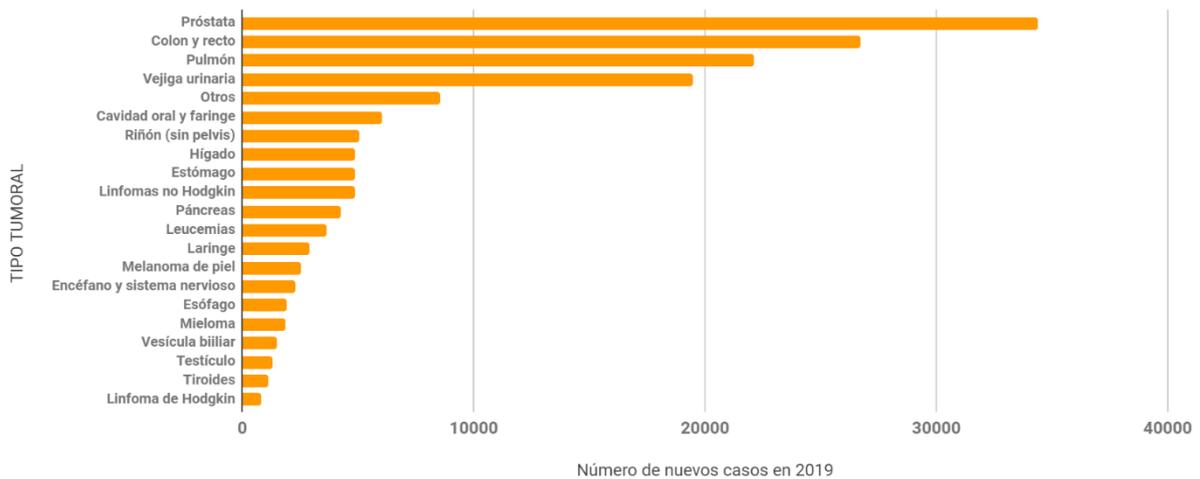


Figura 2. Estimación del número de nuevos casos de cáncer en varones en España para el año 2019 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma). Adaptada de Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

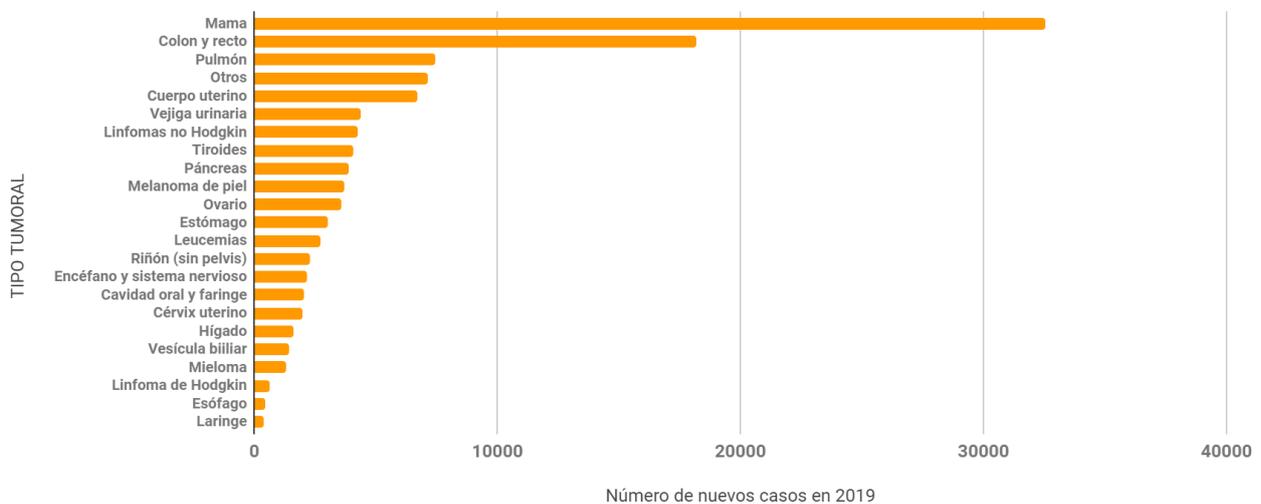


Figura 3. Estimación del número de nuevos casos de cáncer en mujeres en España para el año 2019 (excluidos los tumores cutáneos no melanoma). Obtenida de Red Española de Registros de Cáncer (REDECAN).

La **prevalencia** es la población que presenta la enfermedad en un periodo determinado, incluyendo a todas las personas vivas y diagnosticadas en el pasado, estén o no curadas. Esta se encuentra directamente relacionada con la supervivencia, por lo que cánceres que tengan menor supervivencia, también tendrán menor prevalencia y viceversa.

Así pues, para ilustrar esto último se hará servir la figura 4 que, a continuación, se explica. Puesto que la supervivencia condiciona la prevalencia, un cáncer que se diagnostique con mucha frecuencia, pero presente una mortalidad elevada, tendrá una menor prevalencia que un cáncer con

mucha frecuencia en su diagnóstico y baja mortalidad. Así pues, como ejemplos ilustrativos tomaremos el cáncer de pulmón, tumor frecuente (29.503 nuevos casos estimados al año en España en la población general en 2019) con una mortalidad muy alta (22.896 casos en 2018), lo que genera una prevalencia a los 5 años relativamente baja (28.833 pacientes). El cáncer de mama, sin embargo, si bien presenta una estimación de diagnóstico en 2019 de 32.536 pacientes nuevos, tiene una mortalidad mucho más baja, siendo en 2018 de 6.421 pacientes, por lo que su prevalencia a los 5 años será mucho mayor, del orden de 129.928.

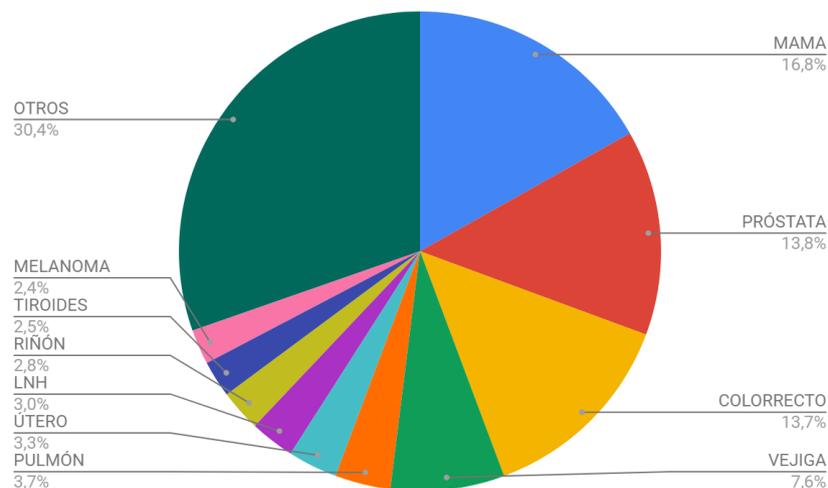


Figura 4. Estimación de la prevalencia de tumores en España para el año 2018 (población general) (prevalencia a los 5 años). Adaptada de GLOBOCAN 2018.

En referencia a la **mortalidad**, número de fallecimientos en un periodo de tiempo concreto y en una población determinada, se estima una cifra de 14 millones de muertes en 2035 (en contraposición a los 9,6 millones de muertes en 2018). Es pues, la segunda causa de muerte mundial. Particularmente en España, en 2017 un total de 113.266 muertes fueron debidas a tumores, resultando la predicción para 2035 en un aumento hasta las 156.898 muertes. Así pues, las muertes por cáncer lideran entre los grupos de edad de 1 a 14 años y de 40 a 79 años según el INE (SEOM 2018; SEOM 2019).

Mientras que las muertes por enfermedades del aparato circulatorio (conformantes de la primera causa de muerte en España) disminuyeron un 3,6%, las relacionadas con tumores aumentaron en un 1,4% en 2016. Los tumores con mayor número de fallecimientos en 2017 en la población general española fueron el cáncer de pulmón y el colorrectal, en varones se mantiene esta ordenación mientras que en mujeres el mayor causante de muerte es el cáncer de mama, seguido del de pulmón (SEOM 2018; SEOM 2019). Se muestra en la figura 5.



Figura 5. Fallecimientos por tumores en España para el año 2017, ambos sexos. Adaptada de SEOM 2019.

1.2. EL CÁNCER DE PIEL

El cáncer de piel es el más frecuente en el ser humano, aumentando su incidencia de forma exponencial mundialmente a lo largo de los últimos años y llegando a convertirse en la enfermedad maligna más común en la población blanca (Garllagher RP., 2005). Esta enfermedad de origen multifactorial presenta entre los agentes ambientales de riesgo de cáncer cutáneo la exposición solar y antecedentes a quemaduras solares (Alfaro-Sánchez A. et al., 2016).

Dentro del cáncer de piel, por diferencias epidemiológicas y pronósticas podemos distinguir dos categorías: no-melanoma y melanoma (Tejera-Vaquerizo A., 2016). En referencia al primer grupo, diferenciamos principalmente el carcinoma basocelular o BCC (cáncer más asiduo en el humano y más frecuente de piel siendo el 80% de este grupo, con un riesgo de padecerlo del 35 al 40% en caucásicos, siendo más propenso el hombre que la mujer) y el carcinoma cutáneo de células escamosas o cSCC (20% de los cánceres de piel no melanoma, con mayor incidencia sobre la raza blanca). Aunque existen otros tumores malignos en la piel como puede ser carcinomas de glándulas sebáceas, sudoríparas, sarcomas o manifestaciones en piel de neoplasias internas, sin embargo, son de extraña observación (Gutiérrez Vidrio R., 2003; Alfaro-Sánchez A. et al., 2016). En cuanto al melanoma maligno, si bien no es el cáncer de piel más común, sí que es el más letal, llegando a causar el 75% de las muertes por cáncer de piel además de presentar una elevada capacidad de metastatizar (Gutiérrez Vidrio R., 2003; Pinedo-Vega J.L., et al., 2014). Su incidencia se ha triplicado en la población blanca durante los últimos 20 años y presenta una incidencia de 5 a 18 veces menor en la población negra por comparación con la caucásica, teniendo los hispanos una incidencia de 3,5 a 4,5 veces menor dentro de esta (Alfaro-Sánchez A. et al., 2016). Es a su vez el cáncer de mayor progresión a nivel mundial, aumentando un 4,2% de 1992 a 2006 en Estados Unidos (Jemal A. et al., 2011).

1.3. CARCINOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS ESCAMOSAS (cSCC)

Los cánceres de piel no melanoma tienen importancia creciente por el aumento de su incidencia durante los últimos 50 años. El carcinoma cutáneo de células escamosas, particularmente, es el segundo cáncer más común en los caucásicos y se asocia con un sustancial riesgo de metástasis. Normalmente, se presenta como nódulos rosas y firmes con superficies hiperqueratósicas (Adam B., Glick y Stuart H. Yuspa).

1.3.1. Incidencia

El cSCC conlleva un peso económico creciente para el Sistema Nacional de Salud y por ello, se debe conocer la carga de enfermedad del mismo en España.

Según el metaanálisis de Tejera-Vaquero, A et al. (2016) la tasa de incidencia estandarizada a la población mundial fue de 13,38/100.000 personas al año, bastante menor que en otros países como Alemania o Eslovaquia. Mientras, la tasa de mortalidad de CCNM (carcinoma cutáneo no melanoma) realizada en el estudio español es de 1,10/100.000 personas al año y se encontraba causada principalmente por el cSCC, en concreto por el subgrupo de alto riesgo. Si bien no parecen unos datos alarmantes, Alam, M. & Ratner, D (2001) avisaron sobre aumento de la incidencia del 50 al 200 por cien en los últimos 10-30 años. Además, la incidencia se duplica por cada decrecimiento en 8 o 10 grados en la latitud geográfica, presentando el pico en el ecuador. La incidencia ajustada a nivel mundial pues, es de 100 a 150 personas por cada 100.000 al año, y la incidencia específica por edad entre las personas mayores de 75 años es aproximadamente 10 veces mayor que la tasa.

1.3.2. Etiología

La tabla 1 resume los factores de riesgo en la evolución de carcinoma de células escamosas:

TABLA 1. FACTORES DE RIESGO EN EL DESARROLLO DEL CARCINOMA CUTÁNEO DE CÉLULAS ESCAMOSAS. ADAPTADA DE ALAM, M., & RATNER, D., 2001

Exposición a radiación ultravioleta
Ultravioleta A
Ultravioleta B
Terapia con methoxsalen y radiación ultravioleta A
Exposición a radiación ionizante
Genodermatosis
Albinismo oculocutáneo
Xeroderma pigmentoso
Infección con el virus del papiloma humano, especialmente tipos 6, 11, 16 y 18
Exposición a químicos carcinógenos
Arsénico
Hidrocarburos aromáticos policíclicos
Inmunosupresión
Trasplante de órganos
Leucemia y linfoma
Medicación inmunosupresora
Piel enferma o dañada crónicamente
Ulceras
Tracto sinusal
Osteomielitis
Dermatitis por radiación
Ciertos desórdenes inflamatorios crónicos como epidermólisis bullosa distrófica
Lesiones precursoras
Queratosis actínica
Queratosis arsénica
Queratosis inducidas por radiación
Enfermedad de Bowen (carcinoma celular escamoso in situ)
Eritroplasia de Queyrat (carcinoma escamoso celular in situ del pene)

La exposición por radiación ultravioleta es la causa más común de este tipo de cánceres, siendo la mayor responsable la radiación ultravioleta B (longitud de onda de 290 a 320 nm) aunque apoyada por la radiación ultravioleta A (longitud de onda de 320 a 400 nm). Normalmente se producen mutaciones en el DNA por la formación de dímeros de timidina en el supresor tumoral p53 que no se pueden reparar y desembocan en la formación del tumor (Preston, D. S., & Stern, R. S., 1992; Grossman D. & Leffell DJ., 1997).

Se ha de tener en cuenta diversos factores, por ejemplo, que durante los últimos años la sociedad ha modificado ciertas conductas, entre las cuales encontramos la exposición solar por voluntad propia y su relación con quemaduras en la piel. También la exposición ultravioleta ocupacional: se ha visto que el riesgo a cSCC aumenta tres veces en personas que han nacido en áreas que reciben mayor cantidad de radiación ultravioleta por el sol. A su vez, el riesgo aumenta de tres a cinco veces en personas con piel y ojos claros, así como rubios o pelirrojos (Alam, M., & Ratner, D. 2001).

Por su parte las radiaciones ionizantes tienen un riesgo relacionado con el cSCC directamente proporcional a la dosis acumulada de dicha radiación, encontrando rayos X, así como gamma o grenz (Zackheim, H. S. et al., 1964).

En personas que presenten genodermatosis como albinismo oculocutáneo, el cSCC puede desarrollarse por falta de pigmento protector. Además, las personas con xeroderma pigmentoso no podrán reparar las mutaciones en el DNA inducidas por radiación ultravioleta, lo cual desencadena en un aumento de la probabilidad de sufrir cSCC (Kraemer KH. et al., 1988).

Otros de los factores de riesgo son el virus del papiloma humano, sobre todo los tipos 6, 11, 16 y 18 (McGregor, J. M., & Proby, C. M., 1996) y los agentes químicos como es el caso del arsénico, utilizado en medicaciones en el pasado, el cual estimula la invasión del tumor y el carcinoma in situ (Johnson, T. M. et al., 1992). Los hidrocarburos policíclicos derivados de la combustión y destilación de compuestos de carbón pueden causar también cSCC.

Las personas que han recibido un trasplante de órganos, son más propensas a sufrir este tipo de cáncer por el uso de medicamentos inmunosupresores, así como las condiciones que llevan a un estado inmunocomprometido (Kwa, R. E. et al., 1992; Jensen, P. et al., 1999; Dantal, J. et al., 1999). Además, en contraste con la población en general, son más propensos a presentar un carcinoma de células escamosas a un carcinoma de células basales (Alam, M., & Ratner, D. 2001).

El carcinoma cutáneo de células escamosas es más probable en personas que presentan piel crónica lesionada o enferma, por ejemplo, afectados por úlceras, tracto sinusal, osteomielitis, dermatitis, etc. Por último, pacientes con desórdenes inflamatorios crónicos como epidermolisis bullosa distrófica, estarán más predispuestos a desarrollar tumores de este estilo (Alam, M., & Ratner, D. 2001).

1.3.3. De piel sana a carcinoma

La queratosis actínica (AKs) es una neoplasia escamosa cutánea benigna que aparece normalmente en pieles expuestas al sol y que suele progresar hacia el carcinoma cutáneo de células escamosas (cSCC) (Boukamp, P, 2005) No todas las lesiones AKs progresan hacia cSCC pero se ha observado que el 97% de los carcinomas de células escamosas están asociados a queratosis actínicas contiguas (Hurwitz, R. M., & Monger, L. E., 1995). Para entender la progresión de AK a cSCC, se toma el modelo multietapa de carcinogénesis por el cual, mutaciones en un gen (normalmente un supresor tumoral) llevan al desarrollo de una lesión precursora con incremento de la inestabilidad genética o pérdida del control del ciclo celular además de mutaciones en otros oncogenes. Todos estos factores permiten la aparición de propiedades neoplásicas, llevando a la invasión del carcinoma (Fearon, E. R., & Vogelstein, B., 1990). Una de las mutaciones más comunes en la transición AK-cSCC, es la de p53 (Nakazawa, H. et al., 1994). Se muestra la probabilidad de que un paciente con múltiples AKs desarrolle cSCC o metástasis en la figura 6.

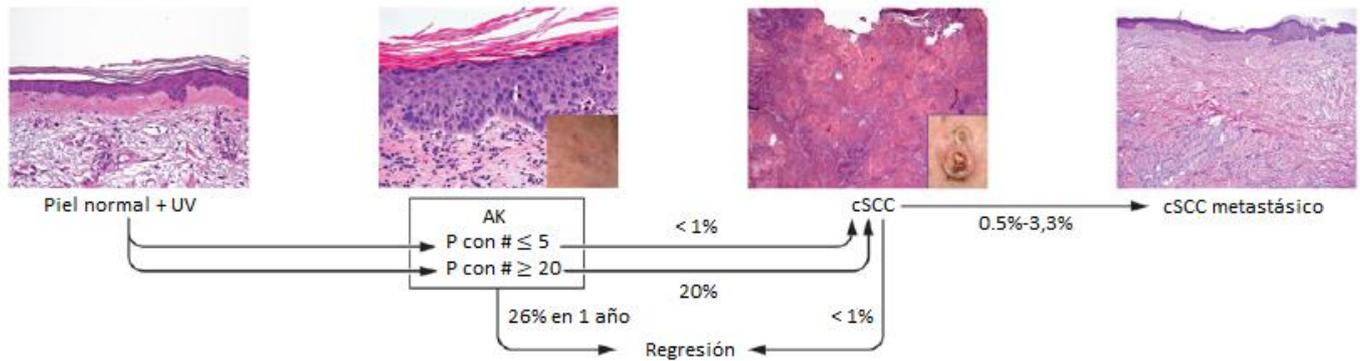


Figura 6. Probabilidad de que las lesiones neoplásicas cutáneas humanas progresen a carcinoma invasivo. Se muestra la probabilidad de AK en pacientes con menos de 5 o más de 20 lesiones (#) que progresan a cSCC. Figura adaptada de Ratushny, V. et al., 2012.

La progresión hasta cSCC es un proceso gradual con estados diferenciados patológicamente a lo largo de la evolución: elastosis severa solar (SE), queratosis actínica (AK) y cSCC (Boukamp, P., 2005; Krouse, R. S. et al., 2009). Las elastosis severas muestran las primeras características patológicas de pieles dañadas por el sol, la degeneración del colágeno de la dermis (Corbalan-Velez, R. et al., 2010; Barzilai, A. et al., 2007). Dentro de la queratosis actínica encontramos diferentes categorías en función del grado de displasia, siendo estas la neoplasia intraepidérmica queratinocítica I (KIN I), KIN II y KIN III. KIN I se caracteriza por atipia celular de queratinocitos en el tercio inferior de la epidermis. KIN II por queratinocitos atípicos en los dos tercios inferiores de la epidermis y KIN III queratinocitos atípicos alrededor de toda la epidermis, siendo equivalente al carcinoma in situ (Cockerell, C. J., 2000). Así como los grados KIN informan sobre las características macroscópicas y microscópicas de AKs, la identificación de las anomalías genéticas y moleculares asociadas a las lesiones permiten saber más de su patogénesis (Ratushny, V. et al., 2012) (Figura 7). Aproximadamente el 10% de los casos de AK evolucionarán a cSCC y el 5% de los casos de cSCC metastatizan (Cockerell, C. J., 2000; Alam, M., & Ratner, D., 2001).

Resulta importante mencionar que, a su vez, el cSCC se encuentra diferenciado a su vez en dos subgrupos SCC I, ligeramente diferenciado de AK y SCC II cuya lesión está mucho más acusada (Krouse, R. S. et al., 2009).

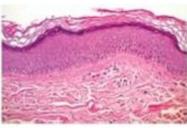
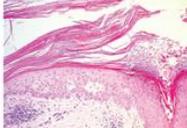
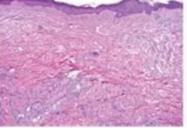
	Piel normal	AK	cSCC	cSCC metastásico
Descripción clínica		 Mácula o pápula rosa o con piel escamosa	 Pápula persistente o escamosa o nódulo rojo que puede sangrar espontáneamente	 Lesiones nodulares múltiples en piel u órganos internos.
Histopatología				
Descripción histopatológica	Estrato basal, espinoso y granuloso bien definido con escala ortoqueratósica	Queratinocitos atípicos agrandados confinados a la epidermis con escala paraqueratósica.	Queratinocitos atípicos agrandados que invaden la dermis.	Queratinocitos atípicos agrandados en la dermis, ganglios linfáticos u órganos internos, típicamente sin conexión epidérmica
Aumento de la señalización (activación, sobreexpresión, o amplificación)		ras Fyn/SFKs bcl-2	ras Fyn/SFKs c-myc bcl-2 STAT-3 β-1 integrin MMP	Además de las alteraciones en cSCC: VEGF (ras) MMP2 MMP7 MMP12 (ras)
Disminución de la señalización (desactivación, represión transcripcional o traduccional, o eliminación de genes)		p53 Srcasm	p53 Srcasm Notch (p53) PKC 6 E-cadherin	Además de las alteraciones en cSCC: E-cadherin P-cadherin
Cambios genómicos		Inestabilidad con pocas alteraciones	Aumenta la inestabilidad con traslocaciones, deleciones de genes, amplificaciones, etc.	

Figura 7. Comparación clínica, histológica y molecular de AKs, cSCC y cSCC metastásico. Se muestran las características clínicas, histológicas y moleculares comunes de la neoplasia cutánea humana. Figura adaptada de Ratushny, V. et al., 2012.

1.4. microRNA

Los microRNA (miRNA) son RNA de 17 a 25 nucleótidos aproximadamente, altamente conservados, de cadena simple y no codificantes. Su función se basa en la regulación de genes ya que controlan la expresión de estos a nivel post-transcripcional por interacción específica con su mRNA objetivo; así pues, los miRNA en relación con su mRNA complementario pueden llevar a cabo la represión translacional del mismo o su escisión y posterior degradación. (Aigner, A., 2011; Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J., 2006). La elección entre reprimir o degradar cierto mRNA parece estar determinada por el grado de complementariedad en número de pares de bases entre el miRNA y su mRNA objetivo (Ruddon R., 2007). Los miRNA pueden estar en diversos contextos genómicos como es el caso de regiones de RNA no codificantes intergénicas e intragénicas en intrones o entre los exones del gen (Rupaimoole, R. et al., 2016).

1.4.1. Biogénesis de los miRNA

La transcripción del miRNA se da en el núcleo, donde la RNA polimerasa II (pol II) genera unas secuencias de algunos cientos de pares de bases de largo conocidas como pri-miRNAs o miRNAs primarios. Estas secuencias son procesadas por la enzima RNasa III DROSHA, y la proteína Pasha/DGCR8 obteniendo como resultado unas secuencias bastante más cortas, alrededor de 60-70 nucleótidos, de doble hebra en forma de horquilla, los pre-miRNAs (Lee, Y., et al., 2003). A continuación, los pre-miRNAs son transportados hasta el citoplasma gracias a la GTPasa RAN o exportina-5 (XPO5) donde son procesados por un complejo formado por la endonucleasa RNasa III Dicer y TARBP2, proteína de unión, y produciendo RNAs de doble cadena de aproximadamente 22 nucleótidos, que en sus extremos en 3' tienen un sobrante de dos nucleótidos. El proceso de maduración se ayuda de las endonucleasas Argonautas AGO (Ago1 y Ago2), ya que permiten que una de las cadenas del dúplex de RNA permanezca como miRNA y por consiguiente se descarte la otra. El proceso de selección de la cadena que permanece como miRNA maduro se basa en la estabilidad termodinámica relativa de los extremos de las cadenas, siendo la cadena conservada aquella que presenta menor estabilidad en los nucleótidos del extremo 5'. Ago1 y Ago2, a su vez, se unen a TARBP2 y Dicer formando el complejo de silenciamiento miRISC. Los miRNAs que son internalizados en este complejo son ya capaces de unirse a su mRNA diana guiando así a miRISC a las secuencias diana a través de la unión a sitios complementarios imperfectos dentro de las regiones 3' no traducidas del mRNA. La unión a miRISC lleva, dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y el mRNA a la degradación o inhibición de este último (Figura 8) (Aigner, A., 2011; Kim Y. et al., 2016; Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J., 2006).

Se ha de tener en cuenta la secuencia semilla *-seed sequence* en inglés- (nucleótidos 2 a 8 en el extremo 3'), altamente conservada desde gusanos hasta humanos, crucial para la especificidad del miRNA ya que dictan la regulación. Se hacen, por tanto, evidentes dos hechos: un mismo miRNA va a poder regular diferentes genes -incluyendo factores de transcripción, receptores o transportadores- (Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J., 2006) y un mismo gen podrá estar regulado por diversos miRNA. Este hecho incrementa sustancialmente la complejidad del proceso post-transcripcional (Aigner, A., 2011).

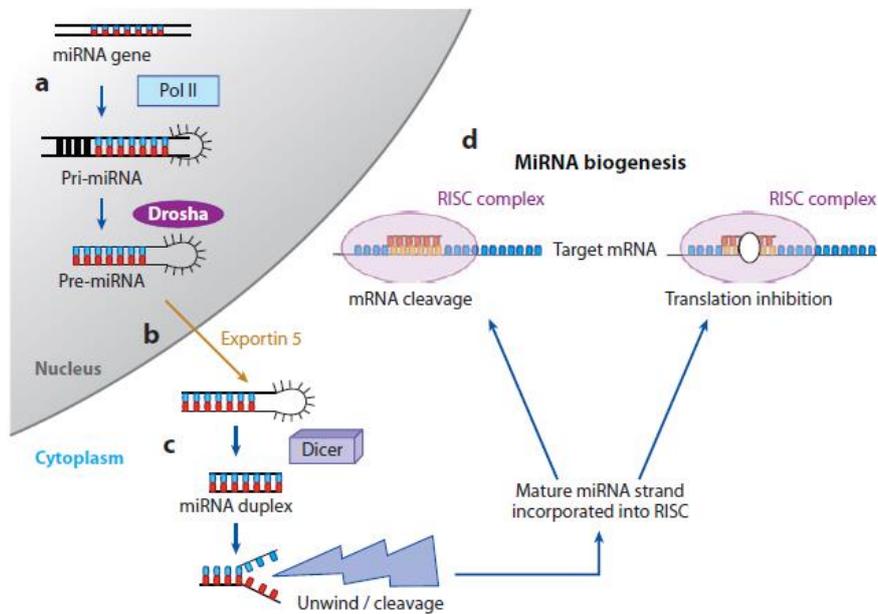


Figura 8. Biogénesis de los microRNA. (a) Los miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II (pol II) en largos transcritos primarios de miRNA, de tamaño variable (pri-miRNA) los cuales son reconocidos y escindidos en el núcleo por la enzima RNasa III DROSHA, generando unos precursores en forma de horquilla, conocidos como pre-miRNA. (b) Los pre-miRNA se exportan desde el núcleo hasta el citoplasma gracias a la exportina 5 y se procesan por la enzima RNasa DICER (c), la cual da lugar a unos dúplex de 19-24 nt. Sólo una de las cadenas de los dúplex de miRNA (miRNA maduros) se incorporan al complejo proteico RISC (RNA-induced silencing complex). (d) El miRNA maduro lleva a RISC a romper el mRNA o inducir la represión de la traducción, dependiendo del grado de complementariedad entre el miRNA y su objetivo. Figura reproducida de Garzon, R., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2009).

Si bien la biogénesis de miRNA es un proceso altamente regulado, se da en ciertas ocasiones desregulaciones por alteraciones, incluyendo DROSHA, DICER y Ago2, que desembocan en ciertos procesos patológicos, incluyendo los cancerígenos. (Rupaimoole, R., et al. 2016; López-Camarillo, C., & Marchat, L. A., 2013).

1.4.2. miRNA en el cáncer

En las últimas décadas se ha llevado a cabo un profundo estudio en la taxonomía molecular del DNA, observándose que alrededor de 22.000 transcritos codificantes de proteína son mRNAs, y que estos pueden clasificar los cánceres (Lu, J., et al., 2005). A su vez, una incipiente importancia nació en torno a los miRNA: la expresión aberrante de los mismos está relacionada con la progresión de

numerosas enfermedades, incluido el cáncer (Visone, R., & Croce, C. M., 2009). En términos de este último, los miRNA pueden presentar funciones tan distantes como la supresión del tumor u oncogenes, por lo que un cambio en los niveles de expresión de los miRNA puede dar lugar a ciertos tipos de cáncer. Esto está apoyado por el hecho de que alrededor del 50% de los miRNAs de humanos que se han anotado se encuentran en zonas del genoma relacionadas con el cáncer o en sitios frágiles (Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J., 2006; Zhong, X., et al., 2012). Numerosos estudios llevados a cabo con la tecnología microarray han demostrado que, en el cáncer, la expresión aberrante de miRNA es más una regla que una excepción, encontrando ejemplos en diferentes tipos de cánceres como el cáncer de mama, de colon, próstata o tiroides (Reddy, K. B., 2015). Además, por regla general hay mayor tendencia por la regulación a la baja de miRNAs en cánceres respecto de la alta, por lo que se postula que tal vez los miRNAs sean predominantemente supresores tumorales antes que oncogenes (Zhong, X. et al., 2012).

Los mecanismos por los cuales los miRNAs pueden llegar a desregularse son diversos, pero a continuación se tratará de dar una visión global sobre algunos de los mismos:

1. **Alteraciones genéticas y SNPs:** los miRNAs se encuentran localizados en su mayoría en sitios frágiles, puntos de quiebre de translocación específicos de cáncer, secuencias repetitivas o islas CpG (Russo, F., et al., 2010). A su vez, la presencia de SNPs o polimorfismos de un solo nucleótido han demostrado tener influencia en los objetivos de los miRNAs en las vías relacionadas con el cáncer. Se dan así dos posibles fenómenos: por un lado, se puede ganar una función debida al SNP que mejore la interacción con el objetivo del miRNA y por tanto su función reguladora, siendo así un supresor del tumor o, por el contrario, el SNP resulte en una pérdida de función y se exprese ese miRNA en mayor proporción, actuando como oncogen. Además, los SNPs en sitios objetivo de miRNA pueden resultar en el escape de la degradación por miRNA (Reddy, K. B., 2015).
2. **Regulación epigenética de la expresión de miRNAs:** la hiper e hipometilación presentan un papel importante en la influencia de la actividad de los genes de miRNA ya que estos, sobre todo los que se encuentran localizados cerca de las islas CpG, suelen estar más afectados por los mecanismos de metilación (Reddy, K. B., 2015). Por otro lado, en las líneas celulares la inhibición de DNMTs da lugar a la desmetilación del DNA, lo cual lleva a la expresión reactivada de ciertos miRNAs (Baer, C., et al., 2013).
3. **Defectos en las vías de biogénesis de miRNA:** ya nombrado anteriormente, la desregulación de DROSHA y DICER, enzimas involucradas en la biogénesis de miRNA, tienen un papel claro en el cáncer, pues generan defectos en el procesamiento de los miRNA.

1.4.3. Significado de la desregulación de los miRNA

A lo largo de diversos estudios se ha observado que la expresión alterada de miRNA contribuye a la tumorigénesis, ya sea por regulación de un oncogen como de un gen de supresión tumoral (Visone, R., & Croce, C. M., 2009). La primera vez que se observó este hecho fue con la sobreexpresión de miR-155, relacionada con diferentes tipos de linfomas, como el de Hodgkin (Eis, P. S. et al., 2005).

Además, estos miRNA pueden modular la expresión de proteínas relacionadas con el ciclo celular, que regulan directamente la vida o muerte de las células. Como ejemplo encontramos miR221/22, sobreexpresados en muchos tumores, cuyos objetivos son las proteínas p27 y p57,

reguladores negativos del ciclo celular que se unen al complejo Cdk/ciclina inhibiendo el cambio de fase G1/S (Visone, R. et al., 2007; Fornari F. et al., 2008). A su vez, también existe miRNA regulados a la baja que controlan el ciclo celular por reducción de los niveles de ciclina y/o Cdk.

Finalmente, muchos miRNA han sido relacionados con las etapas tardías de tumorigénesis, progresión y metástasis. Entre ellos, encontramos miR-21 y miR-10b. Por ejemplo, miR-21 funciona como oncogen contribuyendo al proceso de tumorigénesis por la regulación del gen supresor tumoral TMP1, involucrado en la migración celular. Adicionalmente, ciertos estudios aseguran que la supresión de miR-21 en ciertos cánceres, disminuye la invasión y metástasis (Visone, R., & Croce, C. M., 2009).

1.4.4. miRNA en el carcinoma cutáneo de células escamosas (cSCC)

Si bien se sabe que los miRNA juegan un rol muy importante en los procesos mencionados anteriormente, se ha observado que particularmente en el caso de cSCC existe ciertos tipos de miRNA que también se encuentran desregulados, al alza o a la baja. Esto hace de los miRNA una interesante herramienta diagnóstica y terapéutica a investigar. En las tablas 3 y 4 se mencionan diversos miRNA desregulados que se encuentran en la literatura.

<i>miRNA infraexpresado</i>	<i>Función</i>	<i>Referencia</i>
MiR-1.	Inhíbe la proliferación e incrementa la apoptosis en líneas celulares de cSCC.	Fleming, J. L. et al., 2013
MiR-34	Media la acción de p53 en la detención del crecimiento, senescencia y apoptosis, así como la transición epitelio-mesenquimal	Lefort K, Brooks Y, Ostano P et al., 2013; Yu, X., & Li, Z., 2016)
MiR-124/214	regulan proteínas quinasas activadas por mitógeno, ERK1 y ERK2, las cuales median la proliferación celular anormal en CCE.	Yamane K., et al. 2013
MiR-125b	Suprime la proliferación, formación de colonias, migración y capacidad invasiva de las cSCC <i>in vitro</i> , siendo su objetivo MMP13 (matriz metalopeptidasa 13)	Xu N. et al., 2012
MiR-193b/365a	Inhíbe carcinogénesis por represión de KRAS y MAX	Gastaldi C. et al., 2014; Yu, X., & Li, Z., 2016
MiR199a	Inhíbe la proliferación y migración de las células de cSCC por unión a CD44 y regula la interacción CD44-Ezrin	Wang SH. et al., 2014
MiR-361-5p	Reprime la expresión de VEGFA	Kanitz A. et al., 2012
MiR-483-3p	Pro-apoptótico, uniéndose a diferentes genes anti-apoptóticos como API5 o RAN	Bertero T. et al., 2013
MiR-497	Induce la reversión del proceso MET (transición epitelio-mesenquimal) siendo SERPINE-1 su objetivo	Mizrahi, A. et al., 2017

Tabla 2. Representación de ciertos miRNA infraexpresados según la literatura actual en cSCC. Se muestra su función habitual y la referencia.

<i>miRNA sobreexpresado</i>	<i>Función habitual</i>	<i>Referencia</i>
MiR-205.	Reprime SHIP2 por ser su objetivo (SHIP2 induce apoptosis)	Yu J. et al., 2008
MiR-21	Indispensable para la migración de queratinocitos y reepitelización de la piel durante el saneamiento de heridas cutáneas	Bertero T. et al., 2011
MiR-31	Regula la motilidad celular y la capacidad de formación de colonias de las células tumorales	Wang A, et al., 2014
MiR-365	Siendo su objetivo NFIB puede funcionar en la represión de la transformación carcinogénica en los tejidos normales de la piel, mediar la detención de G1 y la siguiente apoptosis en células de CSCC malignas.	Zhou M. et al., 2014

Tabla 3. Representación de ciertos miRNA sobreexpresados según la literatura actual en cSCC. Se muestra su función habitual y la referencia.

2. OBJETIVO

Se cree que además de las diferencias clínicas, anatómicas o histopatológicas entre los diferentes estadios en la progresión del carcinoma escamoso de piel (cSCC), debe haber también diferencias a nivel transcriptómico, concretamente a nivel de microRNAs (miRNAs). La identificación de estos miRNAs diferencialmente expresados en función del grado de diferenciación del tumor puede tener interesante valor pronóstico o predictivo.

El objetivo principal del presente proyecto es definir un perfil de expresión de los miRNAs y analizar las diferencias transcriptómicas de los mismos para correlacionar las diferencias observadas entre las distintas fases en la progresión del cSCC. Este resultado se obtendrá a partir de los datos generados con la plataforma de HTG EdgeSeq mediante el panel Whole Transcriptome Assay (WTA) a partir de muestras de pacientes con diferentes estadios de cSCC teniendo en cuenta factores como podrían ser su tiempo de evolución, localización, clasificación o tipo de exposición solar. A su vez, el análisis diferencial de datos se realizará con el lenguaje de programación R, teniendo un enfoque estadístico éste. Se espera encontrar diferentes miRNAs expresados en función del grado de progresión del tumor lo cual nos ayudará a entender las diferencias que existen en los estadios mencionados.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Se detallan los materiales y métodos a continuación, entendiendo por materiales las muestras utilizadas y el criterio de selección de pacientes y, por métodos, la plataforma HTG EdgeSeq así como

el secuenciador utilizado y los modelos estadísticos de los cuales se ha hecho uso para interpretar los resultados.

3.1. Características de los pacientes incluidos en el estudio

El estudio se llevó a cabo con muestras de 24 pacientes del Biobanco del Instituto Valenciano de Oncología (Biobanco IVO), haciendo uso de muestras de tejido fijado con formalina y embebido en parafina, también conocido como FFPE en diversos pacientes que presentaban carcinoma escamoso de piel en diferentes estadios de su progresión y distintas localizaciones. Los pacientes fueron comunicados del propósito del estudio y firmaron un consentimiento informado. Las características de los pacientes se encuentran recogidas en la tabla 4 y se citan a continuación. La edad mediana fue de 75,5 años (con rango 45-93). El sexo predominante fue el masculino con 21 pacientes (91,3 %) y la mediana del tamaño del tumor estuvo en 25 mm (con rango 10-300) con un tiempo de evolución de 5 meses (con rango 2-50) y una velocidad de crecimiento mediana del mismo de 6 mm/mes (con rango 1,7-16,7).

En referencia al estadio mostrado por los pacientes, 5 de ellos (20,83 %) presentaban queratosis actínica (control), 10 de ellos (41,67 %) carcinoma inicialmente invasivo, 6 (25 %) carcinoma de alto riesgo no metastásico y 3 (12,5 %) carcinoma metastásico. Según el estadio clínico al diagnóstico (TNM, siendo tumor-nodo-metástasis), se determinó un total de 3 casos (13,04 %) en los que se presentaba invasión tumoral del maxilar, mandíbula, órbita o hueso temporal y metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral al tumor de 3 cm o menos en su mayor dimensión, sin haber metástasis a distancia (T3N1M0). En cuanto al grado de diferenciación, 7 pacientes (29,17 %) presentaban un tumor bien diferenciado. La localización predominante corresponde al cuero cabelludo, con un total de 8 muestras (33,33 %), aunque se tiene en cuenta que 5 del total de 8 casos corresponden a queratosis actínica.

También se hace referencia en la tabla 5 a las características anatomopatológicas. Se muestra pues el intervalo libre de progresión (ILP), entendiéndose por el mismo el rango de tiempo que transcurre desde el momento de la cirugía hasta el momento de la recaída o de la última revisión. La mediana del ILP correspondiente a aquellos pacientes que presentan una recaída es de 10,7 meses con un rango de 3-19,7 meses. Otro parámetro al que se hace referencia, ya mencionado con anterioridad, es la velocidad de progresión del tumor, pues se ha visto que aquellos tumores que han progresado más rápido en menos tiempo tienen un peor factor tanto pronóstico como de supervivencia. La mediana de la velocidad de crecimiento corresponde a 6 mm/mes. La progresión nos muestra si el paciente progresa hacia una recaída o si no lo hace. En este sentido el 37,5 % de los pacientes, es decir, un total de 9 pacientes muestra recaída. En cuanto a la supervivencia global (SG), tiempo transcurrido desde la cirugía hasta el fallecimiento o la última revisión, se presenta una mediana de 21,2 meses con un rango de 6,1-39,7 meses. Finalmente, en referencia a los exitus, se muestra si el paciente fallece o no. El 33,33 % de los pacientes fallece, es decir, 8 del total de 24. Todos los datos mostrados en la tabla, correspondientes a supervivencia global y periodo libre de progresión están actualizados a fecha de 3 de junio del presente año.

A continuación, se citan las características de cada uno de los grados en el estado TNM al momento del diagnóstico:

- T1N0M0: se refiere al carcinoma de menos de 2 cm en su diámetro mayor de extensión con menos de dos factores de riesgo (T), sin existencia de metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N) ni metástasis a distancia (M).

- T2N0M0: se refiere al carcinoma de más de 2 cm en su diámetro mayor o tumor de cualquier tamaño con más de dos factores de riesgo (T) sin metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N), ni metástasis a distancia (M).
- T3N0M0: se presenta invasión tumoral del maxilar, mandíbula, órbita o hueso temporal (T). No existen metástasis en los ganglios linfáticos regionales (N) o metástasis a distancia (M).
- T3N1M0: existe invasión tumoral del maxilar, mandíbula, órbita o hueso temporal (T), así como metástasis en un único ganglio linfático ipsilateral al tumor de 3 cm o menos en su mayor dimensión (N) pero sin metástasis a distancia (M)

Variables		N	%	Mediana	Rango (mín-máx)
Sexo	Masculino	21	91,30	-	-
	Femenino	3	13,04	-	-
Edad (años)		24	-	75,5	45-93
Tiempo de evolución (meses)*		19	-	5	2-50
Tamaño del tumor (mm)*		19	-	25	10-300
Velocidad de crecimiento (mm/mes) *		24	-	6	1.7-16.7
Supervivencia (meses) **		-	-	21,2	6.1-39.7
Grado de diferenciación	G1 bien diferenciado	7	29,17	-	-
	G2 moderadamente diferenciado	9	37,50	-	-
	G3 pobremente diferenciado	3	12,50	-	-
	KIN	5	20,83	-	-
Estado TNM en el diagnóstico *	T1N0M0	6	26,09	-	-
	T2N0M0	4	17,39	-	-
	T3N0M0	5	21,74	-	-
	T3N1M0	3	13,04	-	-
Clasificación de riesgo	Queratosis actínica	5	20,83	-	-
	Carcinoma inicialmente invasivo	10	41,67	-	-
	Carcinoma de alto riesgo no metastásico	6	25,00	-	-
	Carcinoma metastásico	3	12,50	-	-
Localización	Frente	2	8,33	-	-
	Cuero cabelludo	8	33,33	-	-
	Canto interno	1	4,17	-	-
	Mejilla derecha	2	8,33	-	-
	Tórax	1	4,17	-	-
	Malar izquierdo	1	4,17	-	-
	Sien derecha	4	16,67	-	-
	Sien izquierda	2	8,33	-	-
	Labio inferior	2	8,33	-	-
Vulva	1	4,17	-	-	
Exitus	No	16	66,67	-	-
	Sí	8	33,33	-	-

Tabla 4. Tabla resumen de las características propias de los pacientes recogidos en el estudio. Se muestra en cada variable el subtotal de pacientes tenidos en cuenta (N). * se tiene en cuenta tan sólo a los pacientes que presentan tumor. ** se tiene en cuenta tan sólo a los pacientes que sufren una recaída

Nº PACIENTE	MUESTRA	ILP (meses) *	PROGRESIÓN *	SG **	EXITUS **	Velocidad de crecimiento (mm/meses) ***
1	CEP1	3	Sí	6,1	Sí	7,5
2	CEP2	15,2	Sí	Actualidad	No	7,5
3	CEP6	Actualidad	No	Actualidad	No	16,7
4	CEP10	Actualidad	No	Actualidad	No	6,3
5	CEP12	6,3	Sí	7,8	Sí	17,5
6	CEP20	10,7	Sí	22,7	Sí	6,0
7	CEP21	Actualidad	No	Actualidad	No	10,0
8	CEP16	13,3	Sí	15,7	Sí	5,0
9	CEP17	Actualidad	No	Actualidad	No	16,3
10	CEP14	Actualidad	No	Actualidad	No	-
11	CEP22	Actualidad	No	Actualidad	No	-
12	CEP13	Actualidad	No	Actualidad	No	-
13	CEP8	Actualidad	No	Actualidad	No	-
14	CEP23	Actualidad	No	Actualidad	No	-
15	CEP11	19,7	Sí	19,7	Sí	3,3
16	CEP9	23,3	Sí	23,3	Sí	1,0
17	CEP5	Actualidad	No	Actualidad	No	11,7
18	CEP15	Actualidad	No	Actualidad	No	4,0
19	CEP7	8,3	Sí	39,7	Sí	4,2
20	CEP19	Actualidad	No	Actualidad	No	4,0
21	CEP24	10	Sí	24,0	Sí	4,0
22	CEP18	Actualidad	No	Actualidad	No	4,0
23	CEP4	Actualidad	No	Actualidad	No	1,7
24	CEP3	Actualidad	No	Actualidad	No	6,3
Mediana		10,7	-	21,2	-	6,0
Rango (mín-máx)		3-19.7	-	6.1-39.7	-	1-17.5
Porcentaje		-	37,5	-	33,3	-

Tabla 5. Presentación de las características anatomopatológicas de los pacientes incluidos en el estudio. Se muestra para cada paciente su correspondiente numeración en la muestra, sus propios ILP y SG así como la posibilidad de que el paciente presente una recaída posterior a la extirpación del tumor (progresión) e incluso su muerte (exitus). A la hora de calcular los correspondientes datos para la mediana, el rango y el porcentaje: * se tiene en cuenta tan sólo a aquellos pacientes que presentan una recaída; ** se tiene en cuenta tan sólo a aquellos pacientes que fallecen; *** se tiene en cuenta tan sólo a aquellos pacientes que presentan un tumor.

3.2. Muestras

Para muestras de tejido parafinado procedente de una biopsia tumoral (FFPE), HTG EdgeSeq con uso del panel WTA precisa 5 µm de sección. Para llevar a cabo el protocolo, es necesario un área mínima de 12,5 mm² de tejido tumoral en un portaobjetos en el cual haya presente un mínimo de un 80% de células tumorales. Además de este cristal, se necesita otro con una tinción de Hematoxilina-

Eosina (H&E), sobre el cual un especialista en anatomía patológica habrá estudiado la muestra para definir la zona con mayor porcentaje de células tumorales. Esta zona será marcada y medida con una regla para así calcular el área. La función de este cristal teñido es simplemente hacer de guía para la obtención de la muestra en el cristal sin tinción a partir de una cuchilla. Como control se hace uso de ARN total de cerebro humano (human brain total RNA (Thermofisher®)). Dicho control se dispone por triplicado a partir del mismo lisado para así comprobar la reproducibilidad del aparato.

3.3. HTG EdgeSeq, Whole Transcriptome Assay

El sistema HTG EdgeSeq (HTG Molecular Diagnostics, Inc., Tucson, AZ) se basa en una plataforma automatizada que, junto con la secuenciación de próxima generación (NGS) permite la preparación de librerías a partir de un reducido tamaño de muestra y evitando, además, el proceso de extracción.

La totalidad del proceso, desde la manipulación de la muestra hasta la obtención de la librería, dura aproximadamente 36 horas, siendo el tiempo de mano de obra de 3 a 4 horas. Esta tecnología reduce la cantidad de muestra necesaria y disminuye los sesgos asociados a la extracción y manipulación del material, así como la pérdida de muestra, obteniendo como resultado un análisis rápido, fiable y reproducible. Además, la tecnología HTG EdgeSeq genera una biblioteca de perfiles moleculares para la detección mediante la secuenciación de la próxima generación (NGS). NGS proporciona sensibilidad y rango dinámico mejorados para los ensayos HTG EdgeSeq (HTG Molecular, nd).

En función de la finalidad del ensayo se hace uso de diferentes paneles, que analizan la expresión de diversos genes. En este caso, se hizo uso del panel WTA (Whole Transcriptome Assay) por el cual se llega a medir la expresión de 2.083 transcritos de miRNA humano, simultánea y cuantitativamente. En este ensayo se utiliza muestras de tejido parafinado, aunque el sistema es igualmente compatible con biofluidos y líneas celulares, pudiendo obtener un perfil de miRNA circulante a partir de 15 µl de plasma o suero. Se ha de tener en cuenta que su uso se limita a la investigación, nunca se utilizará para fines diagnósticos (HTG Molecular, nd). Este análisis se realiza mediante la detección cuantitativa de la expresión de 2.083 transcritos de miRNA humanos utilizando la química qNPA (quantitative Nuclease-Protection Assay) para capturar los transcritos expresados. A continuación se muestra los fundamentos del sistema en la figura 9.



Figura 9. Esquema de flujo de trabajo del sistema HTG EdgeSeq. (A) En primer lugar se prepara la muestra (~4 h), para luego, **(B-C)** realizar la librería (~22 h). **(D)** Tras ello, se cuantifican y los datos se normalizan (~1-3 h) para **(E)** llevar a cabo la secuenciación NGS (~6-10 h). **(F)** El proceso finaliza con el análisis de datos (~15-30 min). Obtenido de HTG Molecular Diagnostics, Inc.

3.3.1. Procesado de las muestras FFPE

En primer lugar, se obtienen las muestras de los tejidos FFPE. Para ello, se comparan los dos cristales del mismo paciente a fin de que el teñido con H&E sirva de guía para rascar en la zona con mayor porcentaje tumoral que, como se ha explicado, ha sido señalada previamente por un patólogo. Una vez se ha rascado con el bisturí parte del tejido, se introduce en un tubo eppendorf, preparado y rotulado previamente. Es de suma importancia minimizar la pérdida de muestra: por la tapa del tubo, por las paredes, fuera del mismo tubo, etc. ya que es una capa de 5 μm y por lo tanto, es muy ligera. Para ello se retira con cuidado cualquier exceso que haya podido quedar en el bisturí, paredes o tapa fácilmente con una punta de pipeta. Si fuera necesario rascar diferentes secciones de muestra, todas ellas han de depositarse en el mismo tubo. Al acabar, el bisturí se deposita en contenedores de riesgo biológico.

Antes de pasar a la siguiente muestra, se ha de medir el área rascada en mm^2 para poder calcular qué cantidad de reactivos (tampón de lisis y proteinasa K) se han de añadir posteriormente, al acabar de rascar las muestras. El volumen del tampón de lisis viene especificado en el kit de HTG (*HTG EdgeSeq Sample Prep Pack*) y corresponde a 35 μl por cada 12,5 mm^2 de muestra; mientras que la proteinasa K se encuentra en relación 1:20 con el tampón de lisis. Es decir, por cada 12,5 mm^2 de muestra, se corresponde 1,75 μl de proteinasa K.

Una vez las muestras han sido rascadas y se encuentran en los correspondientes tubos, se añade el tampón de lisis en la proporción calculada. A continuación, se añade a cada muestra 500 μl de aceite de desnaturalización para evitar el evaporado de estas en la incubación. De modo que, tras añadir el aceite de desnaturalización, sin previo vórtex se centrifugan las muestras 1 minuto a máxima velocidad para una correcta separación de las fases: la fase de abajo sería una fase acuosa formada por el tampón de lisis y la muestra de interés mientras que en la fase de arriba se espera haber disuelto la parafina y retirado otros componentes orgánicos, además de encontrar el aceite desnaturalizante protegiendo de la evaporación. Se incuba, sin agitación, durante 20 minutos a 95°C. Al acabar, se enfría a temperatura ambiente 10 minutos y se añade en la fase inferior la cantidad de proteinasa K calculada a la muestra, mezclando cuidadosamente con la pipeta. Tras ello se incuban las muestras durante 3 horas a 50°C agitando. Durante este tiempo la proteinasa K elimina restos de proteínas que puedan interferir en el análisis.

Mientras las muestras se están incubando, se introduce la placa correspondiente al WTA en el sistema de HTG y se prepara el material necesario. Se necesita: una placa donde se introducen las muestras (*Sample Plate*), otra placa donde se recoge las muestras después del proceso (*Stop o Stop Plate*), el pack de reactivos y los consumibles, que son puntas que utilizará la máquina durante el ensayo.

3.3.2. Procesador HTG EdgeSeq

El procesador HTG EdgeSeq se encarga de seleccionar los miRNA de interés y fabricar una genoteca que será posteriormente secuenciada. La fabricación de esta genoteca se da por la sustitución de cada uno de los transcritos por sondas sintéticas. El proceso, altamente automatizado,

carece de paso de extracción y se compone de un ensayo de protección por nucleasas (qNPA) y posterior preparación de la genoteca de los miRNA de interés para la secuenciación. Desde que se introduce la placa hasta que se obtiene el resultado, dura aproximadamente 20 horas, teniendo en cuenta pequeñas diferencias en función del número de muestras. El proceso es detallado a continuación.

3.3.2.1. Ensayo de protección por nucleasas (qNPA)

La tecnología de protección por nucleasas (qNPA) es utilizada para la identificación y medida de la expresión génica de los miRNAs de interés.

A partir de los lisados de las muestras que se han obtenido previamente, se dispensa un volumen de 25 µL de cada uno en los pocillos de una placa de 96 pocillos (*Sample Plate*). La *Sample Plate* se coloca en el procesador HTG EdgeSeq junto con los reactivos proporcionados por HTG (*HTG EdgeSeq Reagent Pack*) (aceite de desnaturalización, sondas de protección para el panel WTA, solución de digestión y solución básica) y las puntas, para así realizar el ensayo qNPA. Tanto la *Sample Plate* como los reactivos tienen un código de barras propio que, una vez escaneado, facilita su trazabilidad.

El proceso comienza con la adición del aceite de desnaturalización para asegurar la protección de las muestras y así evitar que estas se evaporen. A continuación, se añaden las sondas de protección para la nucleasa. Las sondas de protección están configuradas por 50 nucleótidos complementarios a cada uno de los transcritos del panel WTA. A su vez están flanqueadas por unos cebadores universales (*wings*) de 25 nucleótidos cada uno. Se añaden los oligonucleótidos *wingman*, cebadores reversos complementarios a *wings* (figura 10, a) a fin de llevar a cabo la formación del heterodúplex y proteger el miRNA diana así como *wings* de la digestión con la nucleasa S1. En este momento el calor prepara y permite la hibridación de las sondas al miRNA. Tras esta hibridación, se añade la nucleasa S1, la cual degrada las sondas y el miRNA que no se haya hibridado (figura 10, b). La reacción enzimática es retenida por la solución de parada o *stop* y por el calor, inactivando la nucleasa S1 y eliminando el miRNA hibridado, así como los cebadores *wingman*, dejando únicamente las sondas de protección junto con los cebadores *wings*, correspondientes al miRNA diana expresado (figura 10, c).

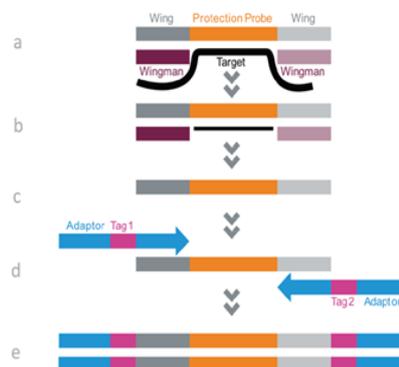


Figura 10. Fundamento de la tecnología HTG EdgeSeq. a. Hibridación de las sondas protegidas al miRNA. **b.** Degradación de los ácidos nucleicos sobrantes. **c.** Eliminación del miRNA **d.** Amplificación del material con primers específicos marcados con códigos de barras. **e.** Resultado final. Obtenido de HTG Molecular Diagnostics, Inc.

3.3.2.2. Fabricación de la genoteca: etiquetado y adaptadores.

Una vez llevado a cabo la qNPA se procede a trabajar en la *Stop plate*, placa de 96 pocillos en la cual el procesador HTG EdgeSeq ha dispensado el resultado de la qNPA. Se recuerda que el resultado de la qNPA son las sondas protegidas obtenidas y denominadas por el mismo sistema. A continuación, se deja atemperar con el fin de obtener la librería de sondas (figura 9, A-C).

Mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se llevará a cabo la amplificación del material, haciendo uso de una pareja de *primers* (*forward* y *reverse*) específicos, es decir, con un código de barras único (*barcode*) para cada individuo, además de adaptadores para la unión de la sonda y un fragmento complementario para la secuencia de los protectores (*wings*). Como control negativo se hace uso de blancos de la PCR. Esto se consigue mediante la preparación de la placa donde, cada columna marcada con un número del 1 al 12 corresponde a un *forward* específico y cada fila con letras de la A a la H a un *reverse* específico. Así se obtiene una placa en la que cada muestra colocada en un pocillo obtendrá una combinación diferente. Por lo tanto, en primer lugar, se prepara el mix de reacción, para lo cual se pipetea 150 μ l de NEB OneTaq® HotStart 2X Master Mix GC buffer, más 60 μ l de *molecular grade water* y 30 μ l del *primer forward*. Dado que hay 12 *primers forward*, se prepara un máximo de 12 mix de reacción. Seguido al mix de reacción, se añade 24 μ l de éste junto con 3 μ l de la muestra de la qNPA a la placa de reacción de PCR (columnas 1-12). Finalmente, se añaden 3 μ l de los 8 tipos de *primer reverse* (A-H). En cada pocillo se pipetea un total de 30 μ L..

La PCR se corre según se indica en el protocolo proporcionado por HTG EdgeSeq:

```
95°C for 4 minutes
16 - 20 cycles of:
  o 95°C - 15 sec
  o 56°C - 45 sec
  o 68°C - 45 sec
  o 68°C for 10 minutes
Hold @ 4°C
```

Figura 11. Esquema del ciclo de PCR para la amplificación del material. Se indica el rango de ciclos, temperaturas y tiempos correspondientes para llevar a cabo una correcta amplificación del material. En el presente ensayo se realizan un total de 20 ciclos.

Una vez se ha realizado la amplificación del material, se procede a purificar la genoteca con el fin de eliminar el exceso de *primers* y contaminantes y realizar una PCR cuantitativa (qPCR) de forma que se podrá determinar la concentración de sondas en cada paciente. Para ello, se purifica haciendo uso de perlas magnéticas con el Kit *Agencourt AMPure XP beads* (Beckman Coulter). Se transfieren 15 μ l de cada producto de la PCR a una placa nueva, se añaden 37,5 μ l de bolas magnéticas por cada pocillo y se incuba en el agitador a 1800 rpm y a temperatura ambiente durante 5 minutos. Tras esto, se coloca la placa sobre un soporte magnético durante 3 minutos para recoger las bolas magnéticas que formarán un pellet visible. Se retira el sobrenadante sin remover el pellet que es lo que nos

interesa, ya que en este se encuentran las bolas magnéticas pegadas a las sondas por afinidad. Seguidamente se realizan dos lavados con 200 μ L de etanol al 80%, se retira la placa del soporte magnético y se deja secar a temperatura ambiente durante aproximadamente 5 minutos. Cuando se ha secado, se añaden 40 μ L de tampón TE 1x, con pH 8, y se agita de nuevo a 1800 rpm durante 5 minutos más y al acabar, se vuelve a colocar sobre un soporte magnético para separar de nuevo las bolas magnéticas, transfiriendo 30 μ L de sobrenadante, el cual contiene la muestra de interés purificada, de cada pocillo a una nueva placa.

Se procede tras la recuperación del sobrenadante a la normalización de las muestras como se cita a continuación.

3.3.2.3. Cuantificación y normalización: HTG software

La tecnología MiSeq (Illumina) precisa de 20 pM de concentración. Por ello, se hace necesario conocer la concentración de cada una de las muestras. Este proceso se lleva a cabo mediante *ABI 7500 Fast Real-Time PCR System* haciendo uso del *KAPA Library Quant Kit (Illumina) Universal qPCR Mix*.

Para ello se realizan dos diluciones seriadas 1:100 tal que la primera:

- Se añade 297 μ L 10 mM Tris/0,05% Tween a cada pocillo de la placa de dilución 1:100
- A continuación, se añade 3 μ L de la librería purificada obtenida en el paso anterior a cada uno de los pocillos
- Se procede a mezclar con una pipeta de 200 μ L

La segunda dilución 1:100 se obtiene a partir de la primera dilución para obtener una dilución final 1:10.000, ya que la qPCR trabaja a dicha dilución. Se tiene en cuenta posteriormente que cualquier concentración obtenida deberá ser multiplicada por 10.000.

Acto seguido, se prepara la mezcla de la qPCR para lo cual se adiciona:

- MasterMix 2X: 10 μ L
- Primers 10X: 2 μ L
- ROX (Ref. pasiva) 0,4 μ L
- H₂O: 3,6 μ L
- Volumen a calcular de muestra:
 - o Muestra de pacientes
 - o Estándar (STD). Se hace uso de 6 STD siendo estos 20, 2, 0.2, 0.02, 0.002 y 0.0002 pM

Se utilizan los estándares por triplicado, así como dos blancos: uno de la PCR (control negativo de la amplificación) y otro de la qPCR (control negativo de la cuantificación).

Realizada la cuantificación se normaliza la genoteca para asegurar que todas las muestras presentan una concentración homogénea de entrada al secuenciador. Para ello, se introduce el Excel obtenido en la cuantificación en el *HTG EdgeSeq Library Calculator*, el cual nos devuelve la cantidad de muestra a añadir a la librería. Llegados a este punto, se juntan en un mismo pocillo, gracias a que cada paciente ha sido marcado, previamente en la PCR, con un código de barras específico.

3.3.3. Secuenciación con MiSeq System (Illumina) y ensamblaje de lecturas

El análisis de la secuencia de las muestras se realizará con la plataforma de Illumina MiSeq, después de haber obtenido la librería con el HTG.

Para la reacción de secuenciación es necesario preparar un control de DNA para verificar el resultado. Para ello, se descongela PhiX 10 nM del kit de reactivos de Illumina y se diluye a 4nM combinando 2 µl de la solución anterior con 3 µl de TE (Tris-HCl pH 8.0 + EDTA). Seguidamente, se prepara una disolución de 0,2 N de NaOH mediante dilución de 2,0 N NaOH con H₂O. A continuación, se combinan 5 µl de cada reactivo en un nuevo tubo agitando en un vórtex y centrifugando a 280g durante un minuto. Después, se deja reposar a temperatura ambiente durante 5 minutos para conseguir una completa desnaturalización de la librería. El siguiente paso consiste en añadir 5 µl de TE repitiendo el vórtex y el centrifugado. Como resultado, se obtiene un control de DNA a una concentración de 20 pM.

Seguidamente se desnaturaliza la librería siguiendo las especificaciones de Illumina. Se añade 2,0 N NaOH en función del volumen total, se homogeneiza con un vórtex y centrifuga 1 minuto a 280g. Tras esto se mantiene a temperatura ambiente durante 8 minutos para una correcta desnaturalización de la librería. Después, se añade el tampón HT1 y, finalmente, se pipetea el mismo volumen de 2,0 N HCl que el añadido previamente de NaOH.

Una vez preparada la librería, se le añaden 24 µl del control PhiX. Obtenemos un volumen final de 600 µl, por lo que el porcentaje de control en la muestra es de un 4%, parámetro necesario para verificar si la secuenciación se ha realizado correctamente. Cuando la solución de secuenciación está completa, se realiza una desnaturalización térmica durante 4 minutos a 98°C y se enfría de manera inmediata en hielo durante 5 minutos. Finalmente, se cargan los 600 µl de librería desnaturalizada al cartucho de secuenciación y se introducen en el secuenciador de MiSeq®. Para este tipo de análisis se necesita un mínimo de 500.000 lecturas por cada muestra.

El secuenciador MiSeq® de Illumina utiliza tecnología de secuenciación por síntesis (SBS), que utiliza la amplificación clonal in vitro por medio de una PCR en puente.

Finalizada la secuenciación se obtienen archivos FASTQ los cuales se cargan en el software analizador de datos HTG EdgeSeq, el *HTG Parser Software*. El sistema de HTG EdgeSeq es capaz de generar perfiles cuantitativos de la expresión a partir del FASTQ y de la hoja de registros de las muestras generada por el sistema donde se encuentran las secuencias de los transcritos analizados. Así, los archivos FASTQ se alinean con estas secuencias mediante el sistema Bowtie2, incorporado en la plataforma HTG, el cual es un alineador de secuencias. Así, mediante el alineamiento de secuencias se lleva a cabo un conteo de los transcritos expresados y se acaba generando una tabla final en la cual se muestra el número de transcritos expresados para cada miRNA analizado en cada paciente.

Este sistema es una herramienta sencilla y poco compleja que nos permite tener análisis de expresión en poco tiempo.

3.3.4. Análisis de datos

Mediante el análisis estadístico de los resultados se pretende determinar cuáles son los miRNAs diferencialmente expresados en los diferentes estadios de la progresión en el carcinoma escamoso de la piel. Para el mismo, se hace uso de R, lenguaje de programación para enfoques estadísticos.

A fin de conocer los diferentes *clusters* de miRNAs agrupados espacial y diferencialmente en las muestras se realiza un análisis de componentes principales (PCA).

El análisis de la expresión diferencial fue realizado en R mediante el paquete *DESeq2* de *Bioconductor*. Este paquete nos permite observar las diferencias de expresión génica significativas a partir de una matriz de datos k_{ij} (siendo i una fila para cada gen y j una columna para cada muestra) a la cual se le aplica una distribución negativa binomial. Para normalizar los datos se hace uso de una *median-transformation*. *DESeq2* realiza una estimación de la dispersión a partir de la cual se conocen diferencias en la expresión. La significatividad se obtiene por el test *Wald*, con el p-valor ajustado por Benjamini y Hochberg. Se asume que el *logfoldchange* entre las muestras comparadas para la expresión es cero (hipótesis nula) y se consideran significativos los datos con p-valores ajustados menores que 0,01 ($<0,01$).

El *clustering* es realizado aplicando la Distancia Manhattan, por el cual se aplica un algoritmo de agrupamiento jerárquico estándar a los datos de expresión de los diferentes pacientes, corrigiendo el sesgo de las lecturas. Se observan *heat maps* para su representación gráfica.

4. RESULTADO Y DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS

4.1. Secuenciación de los perfiles de expresión

A partir de la secuenciación por la plataforma HTG EdgeSeq (HTG Molecular Diagnostics, Inc., Tucson, AZ) y MiSeq System (Illumina) se obtiene un listado con los transcritos disponibles en el panel WTA y el número de veces que aparecía por cada paciente. Haciendo uso de este listado se procede al análisis estadístico.

4.2. Análisis descriptivo

4.2.1. Análisis de componentes principales

Se realiza un análisis de componentes principales (PCA) a fin de observar cuáles son los genes más representativos para cada clase de estadio en la progresión del cSCC. Estos genes se agrupan en *clusters* en función de su relación y permitiendo separar los estadios en relación a su expresión génica. Teniendo en cuenta el fundamento de la técnica, la mayor parte de viabilidad debe estar explicada por la primera componente principal (PC1) para que el PCA realmente sea fiable. En la figura 12 se muestra el gráfico de calidad correspondiente a tal afirmación.

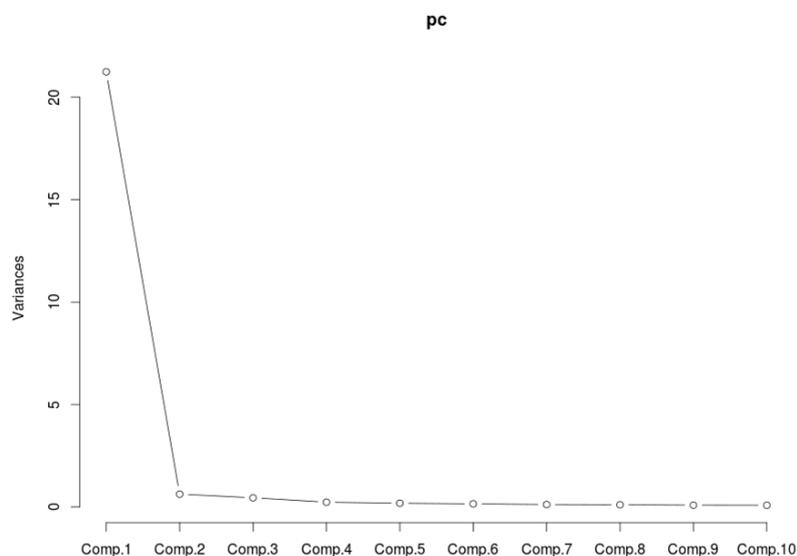


Figura 12. Gráfico de calidad del PCA. Se muestra la varianza (eje Y) explicada por cada una de las diferentes componentes principales (eje X) siendo la primera componente principal la que explica la mayoría de la varianza del ensayo.

Los resultados nos muestran diferencias significativas entre la queratosis actínica (lesión premaligna) y el resto de estadios (carcinoma inicialmente invasivo, carcinoma de alto riesgo no metastásico y carcinoma metastásico). Entre estos últimos no se muestran diferencias significativas en el análisis de componentes principales, debido a que no se pueden formar *clusters* evidentes. Se referencian estos resultados en la figura 13.

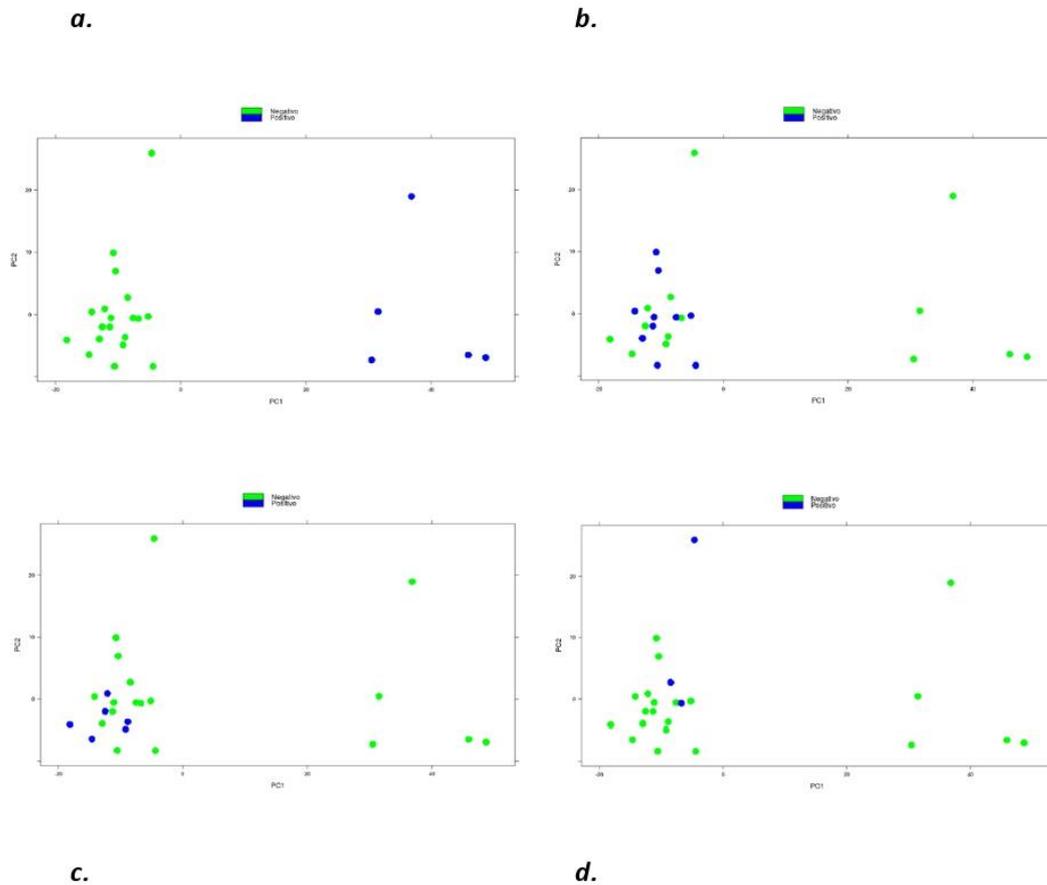


Figura 13. Análisis de componentes principales de la matriz de expresión para los 24 pacientes analizados. a. En azul los pacientes con queratosis actínica frente al resto de etapas en verde. **b.** En azul el carcinoma inicialmente invasivo frente al resto de etapas en verde. **c.** En azul el carcinoma de alto riesgo no metastásico frente al resto de etapas en verde. **d.** En azul el carcinoma metastásico frente al resto de etapas en verde. Tan sólo en el caso de la queratosis actínica se observa la formación de un cluster claramente diferenciado y específico.

Puesto que la queratosis actínica es una lesión pre-maligna o benigna al cSCC, sus características anatomopatológicas difieren del resto de manifestaciones -tanto que no muestra ningún tipo de dificultad en ser reconocida y diferenciada por los dermatólogos-, por lo que es evidente que en el PCA se va a observar un *cluster* propio, diferenciado de las fases de cSCC (que sí que muestran más características comunes entre sí). Tal y como se mencionará más adelante, así como por los resultados observados en el PCA, las diferencias observadas entre la queratosis actínica y el resto de estadios, da lugar a un sesgo muy acusado en los resultados de la expresión diferencial.

Para minimizar este sesgo se realiza un estudio paralelo eliminando las muestras correspondientes a la queratosis actínica y se observan los resultados. En el caso del PCA, se siguen sin observar diferencias significativas entre el carcinoma inicialmente invasivo, el carcinoma de alto riesgo no metastásico y el carcinoma metastásico, tal y como se observa en la figura 14. A continuación se prosigue a mostrar y discutir los resultados procedentes del análisis excluyente de AK por ser más representativos.

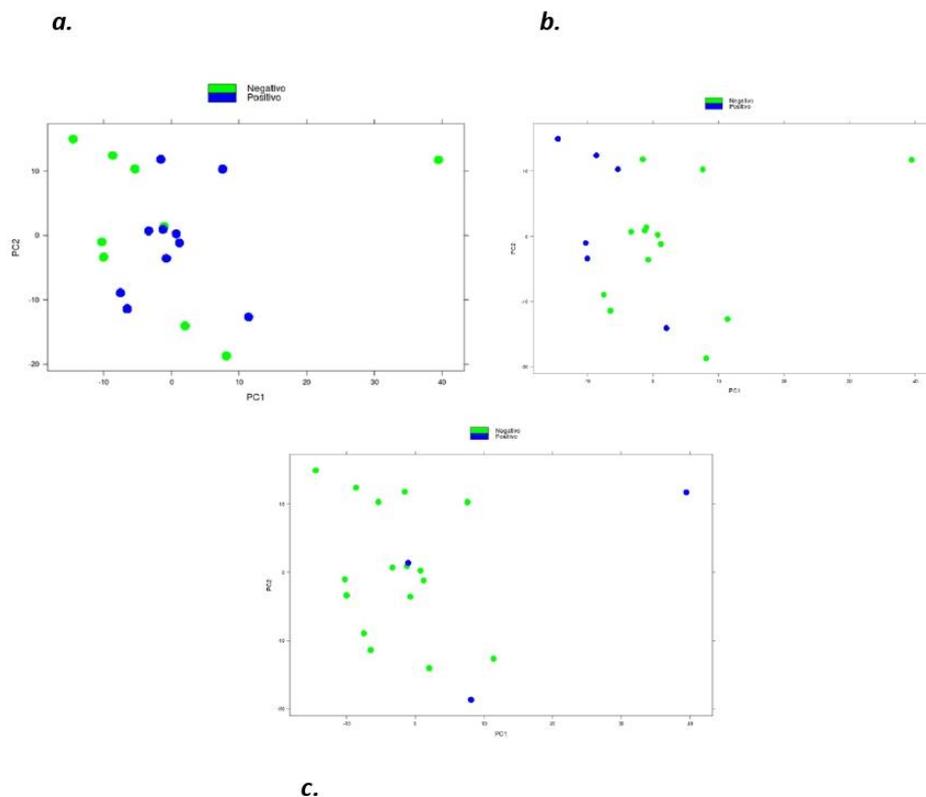


Figura 14. Análisis de componentes principales de la matriz de expresión eliminando los 5 pacientes que presentaban queratosis actínica. a. En azul el carcinoma inicialmente invasivo frente al resto de etapas en verde. **b.** En azul el carcinoma de alto riesgo no metastásico frente al resto de etapas en verde. **c.** En azul el carcinoma metastásico frente al resto de etapas en verde. No se observa la formación de clusters diferenciados y específicos para ningún estadio.

4.2.2. Agrupamiento jerárquico y análisis de la expresión

Con el fin de buscar los patrones de expresión característicos de cada fase y observar las diferencias entre los diferentes estadios de la progresión de cSCC se realizó un agrupamiento jerárquico por clustering no supervisado con los datos de los pacientes. Se tiene la exclusión de los pacientes con queratosis actínica en las muestras, contando con un total de las mismas de N=19. Encontraremos dos tipos de casos: el estadio analizado en azul y el resto de manifestaciones en rojo. La representación gráfica por *heat maps* se muestra en las figuras 15-17. Tal y como se puede observar

en la agrupación jerárquica del análisis no supervisado de los casos, no existe discriminación entre los diferentes grupos y por tanto no se puede inferir en una agrupación jerárquica clara, lo cual se correlaciona con los resultados obtenidos en el PCA, concretamente con la no formación de clusters específicos para cada manifestación.

Tal y como se muestra en la tabla 6, al incorporar AK en el análisis diferencial, se observa como la misma presenta un total de 1860 miRNA diferencialmente expresados, número muy elevado, mientras que carcinoma metastásico no presenta ninguno. Al pensar que este hecho puede distorsionar los datos, se decidió llevar a cabo un estudio paralelo sin tener en cuenta AK, como ya se ha mencionado, siendo este último el que se muestra a lo largo de la discusión de los datos. En este contexto, el sesgo introducido por AK desapareció y se obtienen un total de 0 miRNAs diferencialmente expresados en carcinoma inicialmente invasivo, 46 en carcinoma de alto riesgo no metastásico y 3 en carcinoma metastásico. Los miRNAs diferencialmente expresados en cada estadio de cSCC (excluyendo AK en el análisis) se adjuntan en el anexo I.

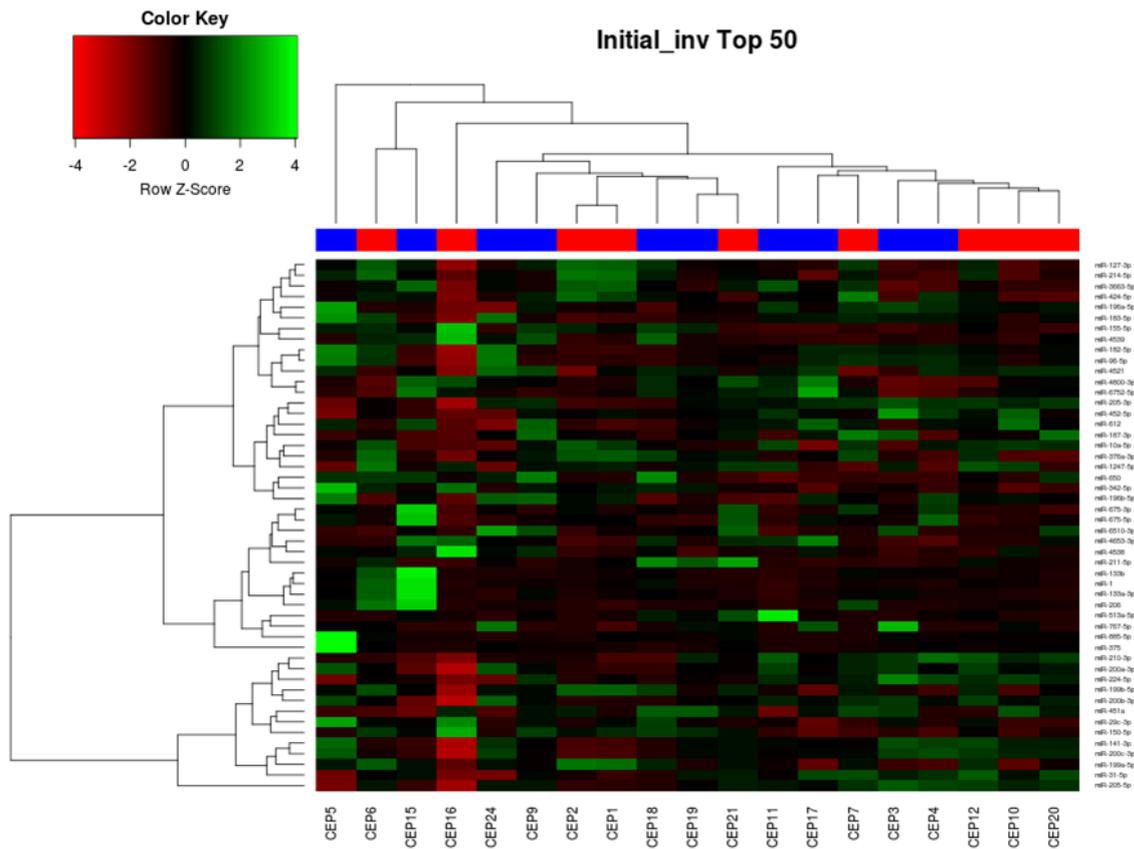


Figura 15. Gráfico heat map de pacientes con carcinoma inicialmente invasivo frente a los pacientes con el resto de fases en la progresión teniendo en cuenta los 50 genes más relevantes sin tener en cuenta AK. Los pacientes con carcinoma inicialmente (N=9) invasivo aparecen en azul mientras que el resto de pacientes (N=10) aparecen en rojo. Las columnas corresponden a cada una de las muestras analizadas (N=19) y las filas al nivel de expresión normalizado de cada miRNA analizado. El rojo indica sobreexpresión mientras que el verde indica subexpresión.

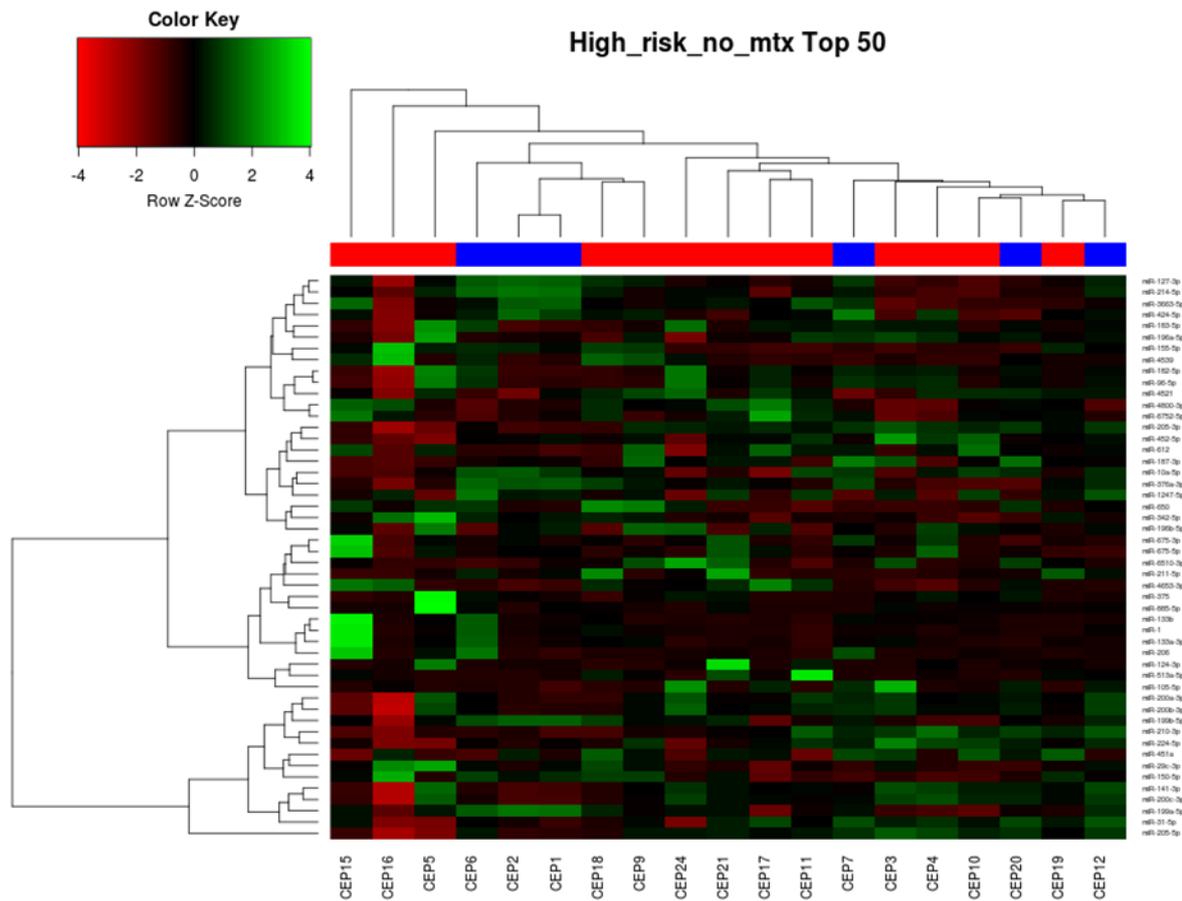


Figura 16. Gráfico heat map de pacientes con carcinoma de alto riesgo no metastásico frente a los pacientes con el resto de fases en la progresión teniendo en cuenta los 50 genes más relevantes sin tener en cuenta AK. Los pacientes con carcinoma de alto riesgo no metastásico (N=6) aparecen en azul mientras que el resto de pacientes (N=13) aparecen en rojo. Las columnas corresponden a cada una de las muestras analizadas (N=19) y las filas al nivel de expresión normalizado de cada miRNA analizado. El rojo indica sobreexpresión mientras que el verde indica subexpresión.

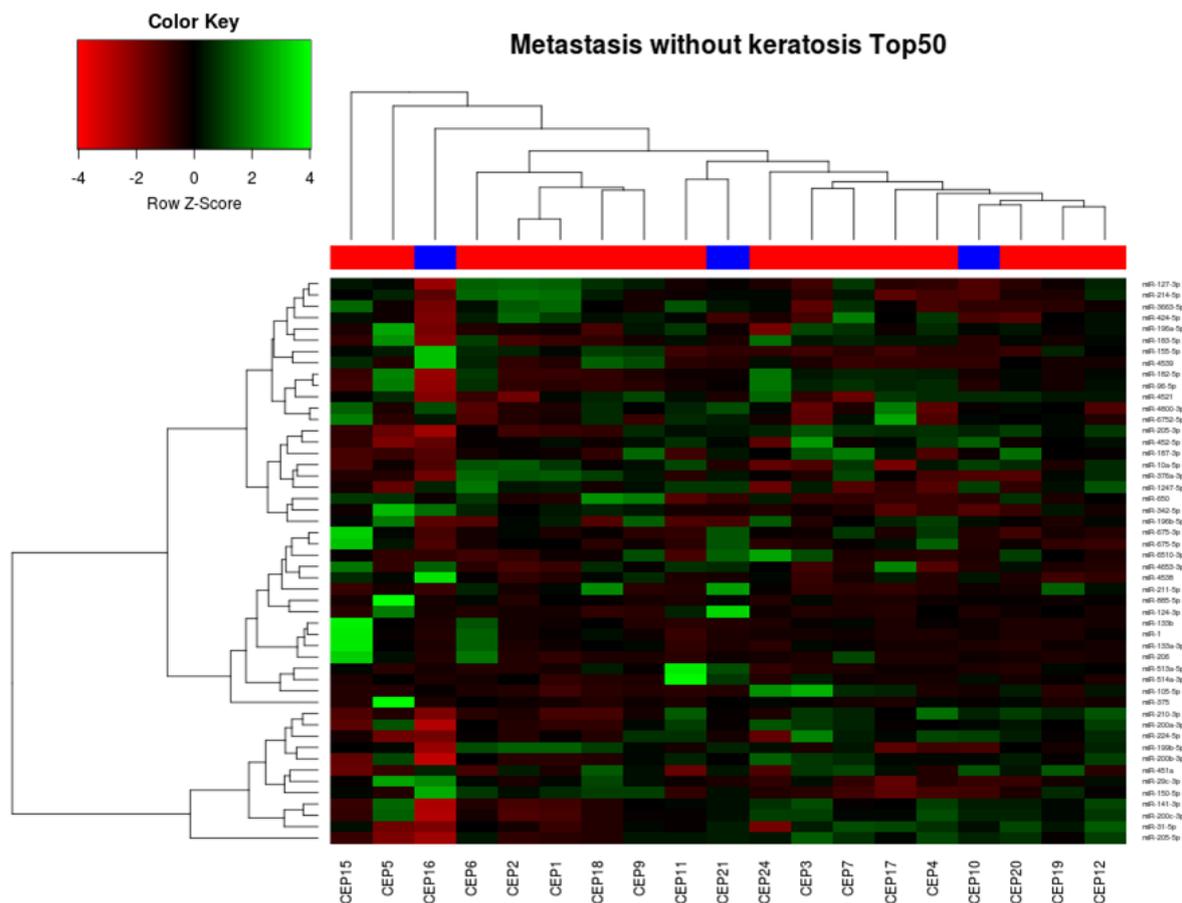


Figura 17. Gráfico heat map de pacientes con carcinoma metastásico frente a los pacientes con el resto de fases en la progresión teniendo en cuenta los 50 genes más relevantes sin tener en cuenta AK. Los pacientes con carcinoma metastásico (N=3) aparecen en azul mientras que el resto de pacientes (N=16) aparecen en rojo. Las columnas corresponden a cada una de las muestras analizadas (N=19) y las filas al nivel de expresión normalizado de cada miRNA analizado. El rojo indica sobreexpresión mientras que el verde indica subexpresión.

Grupo	# de grupos	# de miRNAs DE	Fold Change (max-min)
Queratosis actínica	4	1860	De 5,43 a -3,2
C. inicialmente invasivo	4	1175	De 1,96 a -3,73
C. alto riesgo no invasivo	4	162	De 1,92 a -3,46
C. metastásico	4	0	-
C. inicialmente invasivo (sin AK)	3	0	-
C. alto riesgo no invasivo (sin AK)	3	46	De 2,35 a -1,35
C. metastásico (sin AK)	3	3	De -2,16 a -2,17

Tabla 6. Representación del número de miRNAs diferencialmente expresados en la fase correspondiente. Se tiene en cuenta el estudio incluyendo AK y el estudio paralelo sin ella. Se muestra el número (#) de grupos (4 si incluye AK y 3 si no), el número (#) de miRNAs diferencialmente expresados y el fold change de los mismos (de máximo a mínimo).

La obtención de los miRNAs diferencialmente expresados se consigue por comparación de una de las manifestaciones frente a las demás. Se muestran ambos estudios (con inclusión de AK y sin ella) para demostrar la desviación que genera la lesión pre-maligna al cSCC si se tiene en cuenta en el mismo y así poder continuar con los datos visiblemente menos sesgados de la segunda investigación. Además, podemos observar cómo la mayoría de diferencias a nivel transcriptómico diferencial se muestran entre carcinoma de alto riesgo no metastásico frente a carcinoma inicialmente invasivo y carcinoma metastásico (habiendo un total de 4 miRNAs diferencialmente expresados). Tal vez esto sea explicado por la hipótesis de que el carcinoma de alto riesgo no metastásico y el carcinoma inicialmente invasivo constituyen dos vías alternativas, tal y como se puede ver en la figura 18: mientras que el carcinoma de alto riesgo es más agresivo localmente, el carcinoma inicialmente invasivo no lo es tanto, pero conduce a metástasis. Es por ello que puede que al menos, a nivel de miRNAs el carcinoma de alto riesgo difiera del resto de grupos.

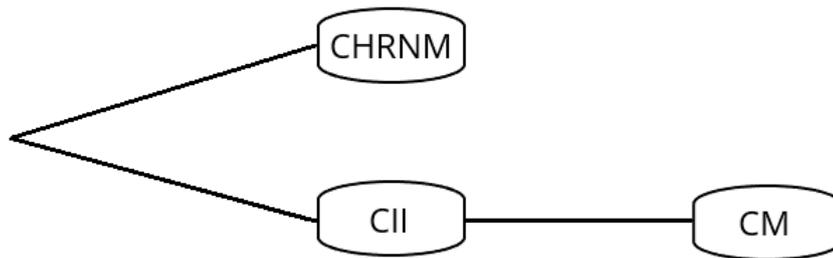


Figura 18. Representación de las fases posibles en el cSCC y sus correspondientes vías. Se muestran dos vías alternativas y excluyentes de manera que, por sus siglas en inglés, CHRM hace referencia al carcinoma de alto riesgo no metastásico, lesión localmente más agresiva que el resto, pero sin posibilidad de producir metástasis; CII correspondería al carcinoma inicialmente invasivo, más leve a nivel local pero con posibilidad de degenerar en CM, carcinoma metastásico.

4.2.3. miRNAs diferencialmente expresados

En el análisis se pudo observar miRNAs diferencialmente expresados específicos de un estadio de cSCC y miRNAs que presentaban una expresión diferencial aumentando o disminuyendo gradualmente ésta a lo largo de la evolución de cSCC. Presentando estos últimos un valor añadido se decide estudiar 12 miRNAs diferencialmente expresados, por ser los más interesantes ya que cuentan con diferencias muy significativas fácilmente contrastables entre los diferentes grados de la enfermedad (carcinoma inicialmente invasivo *versus* carcinoma de alto riesgo no metastásico *versus* carcinoma metastásico). Se tuvo en cuenta Benjamin y Hochberg, con $p < 0.05$. La identificación de los niveles de dichos miRNAs podría servir como biomarcador pronóstico interesante en el diagnóstico de esta enfermedad. Se muestra en la figura 19 los 12 miRNAs a tratar y se prosigue a la discusión de los mismos en el siguiente apartado.

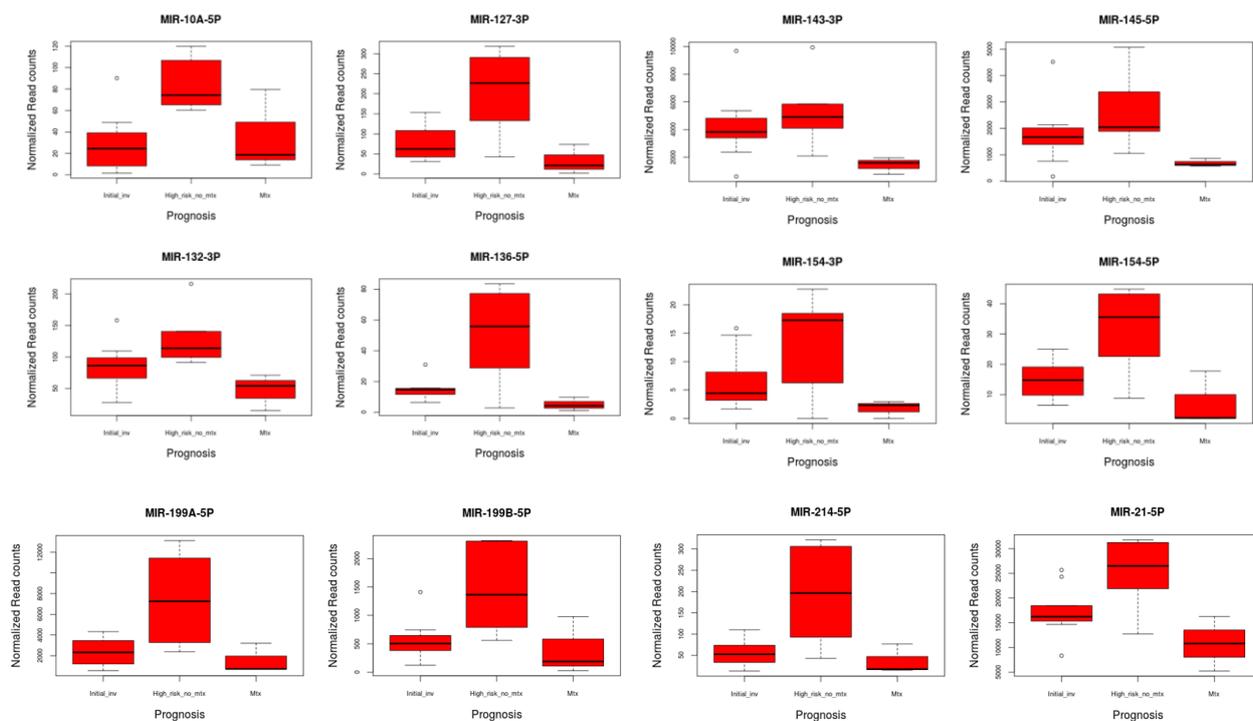


Figura 19. Representación de la expresión diferencial de los 12 miRNAs a estudio (miR-10A-5P, miR-127-3P, miR-132-3P, miR-136-5P, miR-143-3P, miR-145-5P, miR-154-3P, miR-154-5P, miR-199A-5P, miR-199B-5P, miR-214-5P, miR-21-5P). Representación del número de lecturas normalizadas frente al estado pronóstico (de izquierda a derecha: carcinoma inicialmente invasivo, carcinoma de alto riesgo no metastásico y carcinoma metastásico) con $p < 0,05$. Se observa un aumento pronunciado de la expresión en todos los miRNAs cuando se trata de carcinoma de alto riesgo no metastásico, así como una disminución de la expresión en carcinoma metastásico.

4.3. Discusión de los resultados

El carcinoma cutáneo de células escamosas (cSCC) es uno de los cánceres más comunes en humanos, incrementando su importancia en los últimos 50 años por el aumento de su incidencia. cSCC se origina por la proliferación anormal de queratinocitos (Sand, M. et al., 2012). Encontramos así la queratosis actínica como lesión pre-maligna y una serie de estadios dentro de cSCC siendo estos el carcinoma inicialmente invasivo, el carcinoma de alto riesgo no metastásico y el carcinoma metastásico. La necesidad de encontrar potenciales biomarcadores que permitan identificar pacientes de riesgo, así como desarrollar terapias con mejor supervivencia se hace evidente. Recientemente, los miRNAs han cobrado importancia debido a que se ha demostrado que la expresión aberrante de los mismos contribuye a la tumorigénesis por lo que pueden tener factor pronóstico o predictivo (Visone, R., & Croce, C. M., 2009).

Estudios previos han demostrado que los miRNAs se encuentran afectados en cSCC (Sand, M., et al. 2010). Así, se han llevado a cabo estudios de miRNAs diferencialmente expresados globalmente en cSCC e incluso estudios en los que se ha comparado la diferencias en dicha expresión entre cSCC y

epidermis normal (Sand, M. et al., 2012; Wang, N., et al. 2014). Sin embargo, muy pocos estudios se han realizado sobre las diferencias de expresión de miRNAs en los propios estados de cSCC. Por su parte, Mizrahi, A. et al. 2017 estudiaron las diferencias entre la lesión pre-maligna, conocida como queratosis actínica (AK), y los demás estados de evolución de cSCC, a excepción del carcinoma metastásico. En el presente estudio se ha efectuado el análisis transcriptómico de miRNAs haciendo uso de la tecnología HTG EdgeSeq con el ensayo WTA (Whole Transcriptome Assay) para observar diferencias de expresión de miRNAs entre todos los estados conocidos de cSCC. Particularmente después, el estudio decidió centrarse en las divergencias existentes entre los propios estadios de cSCC, dejando de lado la lesión pre-maligna, AK, pues introducía un sesgo muy acusado en los resultados.

En la realización del análisis estadístico primario se observó un total de 1860 miRNAs diferencialmente expresados en AK respecto del resto de manifestaciones. Utilizando un filtro similar se obtienen 1175 miRNAs en el caso del carcinoma inicialmente invasivo, 162 miRNAs en el carcinoma de alto riesgo no metastásico y ningún miRNA en el caso del carcinoma metastásico. Puesto que es evidente que la inclusión de la lesión pre-maligna en el estudio conlleva una desviación de los resultados, se decidió excluirla. En el segundo análisis estadístico, en el cual se excluye AK, el número de miRNAs diferencialmente expresados disminuye encontrando un total de ningún miRNA diferencialmente expresado en el carcinoma inicialmente invasivo respecto del resto de etapas, 46 miRNAs en el carcinoma de alto riesgo no metastásico y 3 miRNAs en el carcinoma metastásico. De estos miRNAs hallados, se pueden diferenciar dos grupos: aquellos que son específicos de un estado y los que aumentan o disminuyen su expresión “gradualmente” a lo largo de la evolución de cSCC. Resulta interesante este último grupo pues la identificación del nivel de expresión de dicho miRNA podría servir como biomarcador pronóstico en la identificación y diagnóstico no sólo de la enfermedad sino también del estadio y la posible evolución de la misma. Se escogen pues 12 miRNAs cuya expresión se ve alterada en función del estadio de cSCC que se tenga en cuenta, por ser los más relevantes, teniendo en cuenta Benjamin & Hochberg con $p < 0,05$.

Los hsa-miR definidos y estudiados presentan un aumento de su expresión en carcinoma de alto riesgo no metastásico y una disminución tanto en carcinoma inicialmente invasivo como en carcinoma metastásico, siendo mucho más acusada en este último caso; las diferencias sustanciales entre carcinoma de alto riesgo no metastásico y las otras dos manifestaciones de la enfermedad están debidas posiblemente a que tal y como se referencia en la figura 18, constituyen vías alternativas. Los datos obtenidos en cuanto a posibles funciones de los hsa-miR y sus potenciales objetivos o *targets* proceden de mirbase.org y rncentral.org. El hsa-miR-10A-5P ha sido descrito anteriormente en cáncer gástrico por Jia, H., et al. (2014) como supresor tumoral cuya expresión se regula a la baja por la metilación del DNA. Además, está implicado en la regulación negativa de la angiogénesis y la diferenciación y migración de las células endoteliales de los vasos sanguíneos. Entre sus *targets* encontramos TFAP2C, factor de transcripción relacionado con el desarrollo de la pared corporal y ya descrito anteriormente en melanoma, donde se observó que una represión del mismo favorece la invasión y el comportamiento metastásico Y RORA, supresor tumoral cuya expresión se encuentra disminuida en cSCC (Penna, E., et al. 2011; Lambert, S. R., et al. 2014). El hsa-miR-127-3P se ha descrito en multitud de cánceres entre los cuales se pueden mencionar neuroblastoma, cáncer de mama, cáncer de vejiga, cáncer de ovario o glioblastoma, siendo un supresor tumoral (Afanasyeva, E. A., et al. 2008; Pronina, I. V., et al. 2017; Xu, Y., et al. 2015; Bi, I., et al. 2016; Jiang, H., et al. 2014). En 2016, Singh, A., et al. lo encontraron diferencialmente expresado en cSCC. Se observó una relación directa entre la unión al supresor tumoral SEPT7 y la migración e invasión celular (Jiang, H., et al. 2014). Hsa-miR-127-3P tiene entre sus *targets* a BCCIP, posible cofactor de BRCA2 en la supresión tumoral y

modulador de la actividad de la quinasa CDK2 a través de p21 (Ncbi.nlm.nih.gov) así como a KIF3B, relacionado con la oncogénesis y metástasis en cáncer de mama y en carcinoma epitelial renal (Lukong, K. E., & Richard, S., 2008; Jimbo T, et al. 2002). Hsa-miR-132-3P, el cual está relacionado con la regulación positiva de la migración y proliferación de células relacionadas con la angiogénesis y ha sido descrito anteriormente como biomarcador de diagnóstico en mesotelioma maligno (Weber, D. G., et al. 2017). En cuanto a sus targets se puede mencionar SENP3, de la familia de las proteasas específicas SUMO, que se encuentra preferencialmente en SUMO2/3 y ha sido descrita como biomarcador diagnóstico en carcinoma de células escamosas oral, de pulmón, ovario, recto y colon (Mattosco, D., & Chiocca, S., 2015; Han, Y., et al. 2010; Sun, Z., et al. 2013). Adicionalmente, se observó cómo la pérdida del hsa-miR-132-3P está vinculada con pobre pronóstico en osteosarcoma primario, hecho que se correlaciona con la disminución de su expresión en el estadio de carcinoma metastásico (Yang, J., et al. 2013). También en osteosarcoma se vio que la baja expresión del hsa-miR-136-5P está relacionada significativamente con las características clínicas agresivas, incluida la etapa clínica avanzada, la presencia de pulmón y la metástasis a distancia, siendo un supresor tumoral (Guo, T & Pan, G. 2018). Se ha inferido sobre su afección a la apoptosis y la angiogénesis y se ha observado en previos estudios que se encuentra regulado al alza en cSCC (Sand, M., et al. 2016). En nuestro estudio vemos que la expresión de hsa-miR-136-5P está regulada al alta en carcinoma de alto riesgo no metastásico, mientras que en carcinoma metastásico disminuye su expresión, siguiendo el hilo conductor de las investigaciones realizadas previamente. También con la angiogénesis y la migración de células endoteliales de los vasos sanguíneos está relacionado hsa-miR-143-3P, así como con el protooncogén ABL2 y con el regulador negativo de la linfangiogénesis, VASH1, pudiendo ser un biomarcador diagnóstico y objetivo terapéutico (Zhou, C. F., et al. 2018). Por su parte, hsa-miR-145-5P regula negativamente la apoptosis y la angiogénesis, encontrando además entre sus *targets* FSCN1, cuya sobreexpresión está relacionada con múltiples tipos de cánceres al aumentar la motilidad celular, y con el protooncogén FLI1, relacionado con la leucemia linfoblástica, así como con SRGAP 2, proteína activadora GTPasa de expresión ubicua en la piel (Ncbi.nlm.nih.gov). Tanto hsa-miR-143-3P como hsa-miR-145-5P funcionan como anti-oncomires, mostrando una habitual disminución de su expresión lo cual parece contribuir al inicio de la tumorigénesis (Kitade, Y., & Akao, Y., 2010). Además, hsa-miR-143 se ha descrito como supresor tumoral en cSCC (Sand, M., et al 2017). Hsa-miR-154-3P y hsa-miR-154-5P se han definido como supresores tumorales en diferentes cánceres (Zhou, H., et al. 2016; Yang, L., et al. 2016). Además, un potencial *target* de hsa-miR-154-3P puede ser PDZD2, observada regulada a la baja en cSCC (Lambert S.R., et al. 2014); a su vez, se determinó una actividad anormal de E2F en cSCC en comparación con los queratinocitos normales, llegando a demostrarse que la desregulación de E2F1 produce hiperplasia y formación de tumores en la piel, por lo que siendo que un potencial *target* de este hsa-miR-154-5P es E2F5, puede que también se presente una relación semejante por su papel en el ciclo celular (Wong C. F., et al. 2003). Hsa-miR-199A-5P se encuentra por lo general regulado a la baja en cánceres e induciendo el proceso de transición epitelial-mesenquimatosa (EMT), angiogénesis y proliferación celular (Lui, G.T., et al. 2015; Chao, C. C., et al. 2017; Peng, W. et al., 2013). Entre sus dianas encontramos DDR1, proteína tirosina quinasa expresada exclusivamente en células epiteliales, cuya expresión está regulada al alza en cSCC, inversamente a hsa-miR-199A-5P; FZD6, regulador negativo de la cascada de señalización Wnt / beta-catenina canónica, inhibiendo así los procesos que desencadenan la transformación oncogénica, la proliferación celular y la inhibición de la apoptosis; y BCAM, glucoproteína del grupo sanguíneo luterano relacionada con el cáncer de piel, por lo que tal y como se referencia en el estudio el hsa-miR-199A-5P podría jugar un papel en la supresión de tumores en cSCC por inhibición de la invasividad mediante la regulación de la expresión de sus

targets, siendo su función la de supresor tumoral (Ncbi.nlm.nih.gov; Kim, B. K., et al. 2015). También a la baja se encuentra regulado hsa-miR-199B-5P en cáncer de mama e induce el proceso EMT (Chao, C. C., et al. 2017; Fang, C., et al. 2016). Se definen entre sus *targets* KATNB1, regulador del corte de los microtúbulos durante la mitosis, CELSR2, ya descrito en piel de ratón irradiada por UVB y ITGA3, integrina relacionada con multitud de cánceres y descrita en ciertos SCC, remarcando su relación con la metástasis (Ncbi.nlm.nih.gov; Xu, Y., et al. 2012). Hsa-miR-214-5P se une a TFDP1, regulador del ciclo celular desde la fase G1 hasta la S y relacionado con cánceres, así como a TFAP2C, ya nombrado anteriormente (Lu, X., et al. 2016; Penna, E., et al. 2011). Además, la regulación a la baja de este último miR está vinculada a la metástasis de carcinoma hepatocelular, apoyando los resultados del presente estudio (Wang, J., et al. 2013). Finalmente, tal y como Sand, M., et al. (2012) definieron, la expresión de hsa-miR-21-5P se muestra alterada en cSCC. Por lo general, hsa-miR-21-5P es un miRNA diferencialmente expresado en una gran variedad de cánceres. Se ha observado que la radiación UV-A sobre los queratinocitos de la piel ayuda a aumentar la expresión de hsa-miR-21-5P (Sand, M., et al. 2012). A su vez, dicho hsa-miR está relacionado con la regulación positiva de la transición EMT y de la angiogénesis, así como la regulación negativa de la apoptosis, datos que se correlacionan con el aumento de su expresión en la etapa de carcinoma de alto riesgo no metastásico. Adicionalmente, entre sus *targets* se mencionará YOD1 y FASLG, relacionados con la progresión del ciclo celular y la apoptosis, respectivamente (Ncbi.nlm.nih.gov).

<i>miRNA</i>	<i>Target</i>	<i>Función miRNA</i>	<i>Descrito anteriormente</i>	<i>Descrito en cSCC</i>
	CADM2	regulación negativa de la angiogénesis		Lambert, S. R., et al. 2014
<i>miR-10A-5P</i>	TFAP2C	regulación negativa de la migración y diferenciación de células endoteliales de vasos sanguíneos	Jia, H., et al., 2014	
	CNOT6	regulación negativa de la proliferación celular en la médula ósea		
	Rora	regulación positiva de la senescencia celular		
<i>miR-127-3P</i>	BCCIP KIF3B sep-07	especio extracelular	Bi, L. et al., 2016 Duan, L. et al., 2016 Jiang, H. et al., 2014	Singh A., et al. 2016
	SENP3	Regulación positiva de la migración celular involucrada en angiogénesis	Weber, D. et al., 2017	
<i>miR-132-3P</i>	PCDH9	Regulación positiva de la proliferación de células endoteliales de los vasos sanguíneos involucrada en la angiogénesis	Han, Y. et al., 2016	
	WIZ		Sun, Z., et al. 2013	
<i>miR-136-5P</i>	PPP2R2A SGIP1 MTMR4	-	Guo, T. & Pan, G. 2018	Sand, M., et al. 2016
<i>miR-143-3P</i>	ABL2 VASH1 DENND1B	Regulación negativa de la angiogénesis Regulación positiva de la angiogénesis	Zhou, C. F., et al. 2018	(Sand, M., et al 2017)
	FSCN1	diferenciación de células mesodérmicas		(Sand, M., et al 2017)
	FLI1	regulación negativa del proceso apoptótico de las células del músculo cardíaco		
<i>miR-145-5P</i>	SRGAP1/2	regulación negativa de la angiogénesis (GO: 0016525)	Kitade, Y. & Akao. Y., 2010	
	MRTFB	regulación negativa de la división y mantenimiento de células madre somáticas		

Tabla 7.1. Descripción de los miRNAs que presentan una expresión diferencial a lo largo de la evolución de cSCC. Se muestra sus potenciales objetivos, la función observada de dicho miRNA y la descripción en la literatura en otros cánceres y si corresponde, en cSCC. Aquellos objetivos diferenciados en negrita se mencionan en la discusión.

<i>miRNA</i>	<i>Target</i>	<i>Función miRNA</i>	<i>Descrito anteriormente</i>	<i>Descrito en cSCC</i>
<i>miR-154-3P</i>	PDZD2 SIRT1 SEMAC3C	-	Yang, L., et al. 2016 Zhou, H., et al. 2016	
<i>miR-154-5P</i>	E2F5 PCNA ZHX2	-	Yang, L., et al. 2016 Zhou, H., et al. 2016	Singh A., et al. 2016
<i>miR-199A-5P</i>	DDR1	regulación negativa de la internalización del receptor	Liu, G. T., et al. 2015	Kim, BK., et al. 2015
	BCAM	regulación negativa de la depuración de partículas de lipoproteínas de baja densidad	Chao, C. C., et al. 2017	Wang, S., et al. 2014
	FZD6	regulación de angiogénesis		
<i>miR-199B-5P</i>	KATNBL1	Silenciamiento génico por miRNA	Fang, C., et al. 2016	
	CELSR2	Regulación positiva de la diferenciación celular endotelial		
	ITGA3	Regulación de la angiogénesis		
	ETNK1	Regulación positiva de la secreción de proteínas		
<i>miR-214-5P</i>	KLHL3	Regulación negativa de la diferenciación celular del músculo liso	Wang, J., et al. 2013	
	TFDP1	Regulación positiva de la proliferación de células del músculo liso vascular		
	TFAP2C			
	KLF12 PPL KLF5			
<i>miR-21-5P</i>	YOD1	regulación positiva de la fosforilación de proteínas	Zhou, X., et al. 2010	Bruegger, C., et al. 2013
	FASLG	regulación negativa de proliferación de células endoteliales	Asangani, I. A., et al. 2008	Gillespie, J., et al. 2016
	IL12A	regulación positiva de la transición EMT	Lopes-Ramos, C. M., et al. 2014	Sand, M., et al. 2012
	TGFBI	regulación positiva y negativa de la migración celular. regulación negativa de la producción de interferon tipo 1 regulación negativa de la apoptosis Regulación positiva de la angiogénesis		

Tabla 7.2. Descripción de los miRNAs que presentan una expresión diferencial a lo largo de la evolución de cSCC. Se muestra sus potenciales objetivos, la función observada de dicho miRNA y la descripción en la literatura en otros cánceres y si corresponde, en cSCC. Aquellos objetivos diferenciados en negrita se mencionan en la discusión.

5. CONCLUSIONES

- I. El sistema HTG EdgeSeq se ha demostrado sólido y potente a la hora de obtener perfiles de expresión génica diferencial, mostrando numerosas ventajas como puede ser una cantidad mínima necesaria de material de partida (una sola sección de 5 μm y un área de 12,5 mm^2 en caso de muestras FFPE), ausencia de extracción del RNA y un tiempo total de protocolo bastante rápido (aproximadamente 36 horas). Además, se trata de un sistema robusto con una gran reproducibilidad, cuyos resultados son fácilmente extrapolables a la clínica.
- II. Haciendo uso del sistema HTG EdgeSeq con el panel WTA, el cual cuenta con 2083 transcritos de miRNA humano, se ha demostrado que existen perfiles transcriptómicos diferentes entre los estadios del carcinoma epitelial escamoso de la piel, permitiendo determinar miRNAs diferencialmente expresados de manera gradual a lo largo de la progresión de la enfermedad.
- III. Existe un aumento general de la expresión de los 12 miRNAs seleccionados a estudio en carcinoma de alto riesgo no metastásico, así como una disminución sustancial de la expresión de los mismos en carcinoma metastásico.
- IV. Se ha identificado nuevos miRNAs diferencialmente expresados no descritos en la literatura anteriormente, siendo estos: miR-132-3P, miR-199B-5P y miR-214-5P.
- V. Conocer el nivel de estos miRNA diferencialmente expresados de manera gradual en el paciente podría funcionar como biomarcador pronóstico a la hora de determinar la fase en la que se encuentra, generando pronósticos más concretos y tal vez permitiendo ejercer sobre los pacientes terapias que aumenten su supervivencia.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAM B. GLICK Y STUART H. YUSPA (2015). Epithelial Skin Cancer en: *The Molecular Basis of Cancer*. Elsevier Saunders. Philadelphia, Pa: 481-489.

AFANASYEVA, E. A., HOTZ-WAGENBLATT, A., GLATTING, K. H., & WESTERMANN, F. (2008). New miRNAs cloned from neuroblastoma. *BMC genomics*, 9(1), 52.

AIGNER, A. (2011). MicroRNAs (miRNAs) in cancer invasion and metastasis: Therapeutic approaches based on metastasis-related miRNAs. *Journal of Molecular Medicine*, 89(5), 445–457.

ALAM, M., & RATNER, D. (2001). Cutaneous squamous-cell carcinoma. *New England Journal of Medicine*, 344(13), 975-983.

ALFARO-SÁNCHEZ, A., GARCÍA-HIDALGO, L., CASADOS-VERGARA, R., RODRÍGUEZ-CABRAL, R., PIÑA-OSUNA, A. K., & SÁNCHEZ-RAMOS, A. (2016). Cáncer de piel. Epidemiología y variedades histológicas, estudio de cinco años en el noreste de México. *Dermatología Revista Mexicana*, 60(2), 106-113.

BARZILAI, A., LYAKHOVITSKY, A., TRAU, H., FOGEL, M., & HUSZAR, M. (2007). Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(4), 669-676.

BAER, C., CLAUS, R., & PLASS, C. (2013). Genome-wide epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Cancer Research*, 73(2), 473–477.

BERTERO, T., GASTALDI, C., BOURGET-PONZIO, I., IMBERT, V., LOUBAT, A., SELVA, E., ... & MENEGUZZI, G. (2011). miR-483-3p controls proliferation in wounded epithelial cells. *The FASEB Journal*, 25(9), 3092-3105.

BERTERO, T., BOURGET-PONZIO, I., PUISSANT, A., LOUBAT, A., MARI, B., MENEGUZZI, G., ... & REZZONICO, R. (2013). Tumor suppressor function of miR-483-3p on squamous cell carcinomas due to its pro-apoptotic properties. *Cell Cycle*, 12(14), 2183-2193.

BI, L., YANG, Q., YUAN, J., MIAO, Q., DUAN, L., LI, F., & WANG, S. (2016). MicroRNA-127-3p acts as a tumor suppressor in epithelial ovarian cancer by regulating the BAG5 gene. *Oncology reports*, 36(5), 2563-2570.

CHAO, C. C., WU, P. H., HUANG, H. C., CHUNG, H. Y., CHOU, Y. C., CAI, B. H., & KANNAGI, R. (2017). Downregulation of miR-199a/b-5p is associated with GCNT 2 induction upon epithelial–mesenchymal transition in colon cancer. *FEBS letters*, 591(13), 1902-1917.

CORBALAN-VELEZ, R., RUIZ-MACIA, J. A., BRUFAU, C., OVIEDO-RAMÍREZ, I., MARTÍNEZ-BARBA, E., LÓPEZ-LOZANO, J. M., & CARAPETO, F. J. (2010). Solar elastosis in cutaneous squamous cell carcinoma. *Actas Dermo-Sifiliográficas (English Edition)*, *101*(6), 517-523.

DANTAL, J., HOURMANT, M., CANTAROVICH, D., GIRAL, M., BLANCHO, G., DRENO, B., & SOULILLOU, J. P. (1999). Effect of long-term immunosuppression in kidney-graft recipients on cancer incidence: randomised comparison of two cyclosporin regimens. In *Immunosuppression under Trial* (pp. 131-144). Springer, Dordrecht.

EIS, P. S., TAM, W., SUN, L., CHADBURN, A., LI, Z., GOMEZ, M. F., ... & DAHLBERG, J. E. (2005). Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *102*(10), 3627-3632.

ESQUELA-KERSCHER, A., & SLACK, F. J. (2006). Oncomirs - MicroRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer*, *6*(4), 259–269.

FANG, C., WANG, F. B., LI, Y., & ZENG, X. T. (2016). Down-regulation of miR-199b-5p is correlated with poor prognosis for breast cancer patients. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *84*, 1189-1193.

FEARON, E. R., & VOGELSTEIN, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, *61*(5), 759-767.

FLEMING, J. L., GABLE, D. L., SAMADZADEH-TARIGHAT, S., CHENG, L., YU, L., GILLESPIE, J. L., & TOLAND, A. E. (2013). Differential expression of miR-1, a putative tumor suppressing microRNA, in cancer resistant and cancer susceptible mice. *PeerJ*, *1*, e68.

GALLAGHER, R. P. (2005). Sunscreens in melanoma and skin cancer prevention. *Cmaj*, *173*(3), 244-245.

GARZON, R., CALIN, G. A., & CROCE, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*, *60*, 167-179.

GASTALDI, C., BERTERO, T., XU, N., BOURGET-PONZIO, I., LEBRIGAND, K., FOURRE, S., ... & PIVARCSI, A. (2013). miR-193b/365a cluster controls progression of epidermal squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, *35*(5), 1110-1120.

GUO, T., & PAN, G. (2018). MicroRNA-136 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma via regulating metadherin. *Cancer Biomarkers*, (Preprint), 1-9.

GUTIÉRREZ VIDRIO, R (2003). Cáncer de piel. *Revista de la Facultad de Medicina*, *46*(004).

HAN, Y., HUANG, C., SUN, X., XIANG, B., WANG, M., YEH, E. T., ... & SUN, Y. (2010). SENP3-mediated de-conjugation of SUMO2/3 from promyelocytic leukemia is correlated with accelerated cell proliferation under mild oxidative stress. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(17), 12906-12915.

HTG MOLECULAR. (DAKOTA DEL NORTE). *HTG Molecular Diagnostics, Inc* . [en línea] Disponible en: <https://www.htgmolecular.com> [Consultado el 21 de abril de 2019].

HTG MOLECULAR. (DAKOTA DEL NORTE). *HTG EdgeSeq miRNA Ensayo completo de transcriptomas - HTG Molecular - miRNA seq* . [en línea] Disponible en: <https://www.htgmolecular.com/assays/mirna-wta> [Consultado el 21 de abril de 2019].

HURWITZ, R. M., & MONGER, L. E. (1995). Solar keratosis: an evolving squamous cell carcinoma. Benign or malignant?. *Dermatologic surgery*, 21(2), 184.

JEMAL, A., SARAIYA, M., PATEL, P., CHERALA, S. S., BARNHOLTZ-SLOAN, J., KIM, J., ... & WINGO, P. A. (2011). Recent trends in cutaneous melanoma incidence and death rates in the United States, 1992-2006. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(5), S17-e1.

JENSEN, P., HANSEN, S., MØLLER, B., LEIVESTAD, T., PFEFFER, P., GEIRAN, O., ... & SIMONSEN, S. (1999). Skin cancer in kidney and heart transplant recipients and different long-term immunosuppressive therapy regimens. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 40(2), 177-186.

JIA, H., ZHANG, Z., ZOU, D., WANG, B., YAN, Y., LUO, M., ... & WANG, F. (2014). MicroRNA-10a is down-regulated by DNA methylation and functions as a tumor suppressor in gastric cancer cells. *PLoS one*, 9(1), e88057.

JIANG, H., HUA, D., ZHANG, J., LAN, Q., HUANG, Q., YOON, J. G., ... & LIN, B. (2014). MicroRNA-127-3p promotes glioblastoma cell migration and invasion by targeting the tumor-suppressor gene SEPT7. *Oncology reports*, 31(5), 2261-2269.

JIMBO, T., KAWASAKI, Y., KOYAMA, R., SATO, R., TAKADA, S., HARAGUCHI, K., & AKIYAMA, T. (2002). Identification of a link between the tumour suppressor APC and the kinesin superfamily. *Nature cell biology*, 4(4), 323.

KANITZ, A., IMIG, J., DZIUNYCH, P. J., PRIMORAC, A., GALGANO, A., HOFBAUER, G. F., ... & DETMAR, M. (2012). The expression levels of microRNA-361-5p and its target VEGFA are inversely correlated in human cutaneous squamous cell carcinoma. *PLoS One*, 7(11), e49568.

KIM, B. K., KIM, I., & YOON, S. K. (2015). Identification of miR-199a-5p target genes in the skin keratinocyte and their expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of dermatological science*, 79(2), 137-147.

KIM, Y.-K., KIM, B., & KIM, V. N. (2016). Re-evaluation of the roles of DROSHA , Exportin 5 , and DICER in microRNA biogenesis . *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(13), E1881–E1889.

KITADE, Y., & AKAO, Y. (2010). MicroRNAs and their therapeutic potential for human diseases: microRNAs, miR-143 and-145, function as anti-oncomirs and the application of chemically modified miR-143 as an anti-cancer drug. *Journal of pharmacological sciences*, 1010080465-1010080465.

KRAEMER, K. H., DIGIOVANNA, J. J., MOSHELL, A. N., TARONE, R. E., & PECK, G. L. (1988). Prevention of skin cancer in xeroderma pigmentosum with the use of oral isotretinoin. *New England Journal of Medicine*, 318(25), 1633-1637.

KROUSE, R. S., ALBERTS, D. S., PRASAD, A. R., BARTELS, H., YOZWIAK, M., LIU, Y., & BARTELS, P. H. (2009). Progression of skin lesions from normal skin to squamous cell carcinoma. *Analytical and quantitative cytology and histology/the International Academy of Cytology [and] American Society of Cytology*, 31(1), 17.

KWA, R. E., CAMPANA, K., & MOY, R. L. (1992). Biology of cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 26(1), 1-26.

LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., ... KIM, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419.

LEFORT, K., BROOKS, Y., OSTANO, P., CARIO-ANDRÉ, M., CALPINI, V., GUINEA-VINIEGRA, J., ... & WERNER, S. (2013). A miR-34a-SIRT6 axis in the squamous cell differentiation network. *The EMBO journal*, 32(16), 2248-2263.

LI, D., YANG, P., LI, H., CHENG, P., ZHANG, L., WEI, D., ... & ZHAO, Z. (2012). MicroRNA-1 inhibits proliferation of hepatocarcinoma cells by targeting endothelin-1. *Life sciences*, 91(11-12), 440-447.

LIU, G. T., HUANG, Y. L., TZENG, H. E., TSAI, C. H., WANG, S. W., & TANG, C. H. (2015). CCL5 promotes vascular endothelial growth factor expression and induces angiogenesis by down-regulating miR-199a in human chondrosarcoma cells. *Cancer letters*, 357(2), 476-487.

LÓPEZ-CAMARILLO, C., & MARCHAT, L. A. (2013). MicroRNAs in cancer. *MicroRNAs in Cancer*, 1–426.

LU, J., GETZ, G., MISKA, E. A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., ... GOLUB, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043), 834–838.

LU, X., LV, X. D., REN, Y. H., YANG, W. D., LI, Z. B., ZHANG, L., & BAI, X. F. (2016). Dysregulation of TFDP1 and of the cell cycle pathway in high-grade glioblastoma multiforme: a bioinformatic analysis. *Genet. Mol. Res*, 15(2).

LUKONG, K. E., & RICHARD, S. (2008). Breast tumor kinase BRK requires kinesin-2 subunit KAP3A in modulation of cell migration. *Cellular signalling*, 20(2), 432-442.

MARIANI, L., MONFULLEDA, N., ALEMANY, L., VIZZA, E., MARANDINO, F., VOCATURO, A., ... & QUINT, W. (2010). Human Papilloma Virus prevalence and type-specific relative contribution in invasive cervical cancer specimens from Italy. *BMC cancer*, 10(1), 259.

MATTOSCO, D., & CHIOCCA, S. (2015). SUMO pathway components as possible cancer biomarkers. *Future Oncology*, 11(11), 1599-1610.

McGREGOR, J. M., & PROBY, C. M. (1996). The role of papillomaviruses in human non-melanoma skin cancer. *Cancer surveys*, 26, 219.

MIRBASE.ORG. (Dakota del Norte). *miRBase* . [en línea] Disponible en: <http://www.mirbase.org/> [Consultado el 15 de mayo de 2019].

MIZRAHI, A., BARZILAI, A., GUR-WAHNON, D., BEN-DOV, I. Z., GLASSBERG, S., MENINGHER, T., ... & BARSHACK, I. (2017). Alterations of microRNAs throughout the malignant evolution of cutaneous squamous cell carcinoma: the role of miR-497 in epithelial to mesenchymal transition of keratinocytes. *Oncogene*, 37(2), 218.

NAKAZAWA, H., ENGLISH, D., RANDELL, P. L., NAKAZAWA, K., MARTEL, N., ARMSTRONG, B. K., & YAMASAKI, H. (1994). UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(1), 360-364.

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). BCCIP BRCA2 Y CDKN1A QUE INTERACTÚAN CON LA PROTEÍNA [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=56647 [Consultado el 3 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV (DAKOTA DEL NORTE). FSCN1 FASCINA QUE CONTIENE PROTEÍNA 1 [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=6624 [Consultado el 3 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). FLI1 FLI-1 PROTOONCOGÉN, FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN ETS [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=2313 [Consultado el 3 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (N.D.). SRGAP2 SLIT-ROBO RHO GTPASE ACTIVATING PROTEIN 2 [HOMO SAPIENS (HUMAN)] - GENE - NCBI. [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=23380 [Consultado el 7 de Junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). MOLÉCULA DE ADHESIÓN DE CÉLULAS BASALES BCAM (GRUPO SANGUÍNEO LUTERANO) [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4059/> [Consultado el 9 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). YOD1 YOD1 DEUBIQUITINASA [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=55432 [Consultado el 9 de junio de 2019].

NCBI. (DAKOTA DEL NORTE). FZD6 ORTÓLOGOS . [en línea] Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/kis/ortholog/8323/?scope=7776> [Consultado el 9 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). KATNBL1 SUBUNIDAD REGULADORA DE KATANINA B1 COMO 1 [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GENE - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=79768 [Consultado el 9 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). SUBUNIDAD ALFA 3 DE LA INTEGRINA ITGA3 [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=3675 [Consultado el 9 de junio de 2019].

NCBI.NLM.NIH.GOV. (DAKOTA DEL NORTE). FAS LIGANDO FASLG [HOMO SAPIENS (HUMANO)] - GEN - NCBI . [en línea] Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=356 [Consultado el 9 de junio de 2019].

PENG, W., CHEN, Z. Y., WANG, L., WANG, Z., & LI, J. (2013). MicroRNA-199a-3p is downregulated in gastric carcinomas and modulates cell proliferation. *Genet Mol Res*, 12(3), 3038-3047.

PENNA, E., ORSO, F., CIMINO, D., TENAGLIA, E., LEMBO, A., QUAGLINO, E., ... & PINATEL, E. (2011). microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *The EMBO journal*, 30(10), 1990-2007.

PINEDO-VEGA, J. L., CASTAÑEDA-LÓPEZ, R., DÁVILA-RANGEL, J. I., MIRELES-GARCÍA, F., RÍOS-MARTÍNEZ, C., & LÓPEZ-SAUCEDO, A. (2014). Incidencia de cáncer de piel en Zacatecas. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*, 52(3), 282-289.

PRESTON, D. S., & STERN, R. S. (1992). Nonmelanoma cancers of the skin. *New England Journal of Medicine*, 327(23), 1649-1662.

PRONINA, I. V., LOGINOV, V. I., BURDENYY, A. M., FRIDMAN, M. V., SENCHENKO, V. N., KAZUBSKAYA, T. P., ... & BRAGA, E. A. (2017). DNA methylation contributes to deregulation of 12 cancer-associated microRNAs and breast cancer progression. *Gene*, 604, 1-8.

RED ESPAÑOLA DE REGISTROS DE CÁNCER (REDECAN), 2019. Estimaciones de la incidencia del cáncer en España

REDDY, K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer Cell International*, 15(1), 4-9.

RNACENTRAL.ORG. (N.D.). RNACENTRAL: THE NON-CODING RNA SEQUENCE DATABASE. [en línea] Disponible en: <https://rnacentral.org/> [Consultado el 15 de mayo de 2019].

RUDDON, R. (2007). *Cancer biology*. 4th ed. Oxford: Oxford University Press.

RUPAIMOOLE, R., CALIN, G. A., LOPEZ-BERESTEIN, G., & SOOD, A. K. (2016). MiRNA deregulation in cancer cells and the tumor microenvironment. *Cancer Discovery*, 6(3), 235–246.

RUSSO, F., GIUGNO, R., LAGANÀ, A., PULVIRENTI, A., SISMEIRO, C., & FERRO, A. (2010). Variability in the Incidence of miRNAs and Genes in Fragile Sites and the Role of Repeats and CpG Islands in the Distribution of Genetic Material. *PLoS ONE*, 5(6), e11166.

SAND, M., GAMBICHLER, T., SKRYGAN, M., SAND, D., SCOLA, N., ALTMAYER, P., & BECHARA, F. G. (2010). Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and dicer in epithelial skin cancer. *Cancer investigation*, 28(6), 649-653.

SAND, M., SKRYGAN, M., GEORGAS, D., SAND, D., HAHN, S. A., GAMBICHLER, T., ... & BECHARA, F. G. (2012). Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of dermatological science*, 68(3), 119-126.

SAND, M., BECHARA, F. G., GAMBICHLER, T., SAND, D., BROMBA, M., HAHN, S. A., ... HESSAM, S. (2016). Circular RNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of Dermatological Science*, 83(3), 210–218.

SAND, M., HESSAM, S., AMUR, S., SKRYGAN, M., BROMBA, M., STOCKFLETH, E., ... & BECHARA, F. G. (2017). Expression of oncogenic miR-17-92 and tumor suppressive miR-143-145 clusters in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of dermatological science*, 86(2), 142-148.

SINGH, A., WILLEMS, E., SINGH, A., HAFEEZ, B. B., ONG, I. M., MEHTA, S. L., & VERMA, A. K. (2016). Ultraviolet radiation-induced tumor necrosis factor alpha, which is linked to the development of cutaneous SCC, modulates differential epidermal microRNAs expression. *Oncotarget*, 7(14), 17945.

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA (SEOM), 2018. Las cifras del cáncer en España 2018. [https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las Cifras del cancer en Espana2018.pdf](https://seom.org/seomcms/images/stories/recursos/Las_Cifras_del_cancer_en_Espana2018.pdf)

SOCIEDAD ESPAÑOLA DE ONCOLOGÍA MÉDICA (SEOM), 2019. Las cifras del cáncer en España 2019. <https://seom.org/dmccancer/wp-content/uploads/2019/Informe-SEOM-cifras-cancer-2019.pdf>

SUN, Z., HU, S., LUO, Q., YE, D., HU, D., & CHEN, F. (2013). Overexpression of SENP3 in oral squamous cell carcinoma and its association with differentiation. *Oncology reports*, 29(5), 1701-1706.

TEJERA-VAQUERIZO, A., DESCALZO-GALLEGO, M. A., OTERO-RIVAS, M. M., POSADA-GARCÍA, C., RODRÍGUEZ-PAZOS, L., PASTUSHENKO, I., ... & GARCÍA-DOVAL, I. (2016). Incidencia y mortalidad del cáncer cutáneo en España: revisión sistemática y metaanálisis. *Actas Dermo-Sifiliográficas*, 107(4), 318-328

TOMINAGA, E., YUASA, K., SHIMAZAKI, S., & HIJIKATA, T. (2013). MicroRNA-1 targets Slug and endows lung cancer A549 cells with epithelial and anti-tumorigenic properties. *Experimental cell research*, 319(3), 77-88.

VISONE, R., & CROCE, C. M. (2009). MiRNAs and cancer. *American Journal of Pathology*, 174(4), 1131–1138.

VISONE, R., RUSSO, L., PALLANTE, P., DE MARTINO, I., FERRARO, A., LEONE, V., ... & FUSCO, A. (2007). MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocrine-related cancer*, 14(3), 791-798.

WANG, A., LANDÉN, N. X., MEISGEN, F., LOHCHAROENKAL, W., STÅHLE, M., SONKOLY, E., & PIVARCSI, A. (2014). MicroRNA-31 is overexpressed in cutaneous squamous cell carcinoma and regulates cell motility and colony formation ability of tumor cells. *PloS one*, 9(7), e103206.

WANG, J., LI, J., WANG, X., ZHENG, C., & MA, W. (2013). Downregulation of microRNA-214 and overexpression of FGFR-1 contribute to hepatocellular carcinoma metastasis. *Biochemical and biophysical research communications*, 439(1), 47-53.

WANG, N., XU, Z. W., & WANG, K. H. (2014). Systematical analysis of cutaneous squamous cell carcinoma network of microRNAs, transcription factors, and target and host genes. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15, 10355-10361.

WANG, S. H., ZHOU, J. D., HE, Q. Y., YIN, Z. Q., CAO, K., & LUO, C. Q. (2014). MiR-199a inhibits the ability of proliferation and migration by regulating CD44-Ezrin signaling in cutaneous squamous cell carcinoma cells. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(10), 7131.

WEBER, D. G., GAWRYCH, K., CASJENS, S., BRIK, A., LEHNERT, M., TAEGER, D., ... & BRÜNING, T. (2017). Circulating miR-132-3p as a candidate diagnostic biomarker for malignant mesothelioma. *Disease markers*, 2017.

WEINBERG, R. (2014). *The biology of cancer*. 2nd ed. New York, NY, US: Garland Science.

WONG, C. F., BARNES, L. M., DAHLER, A. L., SMITH, L., SEREWKO-AURET, M. M., POPA, C., ... & SAUNDERS, N. A. (2003). E2F Modulates Keratinocyte Squamous Differentiation IMPLICATIONS FOR E2F INHIBITION IN SQUAMOUS CELL CARCINOMA. *Journal of Biological Chemistry*, 278(31), 28516-28522.

XU, N., ZHANG, L., MEISGEN, F., HARADA, M., HEILBORN, J., HOMEY, B., ... & PIVARCSI, A. (2012). MicroRNA-125b down-regulates matrix metalloproteinase 13 and inhibits cutaneous squamous cell carcinoma cell proliferation, migration, and invasion. *Journal of Biological Chemistry*, 287(35), 29899-29908.

XU, Y., ZHOU, B., WU, D., YIN, Z., & LUO, D. (2012). Baicalin modulates microRNA expression in UVB irradiated mouse skin. *Journal of biomedical research*, 26(2), 125-134.

YANG, J., GAO, T., TANG, J., CAI, H., LIN, L., & FU, S. (2013). Loss of microRNA-132 predicts poor prognosis in patients with primary osteosarcoma. *Molecular and cellular biochemistry*, 381(1-2), 9-15.

YANG, L., YAN, Z., WANG, Y., MA, W., & LI, C. (2016). Down-expression of miR-154 suppresses tumourigenesis in CD133+ glioblastoma stem cells. *Cell biochemistry and function*, 34(6), 404-413.

YAMANE, K., JINNIN, M., ETOH, T., KOBAYASHI, Y., SHIMOZONO, N., FUKUSHIMA, S., ... & AOI, J. (2013). Down-regulation of miR-124/-214 in cutaneous squamous cell carcinoma mediates abnormal cell proliferation via the induction of ERK. *Journal of Molecular Medicine*, 91(1), 69-81.

YU, J., RYAN, D. G., GETSIOS, S., OLIVEIRA-FERNANDES, M., FATIMA, A., & LAVKER, R. M. (2008). MicroRNA-184 antagonizes microRNA-205 to maintain SHIP2 levels in epithelia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(49), 19300-19305.

YU, X., & LI, Z. (2016). The role of miRNA s in cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 20(1), 3-9.

ZACKHEIM, H. S., KROBOCK, E., & LANGS, L. (1964). CUTANEOUS NEOPLASM IN THE RAT PRODUCED BY GRENZ RAY AND 80-kv X-RAY. *Journal of Investigative Dermatology (US)*, 43.

ZHONG, X., COUKOS, G., & ZHANG, L. (2012). miRNAs in human cancer. *Methods in Molecular Biology*, 822(November 2010), 295–306.

ZHOU, C. F., MA, J., HUANG, L., YI, H. Y., ZHANG, Y. M., WU, X. G., ... & WU, S. (2019). Cervical squamous cell carcinoma-secreted exosomal miR-221-3p promotes lymphangiogenesis and lymphatic metastasis by targeting VASH1. *Oncogene*, 38(8), 1256.

ZHOU, H., ZHANG, M., YUAN, H., ZHENG, W., MENG, C., & ZHAO, D. (2016). MicroRNA-154 functions as a tumor suppressor in osteosarcoma by targeting Wnt5a. *Oncology reports*, 35(3), 1851-1858.

ZHOU, M., LIU, W., MA, S., CAO, H., PENG, X., GUO, L., ... & SHI, W. (2013). A novel onco-miR-365 induces cutaneous squamous cell carcinoma. *Carcinogenesis*, 34(7), 1653-1659.

ZHOU, M., ZHOU, L., ZHENG, L., GUO, L., WANG, Y., LIU, H., ... & DING, Z. (2014). miR-365 promotes cutaneous squamous cell carcinoma (CSCC) through targeting nuclear factor I/B (NFIB). *PloS one*, 9(6), e100620.

ANEXO I: miRNAs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS
EXCLUYENDO QUERATOSIS ACTÍNICA

Tabla 1. Lista de miRNAs diferencialmente expresados en carcinoma de alto riesgo no metastásico.
 Se muestra para cada miRNA su log2FoldChange, p-valor y p-valor ajustado, entre otros parámetros.

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
miR-206	15,6104319	2,352599657	0,533999241	4,405623595	1,0548E-05	0,009145115
miR-133b	5,867582105	1,815669098	0,534921277	3,394273466	0,000688109	0,039772725
miR-1	5,317438435	1,720664155	0,534140227	3,221371597	0,001275786	0,054218278
miR-136-5p	23,33413402	1,682926029	0,401402093	4,192618969	2,75752E-05	0,009272226
miR-214-5p	91,35606011	1,605700699	0,392405989	4,091937293	4,27784E-05	0,009272226
miR-432-5p	9,058185611	1,560237714	0,418390381	3,729143363	0,000192132	0,023796899
miR-133a-3p	8,724760477	1,546362081	0,530602618	2,914350644	0,003564293	0,081322162
miR-199a-5p	3649,895572	1,515854032	0,384053725	3,946984322	7,91417E-05	0,013723177
miR-493-5p	9,056283337	1,465196496	0,41402742	3,538887585	0,000401817	0,029031273
miR-377-3p	40,20519526	1,423908782	0,399338341	3,565670099	0,000362928	0,0286053
miR-487b-3p	16,19381759	1,412707135	0,373943406	3,777863477	0,00015818	0,022856944
miR-199a-3p	4763,905227	1,398749585	0,39129017	3,574711795	0,000350614	0,0286053
miR-376a-3p	38,21948375	1,379741632	0,441921733	3,122140253	0,001795414	0,062264952
miR-410-3p	5,061628033	1,374044253	0,438748894	3,131732685	0,00173778	0,062264952
miR-127-3p	104,4931272	1,364535583	0,410722965	3,322277898	0,000892857	0,0483817
miR-370-3p	9,909403298	1,325766249	0,367971642	3,602903312	0,000314683	0,0286053
miR-381-5p	3,022981695	1,317189465	0,471705797	2,792396178	0,005231925	0,098610421
miR-382-3p	4,206656656	1,310879032	0,441991714	2,965845267	0,003018523	0,076963007
miR-376c-3p	111,7980399	1,279240166	0,405574806	3,1541411	0,001609712	0,060679158
miR-337-5p	25,75385606	1,257074311	0,380622572	3,302679357	0,000957658	0,04884057
miR-323a-3p	8,626658276	1,224788894	0,340692434	3,594998809	0,000324393	0,0286053
miR-323b-3p	3,759291927	1,222904408	0,41031126	2,980431023	0,002878431	0,076963007
miR-424-5p	164,3630686	1,21354213	0,42703616	2,841778387	0,004486266	0,092609358
miR-199b-5p	772,1316454	1,210577421	0,421418073	2,872628153	0,004070729	0,08823306
miR-409-3p	18,88412733	1,202100294	0,376410444	3,193589105	0,00140516	0,055376064
miR-10a-5p	44,33106202	1,197048119	0,42814409	2,795900135	0,005175539	0,098610421
miR-299-5p	10,43241816	1,195417234	0,404734585	2,953583108	0,00314108	0,076963007
miR-495-3p	16,16080983	1,191981968	0,412317297	2,890933697	0,003840991	0,085388195
miR-379-5p	27,54105108	1,175677549	0,381783587	3,079434503	0,00207394	0,066596507
miR-382-5p	14,4431464	1,168220598	0,36300998	3,218150083	0,001290203	0,054218278
miR-134-5p	14,56411925	1,160288414	0,390527547	2,971079562	0,002967549	0,076963007
miR-654-3p	8,802556104	1,127681048	0,401557148	2,808270391	0,004980839	0,098610421
miR-154-5p	17,97743625	1,109058376	0,357643766	3,10101414	0,001928591	0,064311086
miR-127-5p	6,897419933	1,09182801	0,360572305	3,028041794	0,00246144	0,070231683
miR-431-5p	7,842779998	1,046741572	0,367201902	2,850588645	0,004363838	0,092279218
let-7d-3p	30,65621115	1,022051437	0,346662747	2,948258636	0,003195696	0,076963007
miR-22-5p	119,0711281	0,988578687	0,307674239	3,21306941	0,001313245	0,054218278

miR-3184-3p	101,6573098	0,920816414	0,329119139	2,797820923	0,005144863	0,098610421
miR-574-3p	309,7484767	0,871067764	0,211024313	4,127807603	3,66238E-05	0,009272226
miR-4444	85,61649869	-0,693172478	0,198694587	-3,488632922	0,000485497	0,03237894
miR-6516-5p	277,1563237	-0,727069256	0,237402744	-3,062598368	0,002194243	0,067943181
miR-4496	44,10291296	-0,87870588	0,271276832	-3,239148264	0,001198872	0,054218278
miR-4449	214,9659735	-0,909137089	0,309896923	-2,933675757	0,003349739	0,078492543
miR-4417	1436,338528	-1,029438473	0,340648914	-3,021992531	0,002511167	0,070231683
miR-2467-3p	18,48911448	-1,087694772	0,319649731	-3,4027708	0,000667062	0,039772725
miR-4800-3p	274,5572124	-1,35326688	0,444995874	-3,041077368	0,002357332	0,070231683

Tabla 2. Lista de miRNAs diferencialmente expresados en carcinoma metastásico. Se muestra para cada miRNA su log2FoldChange, p-valor y p-valor ajustado, entre otros parámetros.

	baseMean	log2FoldChange	lfcSE	stat	pvalue	padj
miR-424-3p	50,46611811	-2,165820741	0,527516116	-4,105695876	4,031E-05	0,05713766
miR-503-5p	43,65696063	-2,16926938	0,551330072	-3,934611028	8,33315E-05	0,05713766
miR-424-5p	164,3630686	-2,171756536	0,547883831	-3,963899667	7,37353E-05	0,05713766