



UNIVERSITAT  
POLITÈCNICA  
DE VALÈNCIA

**DEPARTAMENTO DE BIOTECNOLOGÍA**

**Tesis Doctoral**

**ANÁLISIS DE MICROARNS EN  
CÁNCER DE PULMÓN NO  
MICROCÍTICO**

**SANDRA GALLACH GARCIA**

**DIRECTORES:**

**DR. CARLOS CAMPS HERRERO**

**DRA. ELOÍSA JANTUS LEWINTRE**

**Septiembre 2017**





VNIVERSITAT  
E VALÈNCIA



H.R.G. CONSORCI  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA

**CARLOS CAMPS HERRERO**, Dr. por la Universidad de Valencia, Profesor Titular del Departamento de Medicina de la Universidad de Valencia y Jefe del Servicio de Oncología del Hospital General Universitario de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. Sandra Gallach Garcia, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título **“Análisis de microARNs en cáncer de pulmón no microcítico”**. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, 15 de Mayo de 2017.



Fdo.: Carlos Camps  
Profesor Titular de Medicina  
Facultad de Medicina  
Universitat de València

Prof. Carlos Camps Herrero

D.N.I.: 22517012N





FUNDACIÓ  
INVESTIGACIÓ  
HOSPITAL GENERAL  
UNIVERSITARI  
VALÈNCIA




UNIVERSITAT  
POLITÀCNICA  
DE VALÈNCIA

**ELOÍSA JANTUS LEWINTRE**, Dra. por la Universidad de Valencia, Jefa del Laboratorio de Oncología Molecular de la Fundación del Hospital General Universitario de Valencia y Profesora Asociada del Departamento de Biotecnología de la Universidad Politécnica de Valencia.

CERTIFICA:

Que Dña. Sandra Gallach Garcia, Licenciada en Biología, ha realizado bajo mi dirección la Tesis Doctoral que lleva por título **“Análisis de microARNs en cáncer de pulmón no microcítico”**. Dicha tesis reúne todos los requisitos necesarios para su juicio y calificación.

En Valencia, 15 de Mayo de 2017.

  
Dra. Eloisa Jantus Lewintre  
D.N.I: 24474835Y



## AGRADECIMIENTOS

Este es el único espacio del documento donde no existen formalismos, es un rincón íntimo donde afloran sentimientos que en ocasiones llevan tiempo reprimidos y que en poco espacio se deben plasmar. Hoy a pocos días de presentar el borrador de mi tesis doctoral me encuentro escribiendo estas líneas y con lo reservada que soy para expresar mis sentimientos me está costando horrores escribir.

Me gustaría expresar mi más sincero agradecimiento a todas las personas que durante estos años han estado a mi lado, y que de alguna forma han contribuido a la realización de esta tesis doctoral.

En primer lugar, querría agradecer al Dr. Carlos Camps el haberme permitido formar parte de su equipo, que con el tiempo he visto crecer, no solo a nivel humano sino también a nivel científico. Por sus sabios consejos, su nivel de exigencia y su preocupación diaria porque todo salga perfecto.

A la Dra. Eloisa Jantus, por ser mi guía en el laboratorio, por sus consejos, por su visión crítica, y su rigor científico, que me han ayudado no solo en la ejecución de esta tesis, sino en el resto de proyectos que he tenido la oportunidad de desarrollar a su lado. Gracias por ser un ejemplo para todo el personal del laboratorio.

Agradecer a los profesionales que forman parte del Servicio de Oncología Médica del Hospital General Universitario de Valencia, sobretodo médicos y *data managers* su colaboración en este trabajo. Además, me gustaría extender el agradecimiento a los servicios de Cirugía Torácica y de Anatomía Patológica.

Y por supuesto a todos y cada uno de mis compañeras/os de laboratorio con los que tanto tiempo he compartido. Desde los que ya no forman parte del grupo hasta los que se han incorporado recientemente. A Elena y a Marta, que dejaron de ser compañeras para pasar a ser amigas. Gracias chicas por vuestro apoyo incondicional y por vuestros consejos, siempre seréis mis *oncogirls*. A la gran Dra. Silvia Calabuig, por su ayuda incesante, su ánimo constante y sus críticas constructivas. Gracias por tu tiempo. A Alejandro, porque es un placer compartir momentos contigo, por panicar juntos, por ayudarme en lo que he necesitado, eres muy grande. A Eva, por tu carácter,

por estar ahí cuando he necesitado tú ayuda y por los buenos ratos que hemos vivido y los que nos quedan..., Eva no cambies. A Marais, porque aunque te hacemos enfadar, sigues cuidándonos a todos, por tu continua ayuda, eres un sol. A Elena, por su paz, su tranquilidad, su disponibilidad. A Franklin, Héctor, Bruno y Clara, que aunque habéis llegado en la fase final de mi trabajo me habéis hecho el día a día más llevadero. A todos los alumnos de prácticas porque aunque parezca que no, cada uno ha aportado su granito de arena en este laboratorio.

A les meues amigues de sempre, les del poble, eixe poble que em va vore crèixer i que vaig deixar per llaurar-me un futur i al que torne quasi tots els caps de semana per no perdre les arrels, Vallada. Gràcies xiques pel vostre recolçament.

Pero si a alguien le he de dedicar esta tesis, es a mi familia, lo más importante en mi vida. Agradecer a mis padres todo lo que han hecho y siguen haciendo por mí, por su amor incondicional, por la educación que me han regalado y por privarse de muchas cosas para darles lo mejor a sus hijas. A Carla, mi hermana, por creer en mí, por animarme día a día y por estar siempre ahí. Víctor, gracias por sufrirme todo este tiempo, por todos estos años juntos, por ayudarme en todo lo que puedes. Contigo a mi lado el camino ha sido menos duro. A los dos motores que dan sentido a mi vida, Aleix y Aitana. Porque estos últimos meses han sido duros para todos y os debo mucho tiempo que poco a poco os iré devolviendo.

Finalmente me gustaría hacer una mención especial a los pacientes y sus familiares, ya que su desinteresada colaboración ha permitido tanto la realización de esta tesis como el continuo avance en la investigación contra el cáncer.



## Resumen

El cáncer de pulmón es una de las principales causas de muerte relacionada con cáncer en el mundo, siendo el tercer tipo de cáncer más común. El cáncer de pulmón no microcítico (CPNM) representa casi el 85% de todos los cánceres de pulmón y la supervivencia a los 5 años es reducida. Los microARNs (miARNs) son un grupo de ARNs no codificantes de pequeño tamaño que regulan postranscripcionalmente la expresión génica y que por tanto están involucrados en procesos esenciales de la célula, encontrándose desregulados en muchas enfermedades incluida el cáncer. Como consecuencia, existe un creciente interés en estudiar su papel como posibles nuevos biomarcadores en cáncer.

Por todo ello, el principal objetivo de esta tesis doctoral es analizar la expresión diferencial de miARNs en un grupo prueba de pacientes mediante secuenciación masiva para posteriormente validar el hallazgo en un grupo independiente de pacientes usando una técnica más sencilla como es la RTqPCR y evaluar su posible correlación con las variables clínico-patológicas y pronósticas en pacientes con CPNM.

El análisis mediante secuenciación masiva reveló que 39 miARNs estaban diferencialmente expresados en tejido tumoral: 28 sobreexpresados y 11 infraexpresados. 22 de estos miARNs se validaron mediante RTqPCR en una cohorte independiente. Posteriormente, los análisis de supervivencia revelaron que dos miARNs, miR-21 y miR-188, se relacionaron con pronóstico. Además, el grupo de pacientes con elevada expresión de ambos miARNs (miR-21, miR-188) presentaba una supervivencia libre de enfermedad (SLE) y una supervivencia global (SG) más cortas que cada miARN analizado individualmente. El análisis multivariante de regresión de Cox reveló que la firma combinada puede considerarse como un biomarcador pronóstico independiente en este grupo de pacientes.

Por tanto se puede concluir que la tecnología de secuenciación masiva puede identificar específicamente miARNs desregulados en CPNM en estadios resecables. Además la sobreexpresión del miR-21 y el miR-188 se correlacionó con un peor pronóstico, y la firma combinada de ambos (miR-21<sup>alto</sup>- miR-188<sup>alto</sup>) representó un nuevo biomarcador pronóstico independiente en CPNM.



## Summary

Lung cancer is the leading cause of death cancer-related worldwide, and is the third most common cancer type. The non-small cell lung cancer (NSCLC) comprises almost 85% of all lung cancers and the 5-year survival rate remains poor. The microRNAs (miRNAs) are a class of small non-coding RNAs that regulate post-transcriptionally the gene expression, being involved in essential processes of the cell. Deregulated miRNAs have been found in many diseases, including cancer, and as a result, there is a growing interest in studying their role as potential biomarkers.

The main objective of this doctoral thesis is to analyze the differential expression of miRNAs in a patient training group by next generation sequencing (NGS) to later validate the findings in an independent set of patients using a less complex technique, such as RTqPCR and evaluate its possible correlation with clinical-pathological and prognostic variables. Likewise, this will allow us to know in greater depth the profile of miRNAs in patients with NSCLC.

The analysis by NGS showed 39 miRNAs differentially expressed in tumoral tissue: 28 upregulated and 11 downregulated. 22 of these miRNAs were validated by RTqPCR in a validation set. Later, survival analyses revealed that two miRNAs, miR-21 and miR-188, were related to prognosis. Furthermore, subgroup of patients with elevated expression levels of both miRNAs (miR-21, miR-188) presented a shorter relapse free survival (RFS) and overall survival (OS) than each miRNA individually. The multivariate Cox regression analysis revealed that combined signature could be considered as an independent prognosis biomarker in this group of patients.

Therefore, it can be concluded that NGS technology can specifically identify deregulated miRNAs in resected early-stage NSCLC. Moreover, miR-21 and miR-188 overexpression correlated with a worse prognosis and combined signature for both miRNAs (miR-21<sup>high</sup>- miR-188<sup>high</sup>) represent a novel independent prognosis biomarker in NSCLC.



## Resum

El càncer de pulmó es una de les principals causes de mort relacionades amb càncer al món, sent a més a més el tercer tipus de càncer més comú. El càncer de pulmó no microcític (CPNM) representa quasi el 85% de tots els casos de càncer de pulmó i la supervivència als 5 anys continua sent molt baixa. Els microARNs (miARNs) són un grup d'ARNs no codificants de petit tamany que regulen postranscripcionalment l'expressió gènica i que per tant estàn involucrats en processos fonamentals de la cèl·lula, trobant-se desregulats en moltes malalties inclosa el càncer. Com a conseqüència, existeix un creixent interès en estudiar el seu paper com possibles nous biomarcadors en càncer.

Per tot açò, el principal objectiu d'esta tesi doctoral és analitzar l'expressió diferencial de miARNs en un grup prova de pacients mitjançant seqüenciació massiva per a posteriorment validar la trobada en un grup independent de pacients utilitzant una tècnica més senzilla com és l'RTqPCR i evaluar la seu possible correlació amb les variables clinico-patològiques i pronòstiques en pacients amb CPNM.

L'anàlisi mitjançant seqüenciació masiva revelà que 39 miARNs estaven diferencialment expressats en teixit tumoral: 28 sobreexpressats i 11 infraexpressats. 22 d'aquests miARNs van ser validats mitjançant RTqPCR en un grup independent. Posteriorment, les anàlisis de supervivència revelaren que dos miARNs, miR-21 i miR-188, es relacionaren amb pronòstic. A més a més, el grup de pacients amb elevada expressió de tots dos miARNs (miR-21, miR-188) presentava una supervivència lliure de recaiguda (SLR) y una supervivència global (SG) més curtes que cadascun dels miARNs individualment. L'anàlisi multivariant de regressió de Cox revelà que la firma combinada pot considerar-se com un biomarcador pronòstic independent en aquest grup de pacients.

Per tant, se pot concloure que la tecnologia de seqüenciació masiva pot identificar específicament miARNs desregulats en CPNM en estadis resecables. A més, la sobreexpressió del miR-21 i miR-188 correlacionava amb un pitjor pronòstic, i la firma combinada de tots dos (miR-21<sup>alt</sup>-miR-188<sup>alt</sup>) va representar un nou biomarcador pronòstic independent en CPNM.



## **ABREVIATURAS**

ADC: Adenocarcinoma

AGO: Proteínas de la familia Argonauta

AIS: Adenocarcinoma in situ

ALK: Quinasa del linfoma anaplásico

APAF1: Factor activador de la peptidasa apoptótica 1

APC: del inglés, *Adenomatous polyposis coli*

ARNm: Ácido ribonucleico mensajero

ARNi: ARN de interferencia

ATG5: Gen de autofagia 5

BAX: Regulador de apoptosis X asociado a BCL2

BCL2: Linfoma 2 de célula B

BIM: *BCL2 like 11*

BMF: Factor modificante de Bcl2

BRAF: Proto-oncogén B-Raf, serina/treonina quinasa

CAGR: Regiones genómicas asociadas a cáncer

CDC25: 25C del ciclo de división celular

CDCP1: Proteína 1 que contiene dominio CUB

CPM: Cáncer de pulmón microcítico

CPNM: Cáncer de pulmón no microcítico

DCK: Deoxicitidina quinasa

DGCR8: Región crítica 8 del Síndrome de DiGeorge

EBUS: Ecografía endobronquial

E2F1: Factor de transcripción E2F 1

E2F3: Factor de transcripción E2F 3

E2F5: Factor de transcripción E2F 5

EGFR: Receptor de factor de crecimiento epidérmico

EMLA4: Gen de la proteína asociada a microtúbulos de equinodermo 4

EMT: Miembro 3 de la familia de portadores de soluto 22

EMT: Transición epitelio-mesenquima

ERCC1: ERCC reparación de escisión 1, subunidad no catalítica de la endonucleasa.

ERK: Proteína quinasa activada por mitógeno 1 (MAPK1)

EUS: Ultrasonido endoscópico

FGFR1: Receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos

GSTP1: Glutatión S-Transferasa P1

HER2: Receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2

HMGA2: Grupo de alta movilidad AT-hook 2

IC: Intervalo de confianza

ITK: Inhibidor tirosina quinasa

KRAS: del inglés, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*

LCC: Carcinoma de células grandes

LOH: Pérdida de heterocigosidad

MAP kinasas: Proteína quinasa activada por mitógeno

MDC1: Mediador de la proteína 1 del punto de control de daño del ADN

MEK: Proteína quinasa activada por mitógeno 1

MET: Proto-oncogén MET, receptor tirosina quinasa

MYC: Proto-oncogén MYC

NRAS: Oncogén homólogo del Neuroblastoma RAS Viral

ND: No disponible

NE: No especificado (NE, not specified)

P27: Subunidad 26S del proteasoma, no ATPasa 9

TP53: Proteína tumoral p53

PD1: Muerte celular programada 1

PDCD4: Muerte celular programada 4

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas

PDL1: Ligando de Muerte celular programada 1

PED= Miembro 1 de la familia de portadores de soluto 2.

PET: Tomografía por emisión de positrones

PKCE: Proteína quinasa C épsilon.

PTEN: Gen homólogo de la fosfatasa y tensina

PIK3CA: Subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa



PLK1: del inglés, *Polo like kinase 1*

PPPAC2: Subunidad catalítica alfa de la proteína fosfatasa 2

PS: Estado funcional (del inglés, *performance status*)

RAP1A: RAP1A, miembro de la familia del oncogén RAS

RB1: Retinoblastoma

RECIST: Criterios de evaluación de respuesta para tumores sólidos

RET: Proto-oncogén RET

RIN: Número de integridad del ARN

ROS1: Proto-oncogén ROS 1, receptor tirosina quinasa

RTqPCR: PCR cuantitativa a tiempo real (del inglés)

SCC: Carcinoma de células escamosas o epidermoide.

SG: Supervivencia Global

SLE: Supervivencia libre de enfermedad

SMAD4: Miembro 4 de la familia SMAD

SRC: Proto-oncogén SRC, tirosina quinasa no receptora.

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TAC: Tomografía computerizada de tórax

TIMP3: Inhibidor tisular de la metaloproteinasa 3

TKR: Transcetolasa 1

TNFAIP1: Factor de necrosis tumoral alfa-inducido por la proteína 1

TNM: Tumor/Nódulos/Metástasis

UTR: Región no traducida

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular

XIAP: Inhibidor de la apoptosis ligado a X

WT: Nativo, salvaje (del inglés, *wild type*)



# ÍNDICE

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....                                | <b>1</b>  |
| 1. EL CÁNCER .....  | 3         |
| 1.1. CONCEPTO DE CÁNCER.....                                | 3         |
| 1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER.....                     | 3         |
| 2. EL CÁNCER DE PULMÓN .....                                | 7         |
| 2.1. EPIDEMIOLOGÍA.....                                     | 7         |
| 2.2. FACTORES DE RIESGO .....                               | 9         |
| 2.3. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA.....                   | 11        |
| 2.4. DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN.....          | 12        |
| 2.5. TRATAMIENTO .....                                      | 15        |
| 2.6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN.....      | 16        |
| 3. MICROARNs Y CÁNCER.....                                  | 21        |
| 3.1. DEFINICIÓN E HISTORIA.....                             | 21        |
| 3.2. NOMENCLATURA.....                                      | 23        |
| 3.3. BIOGÉNESIS.....  | 26        |
| 3.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA .....                            | 29        |
| 3.4.1. MiARNs intergénicos .....                            | 29        |
| 3.4.2. MiARNs intragénicos .....                            | 29        |
| 3.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS MIRNAS .....  | 32        |
| 4. PAPEL DE LOS MICROARNs EN CÁNCER .....                   | 35        |
| 4.1. MIARNs COMO SUPRESORES DE TUMORES.....                 | 38        |
| 4.2. MIARNs COMO ONCOGENES.....                             | 39        |
| 5. MIARNs EN CÁNCER DE PULMÓN .....                         | 40        |
| 5.1. MIARNs COMO BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE PULMÓN ..... | 42        |
| 5.2. MIARNs EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN.....     | 46        |
| <b>II. OBJETIVOS</b> .....                                  | <b>49</b> |
| <b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....                      | <b>53</b> |
| 1. PACIENTES Y MUESTRAS .....                               | 55        |
| 1.1. PACIENTES .....  | 55        |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 1.2.       | MUESTRAS .....  | 55        |
| 2.         | EXTRACCIÓN DE ARN Y ADN.....  | 55        |
| 3.         | AISLAMIENTO DE ARN DE PEQUEÑO TAMAÑO .....  | 56        |
| 4.         | DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN EGFR .....                            | 57        |
| 5.         | DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN KRAS .....                            | 57        |
| 6.         | SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA .....                             | 59        |
| 7.         | SECUENCIACIÓN MASIVA .....  | 60        |
| 7.1.       | CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE ADNc A PARTIR DE ARN PEQUEÑO                     | 60        |
| 7.1.1.     | Hibridación y ligación del ARN.....   | 61        |
| 7.1.2.     | Transcripción reversa (RT).....   | 61        |
| 7.1.3.     | Purificación del ADNc .....   | 62        |
| 7.1.4.     | Selección del tamaño del ADNc.....  | 62        |
| 7.1.5.     | Amplificación del ADNc .....  | 63        |
| 7.1.6.     | Purificación del ADN amplificado .....  | 64        |
| 7.1.7.     | Evaluación del rendimiento y distribución del tamaño del ADN<br>amplificado ..... | 64        |
| 7.2.       | PREPARACIÓN DE LAS BEADS CON EL SISTEMA SOLID™ .....                              | 64        |
| 7.2.1.     | Preparar la PCR en emulsión (ePCR) .....  | 65        |
| 7.2.2.     | Rotura de la emulsión y lavado de las beads .....                                 | 67        |
| 7.2.3.     | Enriquecimiento de las beads .....  | 68        |
| 7.2.4.     | Modificación de los extremos 3' .....   | 68        |
| 7.3.       | PROCESO DE SECUENCIACIÓN .....  | 68        |
| 8.         | TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL.....                       | 69        |
| 8.1.       | TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT).....   | 70        |
| 8.2.       | PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RTqPCR).....                                      | 71        |
| 9.         | ANÁLISIS DE DATOS.....  | 74        |
| 9.1.       | ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO EN EL GRUPO PRUEBA E IN SILICO.....                       | 74        |
| 9.2.       | ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN LOS GRUPOS DE VALIDACIÓN E IN SILICO .....                | 77        |
| <b>IV.</b> | <b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>   | <b>79</b> |
| 1.         | ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA .....  | 81        |
| 1.1.       | CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....   | 81        |
| 1.2.       | EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y SELECCIÓN DEL ARN PARA SECUENCIAR ..                   | 82        |

|             |   |            |
|-------------|---|------------|
| 1.3.        | CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERIAS .....   | 82         |
| 1.4.        | ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA .....                            | 84         |
| 1.5.        | ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIARNs ENTRE MUESTRAS<br>TUMORALES Y NORMALES ..... | 86         |
| 1.6.        | ANÁLISIS FUNCIONALES - COHORTE DE PRUEBA .....  | 91         |
| 2.          | ANÁLISIS DE VALIDACIÓN.....   | 92         |
| 2.1.        | CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES.....   | 93         |
| 2.1.1.      | Análisis del estado mutacional de EGFR y KRAS.....  | 94         |
| 2.2.        | ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MIRNAs .....   | 95         |
| 2.2.1.      | Cuantificación y evaluación de la calidad .....   | 96         |
| 2.2.2.      | Análisis de validación de la expresión de miARNs .....                                      | 96         |
| 3.          | MIARNs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN CPNM.....   | 105        |
| 3.1.        | CORRELACIÓN CON VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS.....   | 105        |
| 3.2.        | CORRELACIÓN CON PRONÓSTICO .....  | 108        |
| 3.2.1.      | Variables clinicopatológicas .....  | 108        |
| 3.2.2.      | Análisis por subgrupos histológicos .....   | 109        |
| 3.2.3.      | MiARNs .....  | 110        |
| 3.2.4.      | Firmas pronósticas basadas en miARNs .....  | 121        |
| 3.2.5.      | Firmas pronósticas de miARNs en subgrupos histológicos .....                                | 122        |
| 3.2.6.      | Análisis multivariante .....  | 123        |
| 3.2.7.      | Análisis multivariante en subtipos histológicos .....                                       | 124        |
| 4.          | VALIDACIÓN IN SILICO DE LA FIRMA PRONÓSTICA DE CPNM .....                                   | 125        |
| 5.          | INTEGRACIÓN DE RESULTADOS .....   | 128        |
| <b>V.</b>   | <b>CONCLUSIONES.....</b>  | <b>133</b> |
| <b>VI.</b>  | <b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>   | <b>137</b> |
| <b>VII.</b> | <b>ANEXOS .....</b>   | <b>173</b> |
| 1.          | APROBACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO Y LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA<br>INSTITUCIÓN .....    | 175        |
| 2.          | FINANCIACIÓN .....  | 178        |
| 3.          | COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES .....                               | 178        |
| 4.          | PUBLICACIONES .....   | 181        |





# I. INTRODUCCIÓN





## 1. EL CÁNCER

### 1.1. CONCEPTO DE CÁNCER

El cáncer es un término genérico que se utiliza para designar a un conjunto heterogéneo de patologías de base genética que difieren en su histogénesis, morfogénesis, evolución clínica y pronóstico. Sin embargo, todas ellas se caracterizan por un crecimiento descontrolado y desordenado de las células neoplásicas, las cuales pueden adquirir la capacidad de movilizarse desde el tejido de origen, a través de los sistemas circulatorio y linfático, hacia diferentes tejidos u órganos dando lugar al proceso conocido como metástasis.

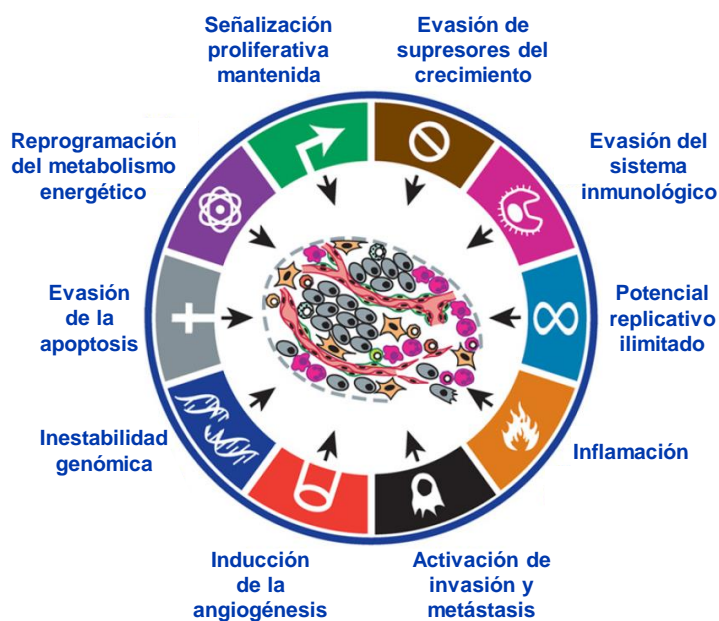
### 1.2. BIOLOGÍA MOLECULAR DEL CÁNCER

El cáncer se origina a partir de una acumulación gradual de cambios dinámicos en el genoma. Dichos cambios liberan a las células neoplásicas de los mecanismos homeostáticos que regulan la proliferación celular normal y controlada (Hahn and Weinberg, 2002), confiriéndoles además un tipo u otro de ventaja en el crecimiento que les permiten adquirir características diferentes a las células normales. En el año 2000, Hanahan y Weinberg (Hanahan and Weinberg, 2000) proponen un modelo basado en seis propiedades o alteraciones esenciales en la fisiología celular que son necesarias para que una célula normal se transforme en tumoral donde, cada uno de estos cambios fisiológicos, definidos como capacidades adquiridas durante el desarrollo del tumor, representan una vía de escape de un mecanismo de defensa contra el cáncer en células y tejidos, y además son compartidas por todos los tipos celulares. Más tarde, en el año 2011 estos mismos autores proponen la necesidad de añadir cuatro propiedades más a las ya descritas anteriormente. Además, postulan que debido a la complejidad de la biología tumoral aparte de abarcar estas características esenciales también se debe tener en cuenta la contribución del microambiente tumoral (Hanahan and Weinberg, 2011).

Estas diez características se detallan a continuación (Figura 1):

**1. Señalización proliferativa mantenida:** Las células requieren señales de crecimiento mitogénicas para poder pasar de un estado quiescente a un estado proliferativo. Estas señales son transmitidas al interior celular por receptores transmembrana a los que se unen distintos tipos de moléculas de señalización, como

son los factores de señalización solubles, los componentes de la matriz extracelular, y las moléculas de adhesión/ interacción célula-célula. Las células normales no pueden proliferar en ausencia de estas señales estimuladoras. Sin embargo las células tumorales pueden crecer sin dichas interacciones ya que son capaces por un lado de generar muchas de sus propias señales de crecimiento, y por otro activar intrínsecamente a los receptores transmembrana en ausencia de ligando, reduciendo así su dependencia de la estimulación desde el microambiente del tejido normal.



**Figura 1. Propiedades del cáncer.** Esta imagen representa las capacidades de las células cancerosas propuestas por Hanahan y Weinberg (Modificado y traducido de Hanahan and Weingerg, 2011).

**2. Evasión a los supresores del crecimiento:** En el tejido normal, son múltiples las señales antiproliferativas que tienen lugar para mantener la quiescencia celular o la homeostasis tisular. Estas señales inhibitoras del crecimiento, junto con su actividad, son recibidas por receptores celulares transmembrana acoplados a cascadas de señalización intracelulares. Por ejemplo, las señales antiproliferativas son finalmente canalizadas a través de la proteína retinoblastoma (RB1). A nivel molecular el gen *RB1* juega un papel muy importante, por eso en muchos tumores aparece mutado. En las células neoplásicas la disrupción de la vía de *RB1* permite la liberación de factores de transcripción que controlan la expresión de genes esenciales para la progresión desde la fase G1 a la fase S del ciclo celular. Esto permite la proliferación celular y hace a las

células insensibles frente a los factores que evitan el crecimiento y que normalmente actúan a lo largo de esta vía.

3. **Evasión de la apoptosis:** La capacidad de las células tumorales para expandirse en número está determinada no solo por la tasa de proliferación celular sino también por la tasa de muerte celular, donde la apoptosis representa una fuente importante de esta tasa. La resistencia a la apoptosis puede ser adquirida por las células tumorales mediante varias estrategias, siendo la más común la pérdida de función de gen supresor de tumores *TP53* (gen de la proteína tumoral p53) que funciona como un regulador proapoptótico.

4. **Potencial replicativo ilimitado:** Las células de los mamíferos presentan un programa autónomo e intrínseco que limita su multiplicación. Hayflick L., demostró que las células tienen un potencial replicativo finito restringido a un cierto número de duplicaciones, lo que se conoce como límite de Hayflick, sobrepasado dicho límite las células dejan de crecer y entran en senescencia (Hayflick, 1997). Dicho proceso es debido a la pérdida de la función protectora de los telómeros, sin embargo en las células neoplásicas se ha descrito que la longitud de los telómeros se mantiene en la mayoría de tipos de cáncer (Shay and Bacchetti, 1997) debido a una mayor actividad de la enzima telomerasa adquiriendo potencial replicativo ilimitado.

5. **Inducción de angiogénesis:** tanto las células normales como las tumorales necesitan el aporte de oxígeno y los nutrientes para el funcionamiento y la supervivencia celular, por tanto es de vital importancia que el proceso de angiogénesis tenga lugar correctamente. Por todo esto, la generación de nuevos vasos sanguíneos es imprescindible para que el tumor pueda crecer (Folkman, 2003). La angiogénesis está regulada por el equilibrio entre factores inductores y factores inhibidores de la misma y los tumores tienen la capacidad de activar la angiogénesis inclinando la balanza a favor de los inductores de este proceso.

6. **Activación de invasión tisular y metástasis:** La capacidad de invasión permite a las células tumorales escapar de la masa tumoral primaria y colonizar otras partes del cuerpo (metástasis). El éxito en estos procesos depende en parte de la adquisición de las cinco características anteriores así como también de complejos cambios en las

relaciones físicas entre las células y su microambiente y la activación de las proteasas extracelulares.

**7. Inestabilidad genómica y mutación:** La sucesión secuencial de diferentes alteraciones en el genoma de las células neoplásicas es la causa de la adquisición de las diferentes características mencionadas anteriormente. Los sucesivos pasos en la progresión tumoral se pueden entender como una secuencia de expansiones clonales, donde cada una de ellas es generada por la adquisición de una mutación que resulta en una ventaja selectiva.

**8. Inflamación:** Está demostrado que la generación de sustancias químicas muy reactivas durante los procesos inflamatorios observados en estadios tempranos del cáncer, tiene un marcado efecto genotóxico sobre las células, produciendo inestabilidad genética y con ello permitiendo la acumulación de alteraciones moleculares. Además existen evidencias de que aquellos tejidos crónicamente inflamados son más susceptibles a desarrollar tumores.

**9. Reprogramación del metabolismo energético:** El proceso neoplásico no solo se produce la desregulación del control de la proliferación celular, sino también los ajustes en el metabolismo energético con el fin de estimular el crecimiento y la división celular. Otto Warburg fue el primero en observar una característica anómala en el metabolismo energético de las células cancerosas que denominó “glicólisis aerobia” (Warburg, 1956).

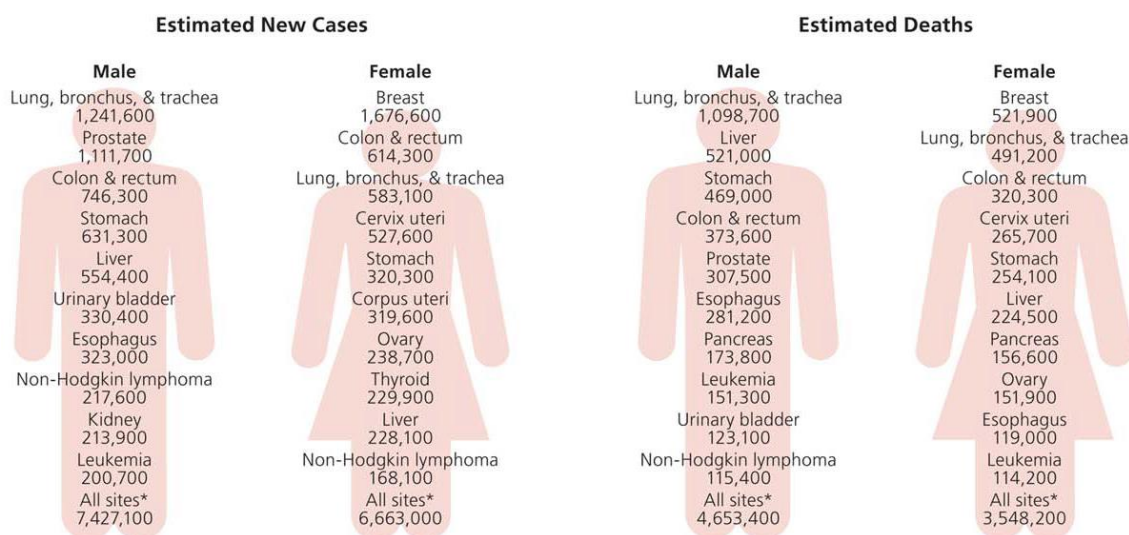
**10. Evasión del sistema inmunológico:** existen evidencias que constatan el desarrollo de diferentes estrategias por parte de las células tumorales para evitar su detección por parte del sistema inmune además de ser capaces de limitar el alcance de la destrucción inmunológica y por tanto de evadir su erradicación. Se podría decir que estas células son altamente inmunogénicas pudiendo evadir su destrucción inmunológica mediante la desactivación de diferentes componentes del sistema inmune.

## 2. EI CÁNCER DE PULMÓN

### 2.1. EPIDEMIOLOGÍA

El cáncer de pulmón es el más frecuentemente diagnosticado y la principal causa de muerte relacionada con cáncer en el mundo con más de 1,8 millones de nuevos casos y más de 1,5 millones de muertes estimadas en 2012 a nivel global (Figura 2) (Torre et al., 2015).

En Europa se registraron 3,45 millones de nuevos casos de cáncer y 1,75 millones de muertes durante el año 2012 (Ferlay et al., 2013), siendo el cáncer de pulmón el cuarto tumor más común y el primero en cuanto a muertes se refiere en la población general. Además, aunque la mortalidad por cáncer ha disminuido en Europa en la última década, el cáncer de pulmón en mujeres es una excepción en la mayoría de países europeos, incluido España, aumentando la mortalidad un 56% entre 2002 y 2012 (Malhotra et al., 2016). Este aumento persistente de la mortalidad por cáncer de pulmón refleja el patrón de consumo de tabaco en mujeres en los países de Europa occidental (Bosetti et al., 2013; Ferlay et al., 2015).

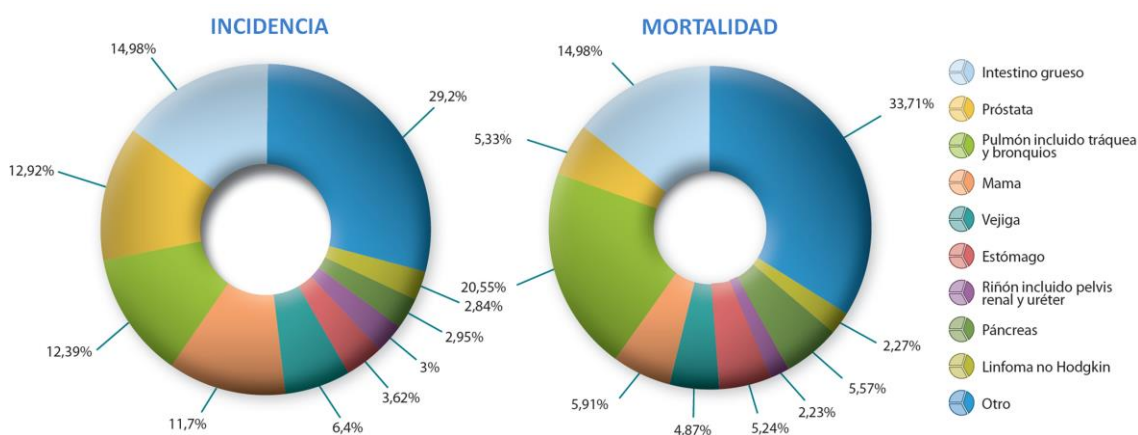


**Figura 2. Incidencia estimada y mortalidad en el mundo debido al cáncer según el género.** (Modificado de Torre et al., 2015)

En España, el número de nuevos casos de cáncer diagnosticados en 2012 fue 215.534, de los cuales 128.550 se dieron en varones y 86.984 en mujeres. El tipo de tumor más frecuente en ambos sexos es el colorrectal (32.240 nuevos casos en 2012),

siendo el tercero el de pulmón (28.347). Así, entre las mujeres el tumor más frecuente es el de mama, y el de pulmón ocupa el cuarto lugar. En cuanto a la mortalidad, el cáncer de pulmón ocupa el primer lugar con un total de 21.118 muertes en 2012 (Figura 3). Destacando que en el último informe publicado por la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), a partir de datos proporcionados por el Instituto Nacional de Estadística (INE) y por los grupos cooperativos EUROCARE (EUROCARE-5) y REDECAN (Red Española de Registros de Cáncer), así como los de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), a través de la página web EUCAN y GLOBOCAN, advierten que en 2015 ya se superaron las muertes estimadas para el 2020 en España.

En general, la supervivencia media a los 5 años del cáncer de pulmón permanece en 9.5% (de Groot and Munden, 2012; Bosetti et al., 2013; Malvezzi et al., 2014; Lortet-Tieulent et al., 2014) esto se debe principalmente a que en el momento del diagnóstico, en un gran porcentaje de pacientes la enfermedad se presenta en estadios avanzados y las opciones de tratamiento son reducidas pese a los grandes avances en el diagnóstico precoz y en los tratamientos terapéuticos.



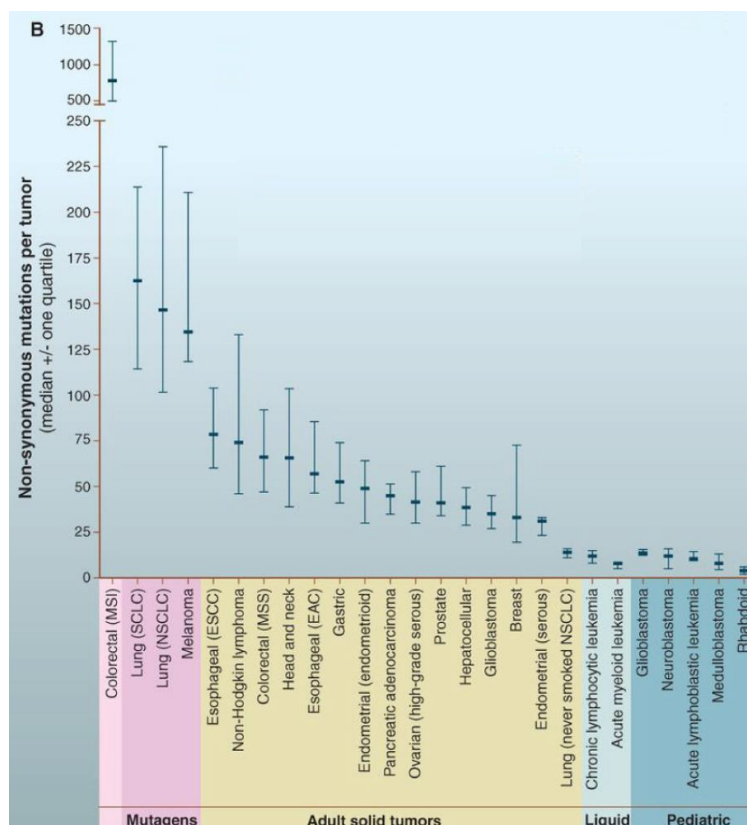
**Figura 3. Incidencia y mortalidad del cáncer en España en 2012.** Las Cifras del Cáncer en España 2016 (SEOM).

## **2.2. FACTORES DE RIESGO**

El tabaquismo es la principal causa del cáncer de pulmón, siendo los componentes tóxicos del humo del tabaco los responsables del 85-90 % de estos tumores (Freedman et al., 2008; de Groot and Munden, 2012). El efecto carcinogénico del tabaco se demostró en estudios epidemiológicos llevados a cabo desde los años 50 y ha sido reconocido por salud pública y las autoridades reguladoras desde mediados de los años 60 (Wynder, 1997). Un gran número de estudios afirman que los fumadores tienen un riesgo entre 20 y 50 veces mayor de desarrollar esta patología en comparación con los no fumadores (Doll et al., 2004). Estas afirmaciones se confirmaron a nivel molecular mediante un estudio en el que se secuenciaron más de 200 tumores para analizar las mutaciones que presentaban. En el caso del cáncer de pulmón se vio que la exposición al humo de tabaco provoca una acumulación de mutaciones mucho mayor que en otros tumores no expuestos a carcinógenos químicos. Además, existen una media de aproximadamente 200 mutaciones por tumor, muy alejada de las 25-50 que se encuentran en otros tumores también muy frecuentes como el de mama o próstata. Por otra parte, el promedio de las mutaciones somáticas encontradas en pacientes fumadores es 10 veces superior a la de aquellos pacientes no fumadores (Figura 4) (Vogelstein et al., 2013). Además, el riesgo de padecer cáncer de pulmón aumenta en función de la intensidad y la duración de la exposición, esto es, en función del número de cigarrillos consumidos por día, el grado de inhalación, la edad de comienzo y el tipo de cigarrillos (Jemal et al., 2008; Sasco et al., 2004), y comienza a disminuir progresivamente 2 o 3 años después de haber dejado de fumar, continuando durante los siguientes 10 años, pero no llega nunca a igualarse al de los no fumadores (Ebbert et al., 2003; Peto et al., 2000).

Aun siendo el tabaco la principal causa de padecer cáncer de pulmón, no todas las personas fumadoras lo desarrollan, por lo que se ha sugerido la existencia de variaciones genéticas de susceptibilidad y predisposición interindividuales que podrían conferir un mayor o menor riesgo de padecer la enfermedad (Gorlova et al., 2006; Matakidou et al., 2005).





**Figura 4. Número medio de mutaciones somáticas encontradas en los cánceres humanos más representativos detectadas mediante estudios de secuenciación masiva.** En el cáncer de pulmón, el número medio de mutaciones somáticas que aparecieron en los fumadores es diez veces mayor que el número de mutaciones encontradas en los no fumadores (Modificado de Vogelstein et al., 2013).

Otros factores importantes que merecen ser citados por estar involucrados en el desarrollo del cáncer de pulmón son los carcinógenos ambientales u ocupacionales como el radón, arsénico, asbesto, sílice, metales pesados, hidrocarburos policíclicos aromáticos, amianto (carcinógeno ocupacional más relevante en España; IARC, 2012) y algunos metales como níquel, cromo, berilio, silicio o cadmio (Wild et al., 2009; Tyczynski et al., 2003; Fraumeni, 1982). Además, el tipo de dieta (con un alto contenido en grasas totales), el consumo frecuente de alcohol y el padecimiento de algunas enfermedades como es el caso de la fibrosis pulmonar difusa, son considerados también factores de riesgo (Hubbard et al., 2000; Bilello et al., 2002; Sawyers, 2013).

En cuanto a factores protectores, el tipo de dieta, sobretodo la rica en vitaminas, antioxidantes y carotenoides, y el ejercicio moderado parecen asociarse con cierta disminución del riesgo de padecer cáncer de pulmón (Molina et al., 2008; Vieira et al., 2016).

### 2.3. CLASIFICACIÓN ANATOMOPATOLÓGICA

El cáncer de pulmón se clasifica en cuatro tipos histológicos: el carcinoma microcítico de pulmón o de célula pequeña (CMP) (20% de los casos), el carcinoma epidermoide (SCC) (30%), el adenocarcinoma (ADC) (35-40%) y el carcinoma de células grandes (LCC) (alrededor de un 10%). Clínicamente, sin embargo, se agrupan básicamente en dos subgrupos fundamentales en función de su comportamiento clínico y biológico: el carcinoma microcítico de pulmón (CMP), sensible a los agentes citotóxicos y sin tratamiento quirúrgico; y el cáncer de pulmón no microcítico o de célula no pequeña (CPNM), que engloba a los carcinomas epidermoides, los adenocarcinomas y los carcinomas de células grandes, y cuyo principal tratamiento es la cirugía, siempre y cuando no exista diseminación (Travis, 2002).

El CMP se caracteriza por tener origen neuro-endocrino, estar compuesto por células pequeñas con escaso citoplasma y tener una localización peribronquial. Estos tumores tienen una evolución clínica muy agresiva y aparecen prácticamente en su totalidad en fumadores (Youlden et al., 2008). Presentan un comportamiento peculiar, con un crecimiento rápido, una elevada capacidad de generar metástasis y una significativa respuesta al tratamiento con quimio y radioterapia. Sin embargo, la incidencia de recidiva en los dos primeros años es muy elevada (Travis, 2002).

Por otra parte, el CPNM, se caracteriza por presentar células tumorales de mayor tamaño que las células pulmonares normales (de ahí su nombre), con citoplasma abundante y localización periférica o central en su mayoría. Su comportamiento biológico es muy diferente al CMP. Es un tumor que generalmente deriva del epitelio bronquial y presenta un crecimiento lento. Sus manifestaciones clínicas son muy variables en estadios tempranos, de modo que en un 70% de los casos diagnosticados, la enfermedad ya se encuentra en una fase avanzada. Además tiene una baja sensibilidad a la quimioterapia y radioterapia. Subtipos:

- **El carcinoma epidermoide o escamoso (SCC)** se origina en el epitelio de revestimiento y se localiza frecuentemente en los bronquios lobares o principales. Este subtipo está predominantemente vinculado al consumo de tabaco (Sakurai et al., 2004).

- **El adenocarcinoma (ADC)** deriva de las células broncoalveolares, y su diferenciación es glandular, secretando mucina. Generalmente proceden de bronquios más distales, por lo que suelen ser tumores periféricos y afectan a la pleura. Es por este motivo que son los más frecuentemente operables. En general presentan un peor pronóstico que el subtipo epidermoide (Travis et al., 2011). Debido a su gran incidencia se publicó una revisión de la clasificación histológica aportando cambios a la empleada hasta el momento, basada en una aproximación multidisciplinar, donde se incorporan cuestiones clínicas, moleculares, radiológicas y quirúrgicas, pero mayoritariamente está basada en el estudio histológico. Según esta clasificación se dividen en: lepidico, acinar, papilar, micropapilar, solido, invasivo, coloide, fetal, entérico, mínimamente invasivo y lesiones preinvasivas (Travis et al., 2015).

- **El carcinoma de células grandes (LCC)** es el menos frecuente dentro de los CPNM y presenta un pronóstico similar al adenocarcinoma. Generalmente se encuentra localizado en la periferia del pulmón, pero también puede encontrarse en localización central. En el examen macroscópico, a menudo aparecen como grandes tumores necróticos (Travis, 2002).

#### 2.4. DIAGNÓSTICO, PRONÓSTICO Y ESTADIFICACIÓN

El diagnóstico del cáncer de pulmón en estadios tempranos presenta dificultades debido a la ausencia de síntomas específicos de estos pacientes. Un número elevado de pacientes (70-75%) con cáncer de pulmón muestran enfermedad avanzada al momento del diagnóstico, cuando ya no es posible la intervención curativa (cirugía) y el 40% de los pacientes con CPNM tienen metástasis a distancia (Morgensztern et al., 2010). La sintomatología que suele llevar a la sospecha de cáncer de pulmón comprende: tos, dolor torácico, hemoptisis, disnea o pérdida de peso. Aunque la mayoría de los pacientes son inicialmente diagnosticados mediante radiografía de tórax, se dispone de una serie de tecnologías para la estadificación adicional, como la tomografía computerizada de tórax (TAC) o la tomografía por emisión de positrones (PET) que puede jugar un papel importante en la predicción y evaluación de futuras respuestas al tratamiento (Cuaron et al., 2012). Además, los avances en las técnicas broncoscópicas y el ultrasonido endoscópico (EUS) o la ecografía endobronquial (EBUS) permiten biopsiar el tumor. Dado que la detección sistemática de cáncer de pulmón

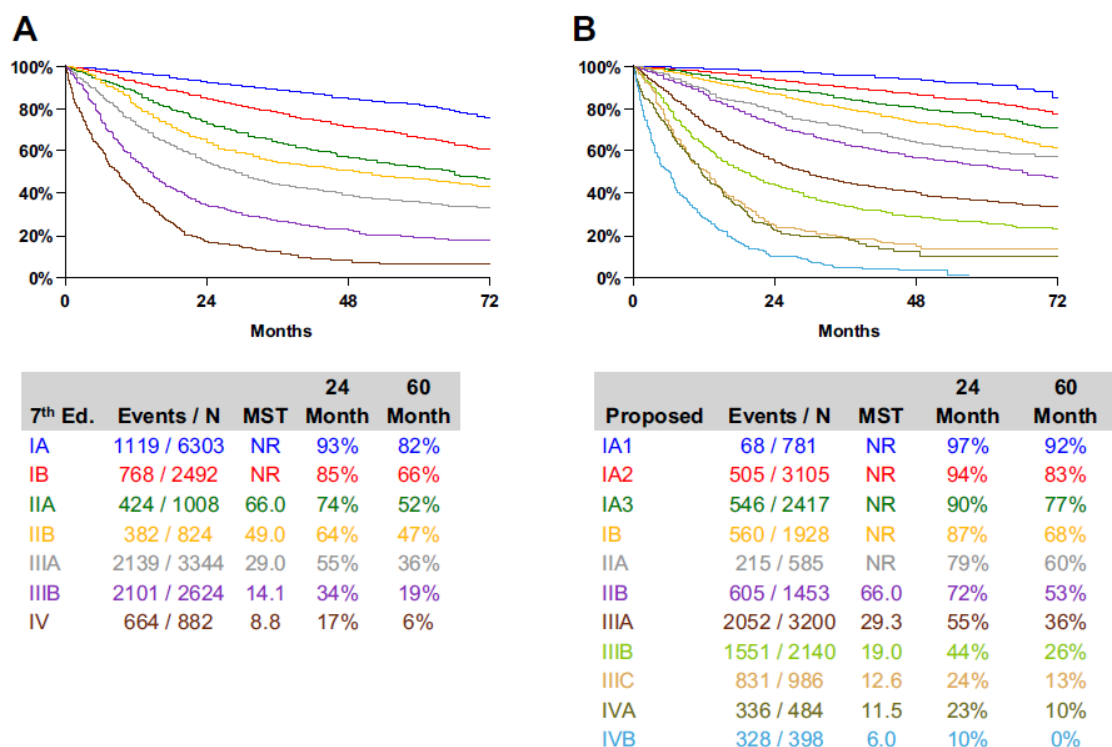
sigue siendo una opción muy costosa, existe un creciente interés en el desarrollo de modelos de riesgo o biomarcadores para predecir el cáncer de pulmón (Jantus-Lewintre et al., 2012).

La evaluación pronóstica es un factor importante a tener en cuenta al seleccionar un régimen de tratamiento adecuado. Las variables que se han asociado hasta ahora con el pronóstico pueden agruparse en diferentes categorías: a) relacionadas con el tumor, como la localización del tumor primario, el tipo celular y la extensión de la enfermedad; b) relacionadas con el paciente, tales como estado funcional, comorbilidad y sexo; y c) relacionadas con factores ambientales, como la nutrición y el hábito tabáquico (Goldstraw et al., 2011). La extensión anatómica de la enfermedad, descrita por la clasificación TNM (Tumor / Nódulos / Metástasis), es uno de los factores pronósticos más importantes en el cáncer de pulmón.

En la octava edición de la clasificación TNM, publicada este año, se clasifican los tumores de acuerdo a su tamaño de manera muy precisa, considerándose aquellos de más de 7 centímetros como T4. Además, se tiene en cuenta el número y localización de los ganglios afectados y la localización de las metástasis según se muestra en la Tabla 1 (Goldstraw et al., 2015). Aunque la clasificación del TNM proporciona información pronóstica (Figura 5), se necesita la confirmación histológica (incluyendo la caracterización molecular del tumor) para tomar decisiones relacionadas con el tratamiento del paciente.

**Tabla 1. Los descriptores T, N, M en la octava edición de la clasificación TNM para el cáncer de pulmón no microcítico.** T, tumor primario; N, afectación ganglionar regional; M, metástasis a distancia (Traducido de Goldstraw et al., 2015).

| <b>T: Tumor Primario</b>  |   |
|---|---|
| <b>Tx</b>   | El tumor primario no puede ser evaluado o se ha probado por presencia de células malignas en esputo o lavado bronquioalveolar pero no visualizado por imagen o broncoscopia   |
| <b>T0</b>   | No hay evidencia de tumor primario  |
| <b>Tis</b>  | Carcinoma <i>in situ</i>  |
| <b>T1</b>   | Tumor ≤ 3 cm en su lado más grande rodeado por pulmón o pleura visceral sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobular (no en el bronquio principal) <sup>a</sup>   |
| <b>T1a(mi)</b>  | Adenocarcinoma mínimamente invasivo <sup>b</sup>  |
| <b>T1a</b>  | Tumor ≤ 1 cm en su lado más grande <sup>a</sup>   |
| <b>T1b</b>  | Tumor > 1 cm pero ≤ 2 cm en su lado más grande <sup>a</sup>   |
| <b>T1c</b>  | Tumor > 2 cm pero ≤ 3 cm en su lado más grande <sup>a</sup>   |
| <b>T2</b>   | Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm o tumor con alguna de las siguientes características <sup>c</sup> .<br>- Afecta al bronquio principal independientemente de la distancia de la carina pero sin afectarla<br>- Invade la pleura visceral<br>- Se asocia a atelectasis o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hilar, afectando parte o la totalidad del pulmón |
| <b>T2a</b>  | Tumor > 3 cm pero ≤ 4 cm en su lado más grande  |
| <b>T2b</b>  | Tumor > 3 cm pero ≤ 5 cm en su lado más grande  |
| <b>T3</b>   | Tumor > 5 cm pero ≤ 7 cm en su lado más grande o asociado a nódulo(s) tumorales separados en el mismo lóbulo que el del tumor primario o directamente invade alguna de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo la pleura parietal y tumores del surco superior), nervio frénico, pericardio parietal   |
| <b>T4</b>   | Tumor > 7 cm en su lado más grande o asociado a nódulo(s) tumorales separados en un lóbulo ipsilateral diferente al del tumor primario o directamente invade alguna de las siguientes estructuras: diafragma, mediastino, corazón, grandes vasos, traquea, nervio laríngeo recurrente, esófago, cuerpo vertebral y carina   |
| <b>N: Afectación ganglionar regional</b>  |   |
| <b>Nx</b>   | Los ganglios regionales no pueden ser evaluados   |
| <b>N0</b>   | Ganglios regionales sin metástasis  |
| <b>N1</b>   | Metástasis en ganglios peribronquiales ipsilaterales i/o hiliares ipsilaterales y ganglios intrapulmonales, incluyendo afectación por extensión directa   |
| <b>N2</b>   | Metástasis en ganglio(s) mediastínicos y/o subcarinales ipsilaterales   |
| <b>N3</b>   | Metástasis en ganglio(s) mediastínicos contralaterales, hiliares contralaterales, escaleno ipsilateral o contralateral, o supraclaviculares   |
| <b>M: Metástasis a distancia</b>  |   |
| <b>M0</b>   | No metástasis a distancia   |
| <b>M1</b>   | Presencia de metástasis a distancia   |
| <b>M1a</b>  | Tumor con nódulo(s) separados en un lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o pericárdicos o derrame pericárdico o pleural maligno <sup>d</sup>   |
| <b>M1b</b>  | Metástasis única extratorácica <sup>e</sup>   |
| <b>M1c</b>  | Metástasis múltiples extratorácicas en uno o más órganos  |
| <b>Nota: Los cambios en la séptima edición están en negrita</b>   |   |
| <sup>a</sup> El tumor de extensión superficial poco común de cualquier tamaño con su componente invasivo limitado a la pared bronquial, que puede extenderse próximo al bronquio principal, también se clasifica como T1a   |   |
| <sup>b</sup> Adenocarcinoma solitario, ≤ 3 cm con un patrón predominantemente lepidico y ≤ 5 mm de invasión en cualquier foco.  |   |
| <sup>c</sup> Tumores T2 con estas características se clasifican como T2a si el tamaño es ≤ 4 cm en su lado más grande o el tamaño no puede ser determinado, y T2b si el tamaño es > 4 cm pero ≤ 5 cm en su lado más grande.   |   |
| <sup>d</sup> La mayoría de derrames pleurales (pericárdicos) en cáncer de pulmón son debidos al tumor. En algunos pacientes, sin embargo, los múltiples exámenes microscópicos del líquido pleural (pericárdico) son negativos para tumor y el líquido no es sanguinolento y ni un exudado. Cuando estos elementos y los juicios clínicos dictaminan que el derrame no está relacionado con el tumor, el derrame debe de ser excluido como un descriptor del estadiaje. |   |
| <sup>e</sup> Esto incluye afectación de un único ganglio a distancia (no regional).   |   |



**Figura 5. Información pronóstica relacionada con la clasificación TNM.** Supervivencia global expresada como mediana de supervivencia de pacientes con CPNM, clasificados por a) estadio clínico y b) estadio patológico, de acuerdo a la actualmente aprobada octava edición de la clasificación TNM (Goldstraw et al., 2015).

## 2.5. TRATAMIENTO

El tratamiento del cáncer de pulmón depende especialmente de la clasificación anatomopatológica, el estadio tumoral y el estado funcional (PS, del inglés *Performance status*). La cirugía es aún el tratamiento estándar para pacientes con estadios tempranos y buen PS, que cuenta con el 20-30% de pacientes diagnosticados de CPNM (Myrdal et al., 2001). Sin embargo, la radioterapia estereotáctica pulmonar ha emergido como un tratamiento alternativo para pacientes con estadios I-II considerados inoperables o que rechazan la cirugía (Robinson et al., 2013).

La terapia adyuvante después de cirugía con sales de platino en combinación con vinorelbina, etoposido o docetaxel aumenta las tasas de supervivencia en estadios tempranos de la enfermedad (Felip et al., 2010; Molina et al., 2008). Desde los inicios de los años 2000 diferentes ensayos clínicos han mostrado un aumento de la supervivencia global (SG) en pacientes con estadios avanzados, con diferentes esquemas de quimioterapia, basando la elección del tratamiento en los diferentes

subtipos histológicos del cáncer de pulmón y de las mutaciones conductoras que determinan la biología del tumor y predicen la eficacia del fármaco (Scagliotti et al., 2008). Actualmente, la quimioterapia estándar en adyuvancia para estadios avanzados es la combinación de un agente citotóxico de tercera generación, como gemcitabina, vinorelbina o paclitaxel, con un derivado del platino (Langer et al., 2010). La radioterapia también tiene un papel importante en el tratamiento curativo y paliativo de los pacientes con CPNM. Aunque puede ser indicado en pacientes con buen estado funcional y enfermedad no reseca, la intención paliativa sigue siendo su principal uso (Goldstraw et al., 2011).

En los últimos años, y con los avances en el conocimiento de la biología molecular del cáncer de pulmón, han surgido terapias específicas anti-diana, que han aumentado la supervivencia del paciente con CPNM en estadios avanzados y han disminuido la toxicidad derivada de la quimioterapia convencional. Un ejemplo de ello, fue la introducción de los ITKs (inhibidores de la tirosina quinasa), que marcaron un punto de inflexión en cuanto al tratamiento del CPNM. Sin embargo las resistencias a estos tratamientos aparecen al poco tiempo teniendo que abandonar dicho tratamiento (Peters et al., 2013; Soria et al., 2013; Rosell et al., 2009).

En las últimas décadas, la inmunoterapia se ha convertido en una opción muy atractiva para el tratamiento de varios tipos de cáncer. Consiste en activar el sistema inmune con el fin de inducir respuestas objetivas y la estabilización de la enfermedad. Entre las diferentes opciones posibles, el bloqueo de las moléculas de control inmune (*immunecheckpoints*) con anticuerpos monoclonales ha surgido como una estrategia prometedora. Aquí encontramos el pembrolizumab como tratamiento en primera línea en pacientes PD-L1 (ligando 1 de muerte celular programada 1) positivos y el nivolumab en segunda línea para pacientes con CPNM no escamoso (Borghaei et al., 2015; Brahmer et al., 2012; Reck et al., 2016).

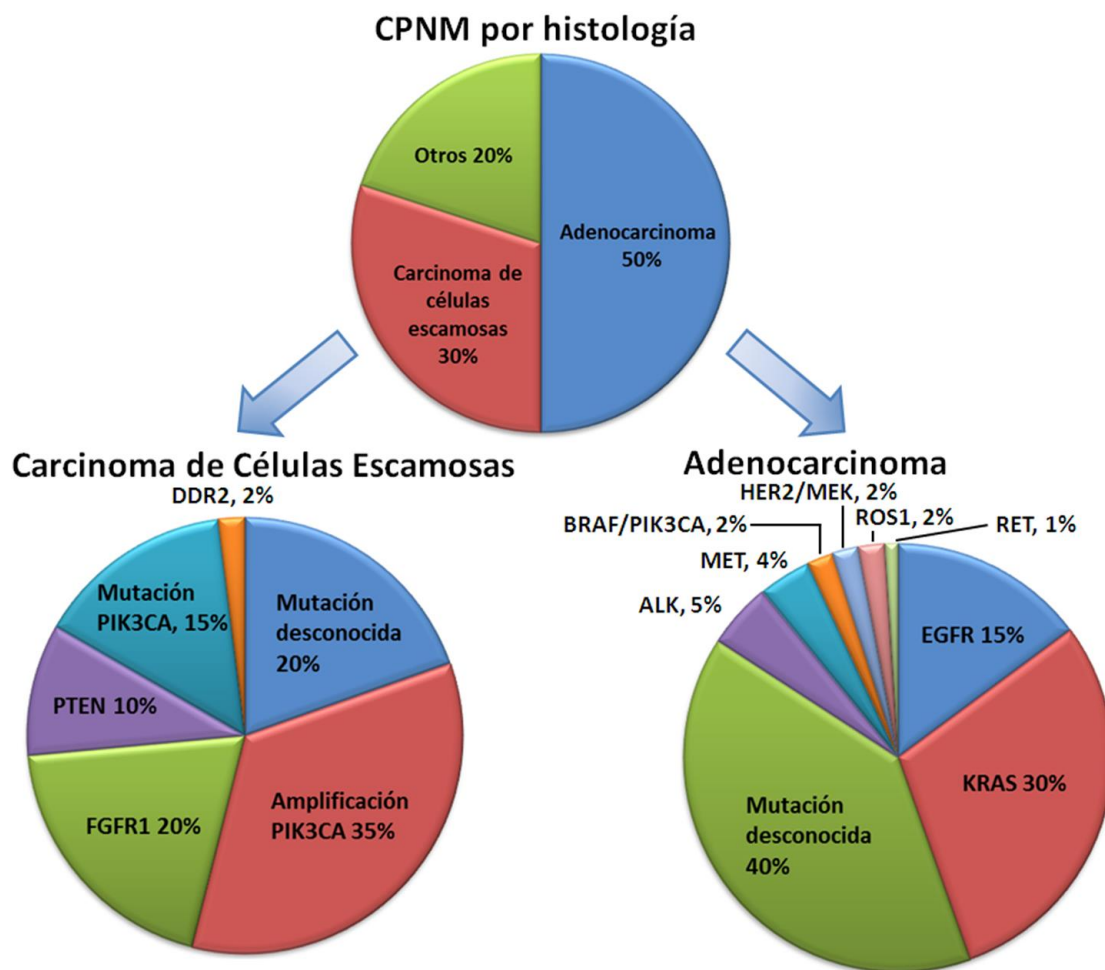
## 2.6. CLASIFICACIÓN MOLECULAR DEL CÁNCER DE PULMÓN

Durante las últimas décadas, se han logrado grandes avances en la comprensión de los mecanismos moleculares y celulares que inician, mantienen y favorecen la progresión del cáncer de pulmón. Estos avances han llevado al descubrimiento de nuevas terapias dirigidas y al desarrollo de nuevas estrategias de tratamiento. El CPNM

es uno de los tumores genómicamente más diversos y por lo tanto hay una variedad de subconjuntos de pacientes molecularmente definidos y caracterizados por conjuntos específicos de mutaciones conductoras o *driver* (Figura 6). Entre las mutaciones *driver*, existen algunas que han demostrado ser dianas terapéuticas muy interesantes. Ejemplos de ello son las alteraciones observadas en el gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (*EGFR*) y las traslocaciones que involucran al gen de la quinasa del linfoma anaplásico (*ALK*), particularmente en los casos de ADC. En la Figura 7 se muestra cómo ha evolucionado la clasificación del CPNM, desde una división basada en características histológicas, hasta una clasificación molecular, basada en la presencia de alteraciones genómicas que afectan a genes involucrados en el proceso carcinogénico.

**EGFR:** las alteraciones en dicho gen están implicadas en varios tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de pulmón. El gen *EGFR* codifica para una tirosina quinasa transmembrana con un dominio de unión extracelular y un componente intracelular que posee actividad quinasa intrínseca. La unión a su ligando conduce a la homo- o heterodimerización del receptor con otros miembros de la familia del EGFR y la activación de la actividad enzimática (Scagliotti et al., 2004). En CPNM, se han observado mutaciones del gen *EGFR*, las que se concentran en los exones que codifican para el dominio quinasa (exones 18, 19, 20y 21), principalmente deleciones en el exón 19 (aproximadamente 45% de todas las mutaciones encontradas), le siguen en frecuencia una mutación puntual con cambio de sentido en el exón 21 (L858R, representa aproximadamente el 40% de los casos). También se han identificado mutaciones menos comunes (que representan del 5-10% de los casos), incluyendo duplicaciones o inserciones que afectan al marco de lectura en el exón 20 (Kosaka et al., 2004; Okabe et al., 2007) y algunas mutaciones puntuales en el exón 18. En 2004, se demostró que las mutaciones en el gen *EGFR* determinaban la población que se beneficiaba del tratamiento con moléculas pequeñas con capacidad de inhibir la actividad quinasa (ITKs) del EGFR, mientras que las inserciones en el exón 20, o la mutación T790M (también en el exón 20) se detectaron en tumores que desarrollaron resistencias a este tipo de tratamientos (Lynch et al., 2004; Paez et al., 2004).

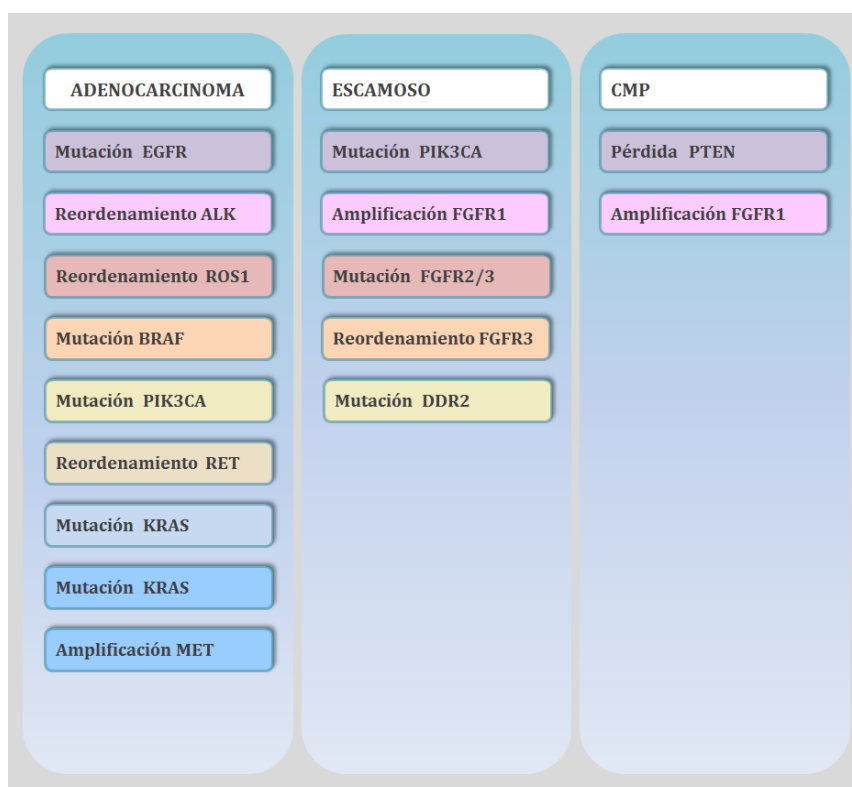




**Figura 6. Evolución de la clasificación del CPNM, de la clasificación histológica a la molecular.** *AKT*, AKT serina/treonina quinasa 1; *BRAF*, proto-oncogén B-Raf, serina/treonina quinasa; *EGFR*, receptor del factor de crecimiento epidérmico; *FGFR1*, receptor 1 del factor de crecimiento de fibroblastos; *HER2*, receptor del factor de crecimiento epidérmico humano 2; *KRAS*, del inglés, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; *MEK*, proteína quinasa activada por mitógeno 1; *MET*, proto-oncogén MET, receptor tirosina quinasa; *PIK3CA*, subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa; *PTEN*, gen homólogo de la fosfatasa y tensina; *RET*, ret proto-oncogén; *ROS1*, proto-oncogén ROS1, receptor tirosina quinasa (Traducido de Chan and Hughes, 2015).

**KRAS** (del inglés, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*): es parte de la familia del proto-oncogén *RAS*, que en humanos comprende *KRAS*, *NRAS* y *HRAS* y codifica una proteína G que juega un papel crítico en el control de las vías de transducción de señales. Estas vías regulan la proliferación celular, diferenciación y supervivencia. *KRAS* juega un papel crítico en las señales de transducción inducidas por varios receptores de factores de crecimiento incluyendo *EGFR*. Las mutaciones activadoras en los codones 12 y 13 de *KRAS* son las alteraciones oncogénicas más frecuentes identificadas en ADCs de pulmón, con una frecuencia de entre el 25-40% de los casos

(Downward, 2003; Karnoub and Weinberg, 2008). Las implicaciones en pronóstico del gen *KRAS* son controvertidas así como su papel como posible marcador de respuesta a quimioterapia o terapias dirigidas (Camps et al., 2011; Gallach et al., 2013; Usó et al., 2017). Interesantemente, las mutaciones de *EGFR* y *KRAS* son generalmente mutuamente excluyentes en CPNM. Aunque representan un porcentaje importante de las alteraciones moleculares en CPNM, aún no se dispone de fármacos efectivos dirigidos a inhibir la actividad de *KRAS*. Se han realizado ensayos con inhibidores de la proteína quinasa activada por mitógeno (MEK), de la subunidad catalítica alfa de la fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa (PIK3CA) o de la AKT serina/treonina quinasa 1 (AKT1) con resultados modestos (Yang et al., 2010).



**Figura 7. Oncogenes potencialmente usados como dianas clasificados por subtipo histológico.** ALK, quinasa del linfoma anaplásico; DDR2, receptor tirosina quinasa 2 del dominio de la discoidina; *EGFR*, receptor del factor de crecimiento epidérmico; *FGFR1*, receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1; *KRAS*, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*; *MET*, proto-oncogén MET; *PIK3CA*, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato 3-quinasa, subunidad catalítica alfa; *PTEN*, gen homólogo de la fosfatasa y tensina; *RET*, ret proto-oncogén (Traducido de Morgensztern et al., 2015).

**ALK:** Los reordenamientos que involucran al gen *ALK*, dan lugar a fusiones del dominio quinasa intracelular de este gen con el extremo amino terminal del gen de la

proteína asociada a microtúbulos de equinodermo 4 (*EML4*) en más del 98% de los casos. Los reordenamientos se producen en el brazo p del cromosoma 2 (intrón 13 del gen *EML4* se fusiona con el intrón 19 del gen *ALK*) y causa una oligomerización constitutiva que produce una señal mitógena y por lo tanto una transformación maligna (Soda et al., 2007). Se han identificado también otros genes que pueden reordenarse con *ALK* (menos del 1% de los casos) incluyendo *KIF5B* (miembro de la familia de la quinesina 5b), *TFG* (gen fusionado con *TRK*) y *KLC-1* (cadena ligera de la quinesina 1). Los reordenamientos en *ALK* se han observado en un 4% de los pacientes con ADCs de pulmón (Peters et al., 2013).

En 2011 se aprobó el uso de un ITK, crizotinib, que inhibe la actividad de *EML4-ALK* en aquellos pacientes en estadios avanzados en los que se demostraba la presencia de la traslocación, comprobándose respuestas completas o parciales en más de un 50% de los pacientes. Sin embargo, con el tiempo se observan el desarrollo de resistencias secundarias al fármaco, y hay evidencia de que uno de los mecanismos involucra la aparición de mutaciones puntuales en *ALK* y la activación de la señalización mediada por EGFR (Choi et al., 2010).

**PI3K** (fosfatidilinositol-4,5-bifosfato 3-quinasa): La señalización de la PI3K juega un papel importante en el metabolismo, crecimiento, supervivencia y movilidad celular. En CPNM se han identificado tanto ganancias en el número de copias en la subunidad catalítica alfa de *PIK3* (*PIK3CA*) como mutaciones que alteran la función de este gen. La ganancia en el número de copias de *PI3KCA* se da aproximadamente en el 20% de los cánceres de pulmón, siendo más frecuente en SCC. Datos preclínicos han sugerido que aquellos cánceres que albergan mutaciones activadoras en *PI3KCA* pueden estar entre los más sensibles a los inhibidores de la vía PI3K (Morgensztern et al., 2015).

**Otras dianas en CPNM:** Otras dianas terapéuticas descritas en ADCs de pulmón, incluyen translocaciones que involucran a los genes *ROS1* (proto-oncogén 1 ROS, receptor tirosina quinasa) y *RET* (proto-oncogén ret) y mutaciones en *HER2* (erb-b2 receptor tirosina quinasa 2) o en *BRAF* (proto-oncogén B-Raf, serina treonina quinasa) (T. Li et al., 2013).

En SCC, alteraciones en genes como *FGFR1* (receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1) y *DDR2* (receptor tirosina quinasa 2 del dominio de la discoidina) han

sido reportados como dianas potenciales, pero sólo unos pocos ensayos clínicos están en curso (Drilon et al., 2012).

Sin duda, con el avance tecnológico, especialmente gracias a las tecnologías de secuenciación de nueva generación, la clasificación molecular del cáncer de pulmón se va refinando cada vez más, definiendo nuevas dianas y desarrollando terapias específicas contra ellas. Sin embargo, incluso disponiendo de terapias dirigidas, los pacientes desarrollan resistencias a los tratamientos, que se dan por mecanismos heterogéneos que no solo implican a las células tumorales sino también al microambiente que rodea al tumor. Por este motivo, es necesario continuar investigando en los mecanismos carcinogénicos y de resistencias que subyacen en el CPNM con el objetivo de obtener la máxima eficacia en los tratamientos oncogénicos minimizando los efectos tóxicos, que son la base de los tratamientos personalizados.

### 3. MICROARNs Y CÁNCER

#### 3.1. DEFINICIÓN E HISTORIA

Los **microARNs** (miARNs), son un tipo de ARNs de pequeño tamaño, entre 18-25 nucleótidos, no codificantes y filogenéticamente conservados (Lee and Ambros, 2001; Lau et al., 2001; Lagos-Quintana et al., 2001), que regulan postranscripcionalmente la expresión de más del 30 por ciento de los genes codificantes en mamíferos (Filipowicz et al., 2008), a pesar de que constituyen solo del 1 al 3% del genoma humano (Ghildiyal and Zamore, 2009; Bartel, 2004).

Fueron descritos por primera vez en el nematodo *Caenorhabditis elegans* en el año 1993 por dos grupos independientes simultáneamente (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993) que demostraron que la activación del gen *lin-4*, que codificaba para un pequeño ARN antisentido, esencial para el control temporal del desarrollo larval de *C. elegans*, resultaba en una disminución en los niveles de expresión de la proteína lin-14 (Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993). Los resultados experimentales demostraron que la traducción del gen *lin-14* se reprimía a través de la interacción ARN-ARN con *lin-4*, lo que resultaba en una disminución sustancial en los niveles de la proteína lin-14, mientras que los niveles del ARN mensajero de *lin-14* se mantenían constantes (Wightman et al., 1993). Estos descubrimientos revelaron un modelo en el que la unión

de *lin-4* al extremo 3' UTR (no traducido) de *lin-14* resulta en la represión de la traducción de *lin-14*, provocando la transición del desarrollo de las larvas de la etapa 1 a la 2 (Bartel, 2004; Di Leva et al., 2006; Lee et al., 1993; Wightman et al., 1993).

No fue hasta siete años más tarde cuando tuvo lugar un segundo descubrimiento también en *C. elegans*, de otro gen con las mismas características que *lin-4*, el *let-7*, un gen que permite la transición desde la fase tardía larval a la adulta (Reinhart et al., 2000). *Let-7* codifica un ARN regulador de 21 nucleótidos que reprime la traducción de *lin-41*, y promueve la transición del desarrollo en *C. elegans* (Bartel, 2004; Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000). Además, *let-7* también reveló un transcrito de alrededor de 70 nucleótidos además del transcrito de 21 (Reinhart et al., 2000), igual que en el caso de *lin-4*, lo que sugiere que estos transcritos más largos pueden actuar como precursores del más corto (Lee et al., 1993; Pasquinelli et al., 2000; Reinhart et al., 2000). El ARN de *let-7* pronto se encontró en otras especies, como *Drosophila* y humanos (Bartel, 2004; Pasquinelli et al., 2000). Desde que *lin-4* y *let-7* se describieron como controladores del desarrollo temporal en nematodos, este tipo de ARNs fueron apodados como pequeños ARNs temporales (stRNAs) (Pasquinelli et al., 2000). Poco tiempo después, se describieron pequeños ARNs reguladores similares de aproximadamente 21 nucleótidos de longitud (miR-1 al miR-33) en *D. melanogaster* que se expresaban sólo en determinados tipos celulares específicos (Lagos-Quintana et al., 2001). Además, estos pequeños ARNs también codificaban un segundo transcrito, un poco más grande, de aproximadamente unos 70 nucleótidos al igual que *lin-4* y *let-7* cuya estructura secundaria parecía contener una estructura en horquilla (Lagos-Quintana et al., 2001; Lee et al., 2002). Estos pequeños ARNs reguladores pasaron a denominarse microARNs (miARNs) y estudios de clonación revelaron su naturaleza conservada y su presencia en una gran variedad de organismos, incluyendo plantas, mamíferos, moscas y gusanos (Bartel, 2004; Lagos-Quintana et al., 2002). El creciente número de miARNs identificados llevó a Sam Griffiths-Jones del *Wellcome Trust Sanger Institute* a crear un registro online de las secuencias de miARNs publicadas, al alcance de todos (Griffiths-Jones, 2004). Hoy en día este registro se ha convertido en una base de datos exclusiva de miARNs llamada *miRBase* y se puede encontrar *online* en <http://www.mirbase.org/>.

Al principio de su descubrimiento, se predijo que aproximadamente el genoma humano incluía unos 250 miARNs (Bartel, 2004). Sin embargo, de acuerdo con lo publicado en el artículo de Kozomara en 2011, ya existían más de 1400 miARNs registrados para humanos en la versión 16 de *miRBase* (Kozomara and Griffiths-Jones, 2011), ampliándose a más 2500 miARNs identificados en la última versión (versión 21.0) en el genoma humano, actualizada por última vez en 2014, lo que subraya la importancia que ha adquirido el estudio de los miARNs y su papel en la regulación génica.

El descubrimiento de los miARNs resultó en un cambio de modelo en el entendimiento de la regulación génica dado que los miARNs son ahora conocidos por regular la expresión de miles de genes diana relacionados con procesos fundamentales, entre los que se incluyen desarrollo, diferenciación, proliferación celular y apoptosis entre otros (Ambros, 2003). La expresión anormal o alteración en los miARNs también contribuye en el desarrollo de una serie de patologías humanas, entre las que se incluye el cáncer (Esquela-Kerscher and Slack, 2006; Meltzer, 2005; Garzon et al., 2006).

### 3.2. NOMENCLATURA

El rápido avance en el campo de los miARNs ha sido posible en parte gracias a la adopción de un sistema uniforme de anotación y nomenclatura para asegurar la uniformidad y la fácil catalogación, que se ha aplicado desde los primeros miARNs descubiertos (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). *The miRNA Registry* fue el primer organismo regulador para nombrar a los miARNs, y esta función fue continuada por *miRBase* (Ambros et al., 2003; Griffiths-Jones et al., 2006; Griffiths-Jones et al., 2008; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011; Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Los nombres son asignados en base a las guías acordadas por investigadores de notoria relevancia en el campo de los miARNs (Ambros et al., 2003). Los nombres se asignan después de que un artículo científico que describe su descubrimiento se acepta para su publicación. Una vez hecho esto, los genes oficiales deben ser incorporados en la versión final del artículo. Las guías de nomenclatura requieren que los nuevos miARNs se verifiquen experimentalmente mediante clonación o con evidencia de expresión y procesamiento. Los miARNs homólogos de organismos relacionados que se identifican mediante métodos de análisis de

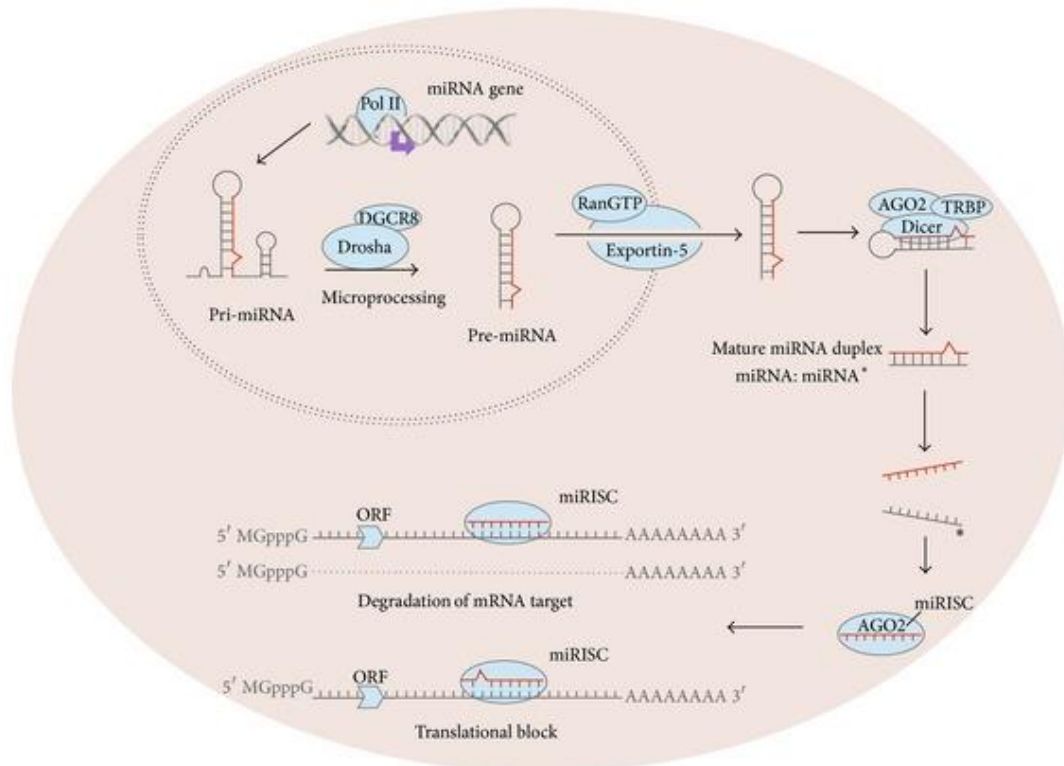
secuencias pueden ser nombrados sin la necesidad de pruebas experimentales adicionales. Según el esquema mostrado en la Figura 8A, a los miARNs se les asignan identificadores numéricos secuenciales. La base de datos utiliza un prefijo abreviado de 3 ó 4 letras para designar la especie, de modo que los identificadores tomen la forma hsa-miR-101 que se refieren al miARN 101 de humanos (hsa= *Homo sapiens*). Las secuencias maduras se denominan 'miR', mientras que las precursoras se denominan 'mir'. Los nombres de genes pretenden transmitir información limitada acerca de las relaciones funcionales entre los miARNs maduros de diferentes especies. Por ejemplo, hsa-miR-101 en humano y mmu-miR-101 en ratón son ortólogos. Las secuencias parálogas, cuyos miARNs maduros difieren en sólo una o dos posiciones, se indican con sufijos de letras, por ejemplo, miR-10a y miR-10b. Los loci con horquillas distintas que dan lugar a miARNs maduros idénticos son designados con sufijos de números (por ejemplo, dme-mir-281-1 y dme-mir-281-2, y en este caso se trataría de *Drosophila melanogaster* por tener el prefijo dme). Cabe señalar que los sistemas de nomenclatura virales y de plantas difieren sutilmente. Algunos estudios sugieren que sólo la región denominada semilla de la secuencia forma un dúplex fuerte con el ARNm diana (Lewis et al., 2005) (Figura 8B). Secuencias precursoras relacionadas pueden dar lugar a secuencias maduras con sólo similitud marginal y diferentes números de miARN. El esquema de nomenclatura también se complica por los casos en que dos secuencias de miARN maduras diferentes parecen provenir de brazos opuestos del mismo precursor. Tales secuencias maduras se denominan actualmente de la forma miR-17-5p (brazo 5p) y miR-17-3p (brazo 3p) (Figura 8C).





### 3.3. BIOGÉNESIS

La **biogénesis** de los miARNs empieza con la transcripción de un gen de miARN por la ARN polimerasa II generando un transcrito primario de ARN de varias kilobases de longitud que se conoce como pri-miARN (miARN primario), coronado y poliadenilado, como los transcritos primarios que codifican para proteínas, y se caracteriza por tener una o más regiones imperfectas de ARN de doble cadena denominadas estructuras en horquilla (Cai et al., 2004). Las características estructurales de estas horquillas son únicas de los pri-miARNs, distinguiéndolos así de varias estructuras de ARN en lazo (*RNA stem-loop-like structures*) presentes en el núcleo. La horquilla del pri-miARN contiene un tallo largo e imperfecto de aproximadamente 30 pares de bases (pb) flanqueado por extremos 5' y 3' de simple cadena (Zeng and Cullen, 2005; Han et al., 2006). Esta estructura es reconocida y procesada por la endonucleasa nuclear RNasa III, llamada Drosha, y su cofactor DGCR8 (del inglés, *DiGeorge Syndrome Critical Region 8*; Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Lee et al., 2003), que junto con otras proteínas forman un complejo conocido como el complejo microprocesador (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Han et al., 2004). Se sabe que DGCR8 reconoce el ARN de cadena sencilla y las uniones de doble cadena en los extremos 5' y 3' del pri-miARN (Han et al., 2006) y Drosha es una enzima de digestión de ARN que escinde la horquilla del pri-miARN a una distancia de aproximadamente 11 pb del sitio reconocido por DGCR8. La escisión de Drosha en los miARNs intrónicos ocurre co-transcripcionalmente antes del *splicing* del ARN huésped (Morlando et al., 2008; Kim and Kim, 2007). El ARN resultante es un miARN precursor llamado pre-miRNA que por lo general posee un saliente de 2 nucleótidos en el extremo 3', y esto es el sello distintivo para ser reconocido por la RNasa III (Basyuk et al., 2003). El procesamiento de pri-miARN a pre-miARN por el complejo de microprocesamiento de Drosha se produce en el núcleo de la célula (Figura 9). El procesamiento del pre-miARN tiene lugar en el citoplasma.



**Figura 9. Proceso de biogénesis y supresión postranscripcional de los miARNs.** Los transcritos nacientes de pri-microARNs (pri-miARNs) son primero procesados en unos pre-miARNs de aproximadamente 70 nucleótidos por Drosha en el núcleo. Estos son transportados al citoplasma por la exportina 5 y procesados en dúplex miARN: miARN\* por Dicer. Solo una cadena del dúplex miRNA:miRNA\* es preferencialmente ensamblada en el complejo de silenciamiento de ARN inducido (RISC), que subsecuentemente actúa sobre su diana por represión transcripcional o rotura del ARNm, dependiendo, al menos en parte, del nivel de complementariedad entre el miARN y su diana. ORF, marco abierto de lectura (Gallach et al., 2014).

El pre-miARN es exportado desde el núcleo al citoplasma vía una exportina, la exportina 5 (transportador RAN-GTP dependiente) (Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004; Yi et al., 2003). Una vez en el citoplasma, la endonucleasa RNasa III, Dicer (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001), con la ayuda de *RISC loading complex RNA binding subunit* (TRBP) y Argonauta 2 (AGO2) generan el miARN maduro de doble hebra (miARN: miARN\*) que tiene entre 17-25 nucleótidos. Dicer reconoce los extremos 3' generados por Drosha y escinde el pre-miARN aproximadamente a dos vueltas helicoidales de distancia (aproximadamente 22 nt), cerca del bucle terminal, para producir un dúplex miARN-miARN con 2 nucleótidos salientes en ambos extremos 3' (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Se sabe que los mirtrones (pre-miARN como los intrones), con *splicing* fuera del ARNm transcrito evitan el

procesamiento del complejo de microprocesamiento. Sin embargo, otras etapas de su biogénesis, como la exportación nuclear y la escisión por Dicer, siguen la vía canónica (Chung et al., 2011).

La escisión del pre-miARN mediada por Dicer genera un miARN maduro de doble cadena, donde una hebra recibe el nombre de cadena guía y la hebra complementaria se llama cadena pasajera. El miARN maduro pierde una de sus hebras (la cadena pasajera del miARN, miARN\*), mientras la otra es cargada en un complejo de silenciamiento activo llamado miRISC (Kawamata and Tomari, 2010; Hutvagner and Zamore, 2002; Mourelatos et al., 2002) (Figura 9). El miRISC es un complejo ribonucleoproteico que consta de una cadena de miARN, de proteínas de la familia Argonata (AGO), de proteínas de la familia GW182 (proteína que contiene repeticiones de glicina-triptófano [GW] de 182 kDa) y otras proteínas asociadas. Las proteínas de la familia Argonata contienen tres dominios conservados evolutivamente, PAZ, MID y PIWI, que interactúan con los extremos 3' y 5' del miARN, respectivamente (Peters and Meister, 2007; Jinek and Doudna, 2009). En los mamíferos, cuatro proteínas AGO (AGO1 a AGO4), funcionan en la represión traslacional de la proteína mediada por el miARN. Se cree que las proteínas AGO funcionan como puente entre el miARN y los efectores silenciadores, mientras que las proteínas GW182 actúan aguas abajo de las proteínas AGO para efectuar la represión mediada por miARN (Fabian et al., 2010).

El reconocimiento del ARNm diana por miRISC se basa en la complementariedad parcial del miARN con el ARNm diana. El emparejamiento de bases entre el miARN y su ARNm diana complementario da al proceso su especificidad. De los 20-22 nucleótidos (nts), sólo 2-8 nts del miARN, conocidos como la región "semilla", forman una combinación perfecta con el extremo 3'-UTR (no traducido) del ARNm diana (Ameres et al., 2007; Bartel, 2009; Brennecke et al., 2005). Cuando el complejo miRISC se une a su ARNm diana, tal y como se muestra en la Figura 9, pueden darse dos mecanismos diferentes de acción del miARN: 1) la degradación del ARNm y 2) la inhibición traduccional del ARNm sin degradación. En el primer caso la unión entre las secuencias miARN-ARNm es completamente complementaria mientras que en el segundo mecanismo esta unión no es completamente complementaria y produce la no

traducción provocando una inhibición en la expresión de los genes diana. Este último mecanismo es el que se da en animales, incluyendo mamíferos. Debido a que los miARNs pueden inhibir la traducción de dianas imperfectamente emparejadas, una característica importante derivada de esto es que un único miARN puede regular muchos genes, mientras que un gen puede estar regulado por múltiples miARNs, sugiriendo que la interacción entre miRNAoma-mRNAoma es un sistema complicado (Meltzer, 2005).

### 3.4. ORGANIZACIÓN GENÓMICA

Mediante estudios de secuenciación se ha visto que los genes de los miARNs han sido mapeados en todos los cromosomas, con la excepción del cromosoma Y humano. En base a su localización genómica, pueden clasificarse como intergénicos e intragénicos pudiendo ser éstos últimos intrónicos o exónicos (Rodríguez et al., 2004; Figura 10).

#### 3.4.1. MiARNs intergénicos

Se encuentran en regiones genómicas distintas a las unidades transcripcionales funcionales conocidas. Los miARNs intergénicos pueden ser monocistrónicos (con una sola horquilla) o policistrónicos (con varias horquillas) y se sabe que tienen sus propios promotores y otros elementos reguladores (Figura 10A). Los miARNs intergénicos son en su mayoría transcritos por la ARN Polimerasa II y se sabe que tienen capucha y están poliadenilados, como otros transcritos de la ARN polimerasa II (Cai et al., 2004). En base a diversas observaciones experimentales y datos de predicción, la mayoría de miARNs intergénicos son considerados por tener un transcrito primario de 3-4 kilobases de longitud, con un sitio de inicio de la transcripción claramente delineado y una señal poli (A) (Corcoran et al., 2009; Saini et al., 2007).

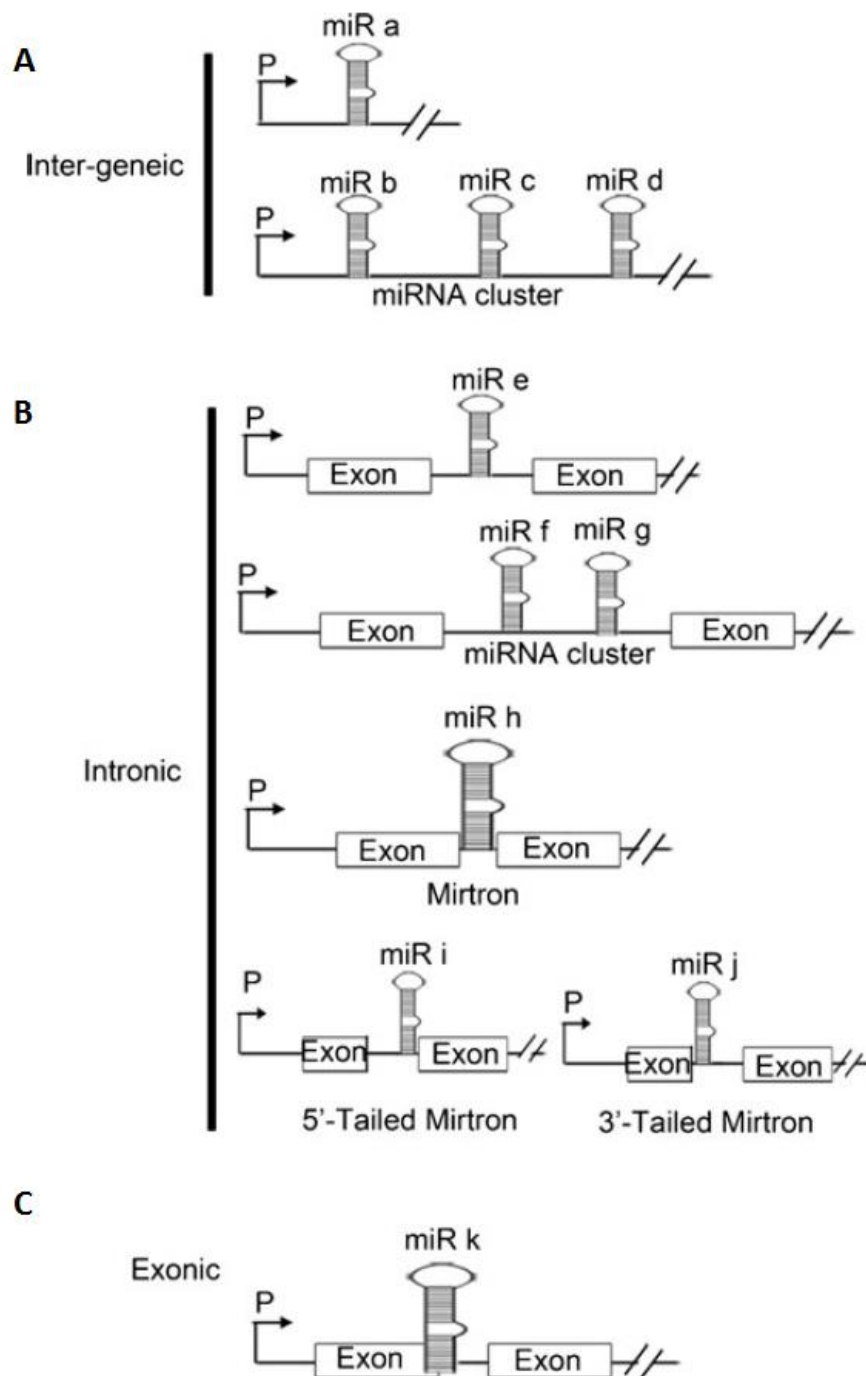
#### 3.4.2. MiARNs intragénicos

Dentro de los miARNs intragénicos podemos encontrar los intrónicos y los exónicos y a continuación se detallan cada uno de ellos.

**MiARNs intrónicos:** Los miARNs intrónicos se encuentran en los intrones de genes anotados, tanto en la secuencia codificante para la proteína como en la no codificante (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee et al., 2002). Estos miARNs pueden

estar presentes como un único miARN o como un grupo de varios miARNs (Mourelatos et al., 2002; Figura 10B). Los miARNs intrónicos pueden ser transcritos a partir del mismo promotor que sus genes portadores, y procesados a partir de los intrones de los transcritos del gen portador y por lo general tienen perfiles de expresión similares a los del gen portador (Baskerville and Bartel, 2005). Sin embargo, también se conocen ejemplos de genes y *clusters* de miARNs que residen dentro de los intrones, pero que están bajo el control de sus propios promotores, como es el caso del *cluster* miR-17-92, que se encuentra en el intrón 3 del gen C13orf25 (cromosoma 13 marco abierto de lectura 25) (Ota et al., 2004). Curiosamente, la ubicación de algunos miARNs intrónicos está bien conservada entre diversas especies, esto es indicativo de su importancia en la coordinación de diversos procesos fisiológicos. Por otra parte, como un caso especial, todo el intrón de un gen codificante para una proteína puede actuar como la secuencia exacta del pre-miARN con sitios de *splicing* a cada lado (Figura 10B). Estos intrones se llaman **mirtrones** y, puesto que éstos son procesados por la maquinaria de *splicing*, no se requiere el primer paso en su biogénesis para su maduración (Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007). Sin embargo, se han encontrado algunas variantes de mirtrones con extensiones adicionales de la secuencia en los extremos 5' o 3' de la horquilla empalmada. Tales mirtrones se conocen como mirtrones de cola 5' o mirtrones de cola 3' (Babiarz et al., 2008; Figura 10B). La existencia de mirtrones de cola implica que la maquinaria de *splicing* genere un ARN intermediario que debe ser sometido a un procesamiento nucleolítico adicional. Por otra parte, se sabe que algunos miARNs (mmu-mir-1839) se generan a partir de pequeños ARNs nucleolares (snoRNAs) (Ender et al., 2008).

**MiARNs exónicos:** Los miRNAs exónicos son mucho más raros que cualquiera de los tipos anteriores y a menudo se solapan entre un exón y un intrón de un gen no codificante (Figura 10C). Estos miARNs también se cree que son transcritos por el promotor de su gen portador y su maduración a menudo excluye la función del gen portador (Rodriguez et al., 2004).



**Figura 10. Organización genómica de los miARNs.** A) Un miARN intergénico está bajo el control de su propio promotor, ya sea como un solo gen (miR a) o como un *cluster* (miR b-d). B) Un miARN intrónico está presente en la región intrónica de una unidad de transcripción funcional y está bajo el control de un promotor de codificación de proteínas como un miARN intrónico único (miR e) o un *cluster* de miARN (miR f, miR g) o como un Mirtron (miR h) en el que el intrón actúa como un miARN, y por lo tanto, no es necesario un paso de microprocesamiento en este caso. Los Mirtrones que tienen una extensión de secuencia en el extremo 5' se llaman mirtrones de cola 5 (*5-tailed mirtrons*) (miR i), mientras que los mirtrones con extensión de secuencia en el extremo 3' se denominan mirtrones de cola 3 (*3-tailed mirtrons*) (miR j). C) Los miARNs exónicos (miR k) son raros (la flecha torcida indica el promotor P, los miARNs están representados en su conformación de horquilla, las cajas rectangulares [Exon] indican exones que codifican para proteínas) (Ul Hussain, 2012).

### 3.5. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE LOS MIRNAS

La expresión de los miARNs puede estar regulada a diferentes niveles (Figura 11). Como se comentó anteriormente, a nivel transcripcional, la expresión de los miARNs puede cambiar junto con sus genes huésped (miARNs intragénicos) o independientemente de ellos (miARNs intergénicos). Los miARNs intergénicos tienen sus propios promotores, así son expresados independientemente y pueden ser regulados por factores de transcripción separados. En ambos casos, la expresión de los miARNs puede cambiar debido a diferentes mutaciones o puede ser regulada por metilación del promotor. A nivel postranscripcional la expresión puede ser regulada a la baja debido a cambios en la actividad de los enzimas clave para la biogénesis, como Dicer y Drosha. La actividad de estas enzimas puede también verse afectada por mutaciones o modificaciones epigenéticas.

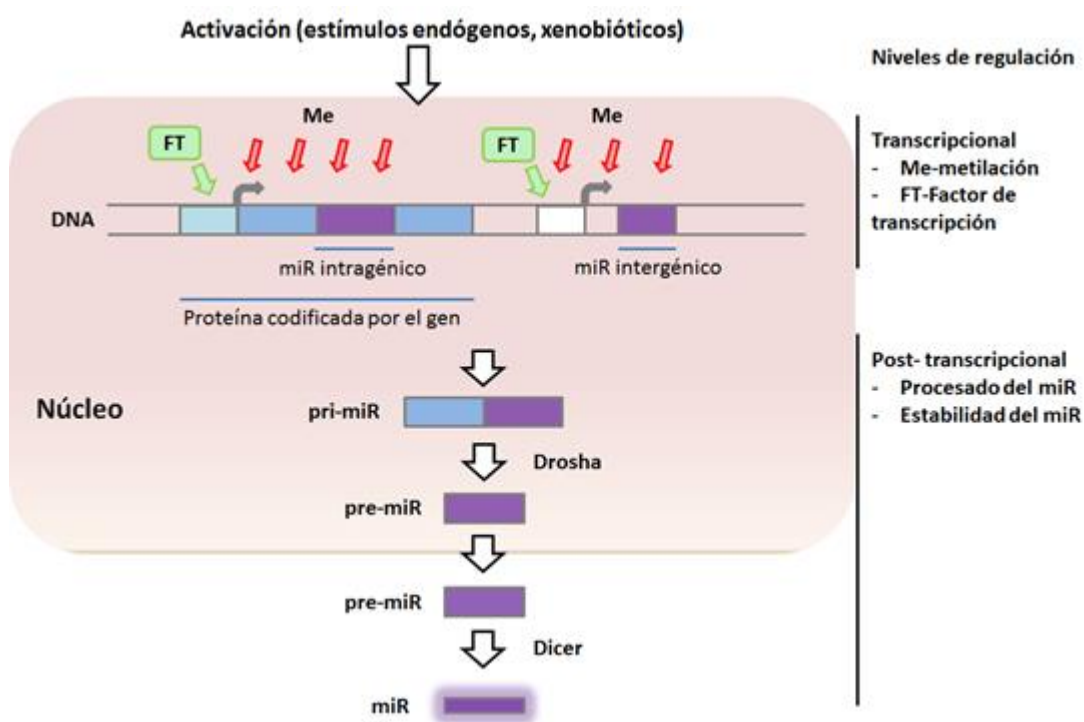


Figura 11. Niveles de regulación en la expresión de miARNs.

La transcripción es uno de los principales pasos reguladores involucrados en la biosíntesis de los miARNs. Las características de los promotores de los miARN son similares a los promotores de los genes codificantes de proteínas y se sabe que la transcripción de los miARNs se regula mediante factores de transcripción similares a los de genes codificantes de proteínas (Lee et al., 2004; Cai et al., 2004). Por ejemplo,

se sabe que c-Myc es un factor de transcripción que activa la transcripción del *cluster* miR-17-92 y, curiosamente, esta activación se ha relacionado con tumorigénesis (Tagawa et al., 2007). Además, c-Myc también disminuye la expresión de varios miARNs supresor de tumores, incluyendo las familias de miR-15a, -29, -34 y let-7 (Chang et al., 2008).

Otros mecanismos epigenéticos, como la metilación del ADN y la modificación de las histonas, también se conocen por regular la expresión de genes de miARNs. Por ejemplo, en el cáncer de vejiga, se ha encontrado que la expresión de miR-127 se reduce como resultado de la hipermetilación del promotor (Saito et al., 2006) o que varios loci de miARNs, tales como miR-9-1, -193a, -137, -342, -203 y -34b/c, están hipermetilados en múltiples cánceres humanos (Lujambio et al., 2008; Lujambio and Esteller, 2009). De forma similar, se sabe que la modificación de las histonas también regula la expresión de miARNs. Por ejemplo, la disminución de la expresión de miR-1 en células de cáncer de pulmón se ha relacionado con la acetilación aberrante de histonas del promotor del miR-1 (Nasser et al., 2008), en concordancia con los datos que indican que la expresión de miR-1 en las células cancerosas reduce el crecimiento celular, la movilidad y la formación de tumores *in vivo*.

Además de la regulación a nivel transcripcional, como ya hemos visto, la regulación postranscripcional que incluye los pasos involucrados en la biogénesis y la maduración de miARNs (cambios en el procesamiento de los miARNs) son también formas de control de los miARNs. Estos incluyen el procesamiento de pri-miRNA a pre-miRNA por la enzima RNasa III, Drosha, el transporte del complejo del miARN desde el núcleo hasta el citosol y la conversión del pre-miRNA a miARN maduro por la acción del complejo de proteínas asociado a Dicer (Davis-Dusenbery and Hata, 2010b; Davis-Dusenbery and Hata, 2010a).

Por otro lado, también se consideran los efectos de compuestos endógenos (hormonas, citoquinas) y exógenos (xenobióticos) sobre la expresión de los miARNs. Tanto los estímulos fisiológicos como patológicos, como las hormonas esteroideas y el estrés, pueden afectar la expresión de los miARNs. Varios artículos afirman que los cambios en los niveles de estrógenos derivados o no de terapias hormonales y el uso de corticoides o interferón pueden afectar la expresión de varios miARNs y por lo



tanto modificar el perfil de los genes regulados por éstos (Katchy and Williams, 2016; Y. Zhang et al., 2012; Egeland et al., 2015; Maillot et al., 2009; Dwivedi et al., 2015; C. H. Yang et al., 2015).

La hipoxia es otro factor pueden afectar la expresión de miARNs. Se ha visto un posible papel de desregulación en la expresión de miARNs en sistema nervioso central y en tumores sometidos a condiciones de hipoxia (Kiernan et al., 2016; Wentz-Hunter and Potashkin, 2011; Rupaimoole et al., 2014).

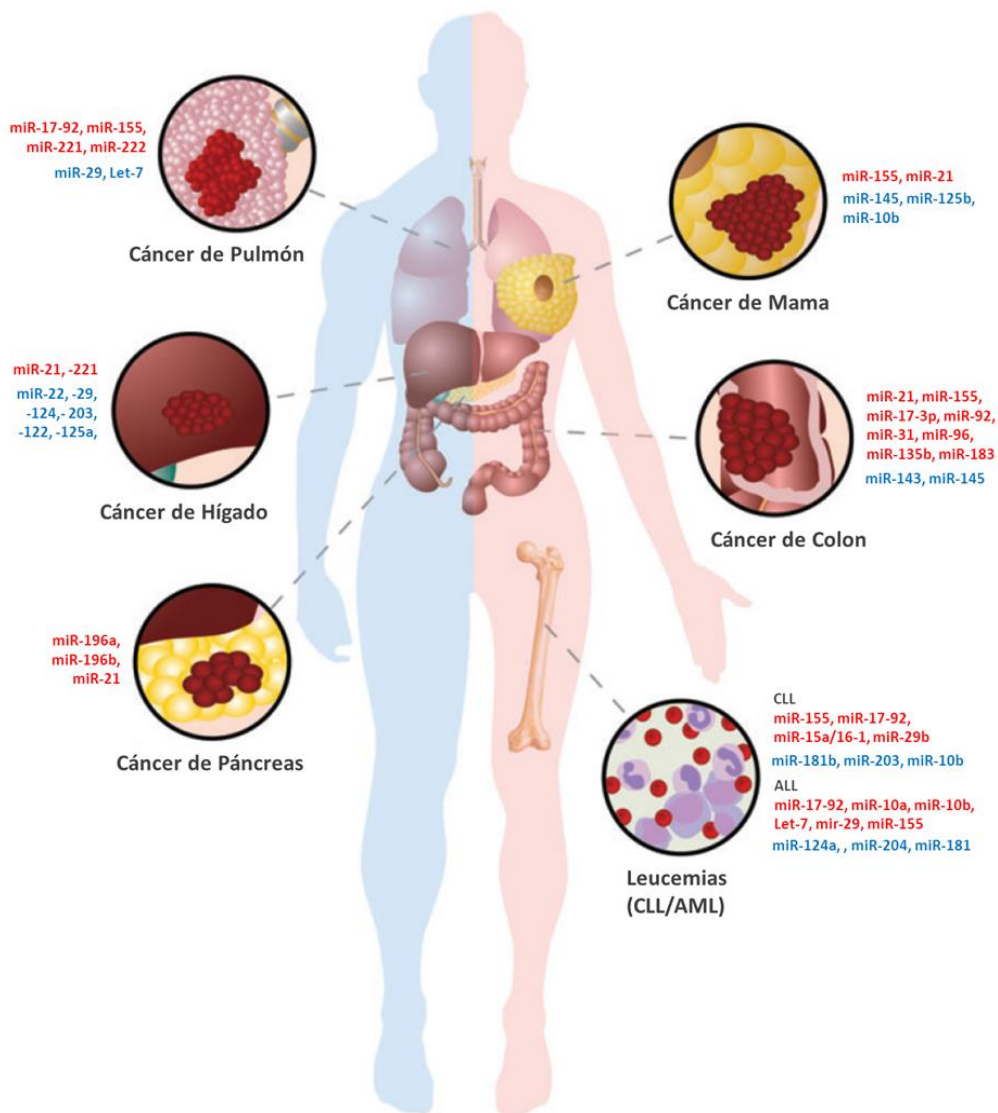
Cada vez están surgiendo más evidencias que demuestran el papel de los miARNs en la carcinogénesis inducida químicamente. Datos experimentales han mostrado que cada carcinógeno afecta la expresión de un cierto miARN. Por lo tanto, los miARNs pueden usarse como marcadores de toxicidad de xenobióticos o ser usados para el diagnóstico temprano del cáncer. Estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado cambios en la expresión de ciertos miARNs en células expuestas a benceno, benzopireno o aflatoxina B1 (Wei et al., 2015; Caiment et al., 2015; Marrone et al., 2016). La expresión de miARNs bajo la influencia de compuestos carcinogénicos también puede verse alterada en respuesta a la dieta (Shah et al., 2016; Milenkovic et al., 2013).

Hábitos perjudiciales como el tabaco y el consumo de alcohol pueden afectar también a la expresión de miARNs. La dependencia al alcohol causa desregulación de miARNs en el cerebro humano (Mamdani et al., 2015), además induce la desregulación de ciertos miARNs en carcinoma escamoso de cabeza y cuello (Saad et al., 2015). Como se ha comentado anteriormente el tabaco permanece como un importante factor de riesgo en cáncer, especialmente en cáncer de pulmón. Por ello se demostró que el humo del cigarro puede inducir cambios en el perfil de miARNs en varios órganos humanos así como en plasma de sujetos sanos. Ejemplo de ello, fue un estudio de Shi y col., donde identificaron 24 miARNs sobreexpresados y 11 infraexpresados en plasma de fumadores jóvenes sanos (Shi et al., 2016). Además, se demostró que los perfiles de miARNs en suero difieren entre no fumadores, fumadores y pacientes con cáncer de pulmón, encontrando que let-7i-3p y miR-154-5p estaban significativamente infraexpresados en suero de fumadores y pacientes, considerando estos cambios como biomarcadores potenciales de cáncer de pulmón (Huang et al., 2014). Con esto se puede notar la compleja regulación multinivel de la expresión de

los miARNs en relación al tipo celular, estado fisiológico del cuerpo y varios factores externos.

#### 4. PAPEL DE LOS MICROARNs EN CÁNCER

La primera vez que se describió la relación entre la desregulación de miARNs y el cáncer fue en 2002 por el grupo de Carlo Croce en pacientes con leucemia linfocítica crónica, donde se vio que un grupo específico de miARNs (el *cluster* miR-15a/16-1) localizado en 13q14, se encontraba en una región frecuentemente delecionada en estos pacientes (Calin et al., 2002). Pero no fue hasta 2004, cuando la importancia de los miARNs en la carcinogénesis se verificó mediante el descubrimiento de que la mayoría de estos miARNs humanos se encuentran localizados en regiones genómicas asociadas a cáncer (CAGR, de las siglas en inglés), incluyendo áreas de amplificación/delección genómica, recombinación, pérdida de heterocigosidad (LOH, de las siglas en inglés) y sitios frágiles (Calin et al., 2004). Existe una evidencia creciente que sugiere que la expresión aberrante de miARNs es una característica común de la oncogénesis (Calin and Croce, 2006), descrita tanto en tumores sólidos como en neoplasias hematológicas (Figura 12).



**Figura 12. MiARNs desregulados en cáncer.** Expresión aberrante de algunos miARNs en tumores sólidos como cáncer de pulmón, hígado, pancreático, mama y colon; y en desórdenes hematológicos como leucemias. Los miARNs sobreexpresados se muestran con letras rojas y los miARNs infraexpresados con letra azul (Traducido de Nana-Sinkam et al., 2010).

Además los perfiles de expresión de miARNs han revelado firmas de éstos asociadas con clasificación tumoral, diagnóstico, progresión y estadio tumoral, así como pronóstico y respuesta al tratamiento, de manera mucho más precisa que los estudios tradicionales de expresión génica (Lu et al., 2005; Calin and Croce, 2006; Yanaihara et al., 2006; Volinia et al., 2006). Así, Ruan y col. (Ruan et al., 2009) describieron el papel de los miARNs en relación con las características del cáncer humano descritas por Hanahan y Weinberg que ya se han mencionado anteriormente (Hanahan and Weinberg, 2000) (Figura 13, Tabla 2).

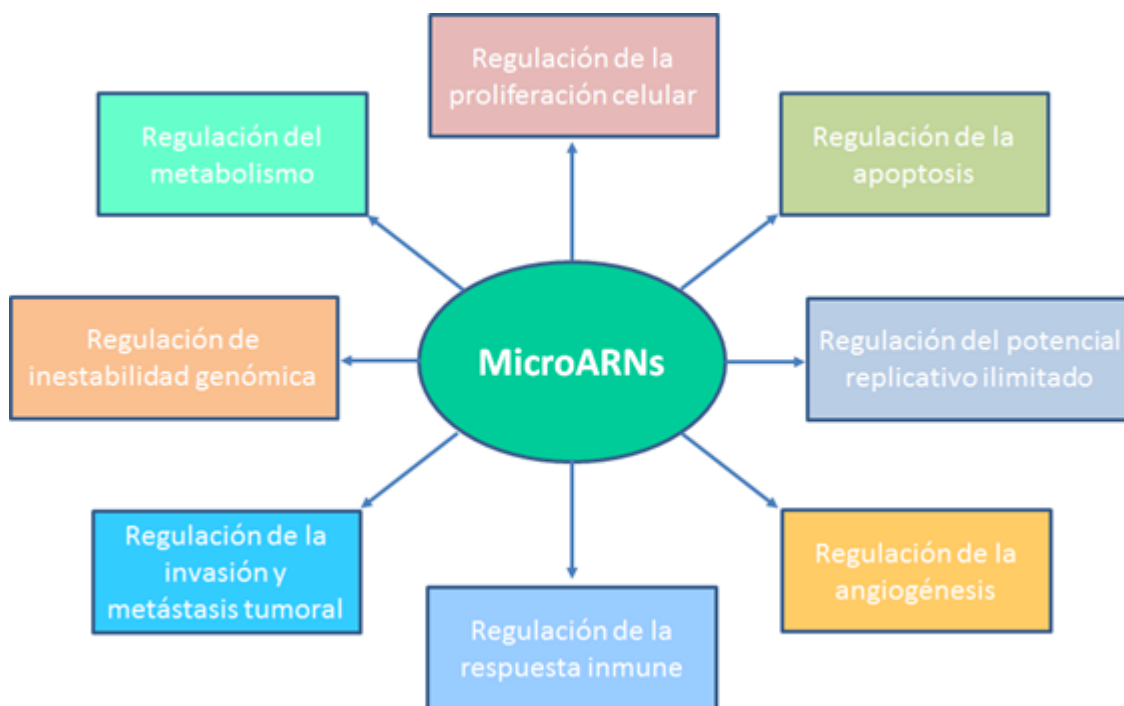


Figura 13. Papel de los miARNs en las características del cáncer humano (Modificada de Ruan et al., 2009).

Tabla 2. MiARNs y las características del cáncer

| Características del cáncer  | Funciones de los miARNs                        | miARNs   |
|---|--|--|
| Resistencia a señales anti-proliferativas e independencia de señales externas a factores de crecimiento | Pro-proliferación                              | miR-21, <i>cluster</i> miR-17, miR-221, miR-222  |
|   | Anti-proliferación                             | let-7, miR-519, miR-146a   |
| Evasión de la apoptosis   | Pro-apoptosis                                  | <i>cluster</i> miR-34, miR-29, miR-15  |
|   | Anti apoptosis                                 | <i>cluster</i> miR-17-92, miR-21   |
| Potencial replicativo ilimitado   | Regulación de la inmortalización o senescencia | miR-290, miR-24, miR34a  |
| Inducción de angiogénesis   | Pro-angiogénesis                               | <i>cluster</i> miR-17-92, miR-378, miR-296, let-7f, miR-27b, miR-130, miR-126            |
|   | Anti-angiogénesis                              | miR-15, miR20a, miR-20b  |
| Evasión del sistema inmune  | Escape de la inmunovigilancia                  | miR-155, <i>cluster</i> miR-17-92, miR-20a, miR-93, miR-106b, miR-372, miR-373, miR-520c |
|   |  |  |
| Invasión y metástasis   | Pro-metástasis                                 | miR-10b, miR-21, miR-373, mir520c, miR-155   |
|   | Anti-metástasis                                | let-7, miR-335, miR-206, miR-126, miR-146a, miR-101, miR-200                             |
| Inestabilidad genómica  | Promover inestabilidad genómica                | Deleciones o regulación a la baja de miARNs, como miR-17, miR-20a, miR-15a let-7         |

Como ya sabemos, existe evidencia acumulada de que los miARNs juegan un papel directo en los procesos neoplásicos, pudiendo actuar como genes supresores de tumores por la regulación negativa de oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis, o como oncogenes, reprimiendo genes supresores de tumores y/o genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis (Zhang et al., 2007; He et al., 2005; He et al., 2007; Croce, 2008) (Figura 14). La sobreexpresión de miARNs en los cánceres humanos puede resultar de la amplificación, desregulación de un factor de transcripción o dimetilación de islas CpG en las regiones promotoras del gen. El papel de los miARNs como supresores de tumores puede ser debido a la infraexpresión del mismo por deleciones, silenciamiento epigenético o pérdida de la expresión de factores de transcripción (Croce, 2008).



**Figura 14. El Yin y el Yang de la actividad de los miARNs en cáncer.** Todos los miARNs actúan como reguladores negativos de la expresión, su actividad aberrante puede llevar a comportamientos fisiopatológicos opuestos de acuerdo a su ARNm diana. Se muestran los miARNs más representativos como supresores de tumores y oncogenes (Traducida de Tong and Nemunaitis, 2008).

#### 4.1. MIARNs COMO SUPRESORES DE TUMORES

Los miARNs supresores de tumores como ya hemos mencionado anteriormente son aquellos que como su nombre indica, regulan a aquellos genes involucrados en

procesos como la proliferación, el ciclo celular, apoptosis, o los llamados oncogenes. La desregulación de estos miARNs en cáncer puede ser debido a la infraexpresión del mismo por deleciones, silenciamiento epigenético o pérdida de la expresión de factores de transcripción (Croce, 2008). Esto lleva a un aumento de la expresión de aquellos genes a los que regula, en este caso oncogenes, que se traduce en una mayor proliferación celular y una mayor tasa de inmortalidad. Entre los miARNs supresores de tumores más relevantes se encuentran: la familia de let-7, el miR-15a, miR-17-92, miR-34a, miR-143 y miR-145 (Figura 14). Como ejemplo, se destaca el papel de la familia de miARNs let-7a por ser uno de los primeros miARN descritos como supresores de tumores. Esta familia tiene un papel importante en la patogénesis del cáncer de pulmón. En este sentido se vio que su expresión estaba reducida en CPNM (Takamizawa et al., 2004) y niveles bajos de let-7 correlacionaban con peor supervivencia postoperatoria independientemente del estadio clínico. En este mismo trabajo se observó que la sobreexpresión del let-7 en la línea celular A549 inhibía la proliferación, cosa que indicaba que let-7 actuaba como un gen supresor de tumores. Analizando posibles genes diana se vio que su función de gen supresor de tumores la ejercía regulando al oncogén *RAS*, inhibiendo la expresión del mismo (Johnson et al., 2005).

#### 4.2. MIARNs COMO ONCOGENES

El papel de los miARNs como oncogenes, al igual que el de los oncogenes conocidos clásicamente, viene dado por un aumento de la proliferación celular. Estos miARNs son conocidos como oncomiRs. La desregulación de los oncomiRs viene dada por una sobreexpresión de los mismos, y en los cánceres humanos se ha visto que puede resultar de la amplificación, desregulación de un factor de transcripción o dimetilación de islas CpG en las regiones promotoras del gen (Croce, 2008). Entre los oncomiRs más relevantes se encuentran: el *cluster* miR-17-92, miR-21, miR-106, miR-155, miR-221 y miR-222. Como ejemplo, se destaca el papel del *cluster* miR-17-92 por ser uno de los más descritos en cáncer. Este *cluster* se localiza en el loci 13q21 y se encuentra a menudo amplificado en neoplasias hematológicas así como también en tumores sólidos, como glioma, cáncer de vejiga, tumores de cabeza y cuello y CPNM entre otros (Ota et al., 2004). La amplificación de esta región provoca una sobreexpresión de los

miARNs que componen el *cluster* miR-17-92: miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1, miR-92-1. O'Donnell y col. demostraron que el factor de transcripción, c-Myc, regulaba la expresión de este *cluster* policistrónico (O'Donnell et al., 2005). Takahashi y col. fueron los primeros en mostrar que este *cluster* estaba claramente sobreexpresado en células de cáncer de pulmón y estudios de ganancia de función evidenciaron un aumento en el crecimiento celular (Hayashita et al., 2005). Más tarde la sobreexpresión de algunos miembros de este *cluster* fue detectada mediante estudios de perfiles de miARNs (Volinia et al., 2006). Algunos de los genes diana identificados para este *cluster* como son *BIM* (del inglés, *BCL2 like 11*), *E2F1-3*, *PTEN*, *TGFBR2* (receptor 2 del factor transformante de crecimiento  $\beta$ ), *TSP1* (trombospondina 1), *CTGF* (factor de crecimiento del tejido conectivo), *TIA1* (gránulo citotóxico TIA1 asociado a proteína de unión al ARN) y *TNF* (factor de necrosis tumoral) (Dews et al., 2006; Volinia et al., 2006; Sylvestre et al., 2007; Liu et al., 2011; Yanqing Liu et al., 2017), hacen del *cluster* miR-17-92 un oncomiR polifacético que regula el crecimiento y la muerte celular, la progresión del ciclo celular y los procesos de angiogénesis en la tumorigénesis.

Como se observa en la Figura 14, el *cluster* miR-17-92 puede presentar tanto actividad prooncogénica como antioncogénica dependiendo del contexto en el que se encuentre. Además de este *cluster*, existen otras familias de miARNs, así como miARNs individuales que también presentan esta doble función. Entre ellos se encuentran el miR-7, el miR-31, el miR-125 y la familia miR-183-96-182.

## 5. MIARNs EN CÁNCER DE PULMÓN

En el cáncer de pulmón al igual que en otras neoplasias se han descrito miARNs desregulados y pueden dividirse en dos categorías: *down*-regulación de los miARNs supresores de tumores y *up*-regulación de miARNs oncogénicos. En 2006, se publicó el primer perfil de miARNs en cáncer de pulmón, en el cual se incluyeron muestras de ADC y SCC, realizando el análisis mediante *microarrays*. En este estudio se identificó que niveles mayores de expresión de miR-155 y niveles bajos de *let-7a-2* se relacionaban con peor pronóstico en pacientes con CPNM (Yanaihara et al., 2006).

Como era esperable, muchos de los miARNs involucrados en cáncer de pulmón

tienen la capacidad de regular la tumorigénesis, supervivencia, angiogénesis, migración e invasión del tumor (Figura 15). A partir del estudio de Yanaihara, se han reportado otras series en las que se encuentran bajos niveles de expresión de la familia de miARNs de let-7 en cáncer y su correlación con mal pronóstico. Los genes dianas de let-7 son *KRAS*, *NRAS* (oncogén homólogo del Neuroblastoma RAS Viral), *HMGA2* (grupo de alta movilidad *AT-hook 2*) y *CDC25* (25C del ciclo de división celular) y algunos otros oncogenes involucrados con el desarrollo tumoral (Osada and Takahashi, 2011). La expresión aumentada de los miR-221/miR-222 (considerados oncogénicos) se demostró en CPNM, cuyo mecanismo de acción se centra en la represión de *PTEN* y *TIMP3* (inhibidor de la metaloproteinasas 3) (Garofalo et al., 2009). Otro miARN interesante es el miR-146a, que actúa reprimiendo el *EGFR* de modo que inhibe el crecimiento celular, induce apoptosis, inhibe la migración de células tumorales y suprime la señalización por *EGFR* (Chen et al., 2013).

Dado el número creciente de datos en los que diversos miARNs se han relacionado con el inicio, mantenimiento y progresión del CPNM, se han propuesto como posibles biomarcadores de diagnóstico, de pronóstico e incluso como potenciales dianas terapéuticas.

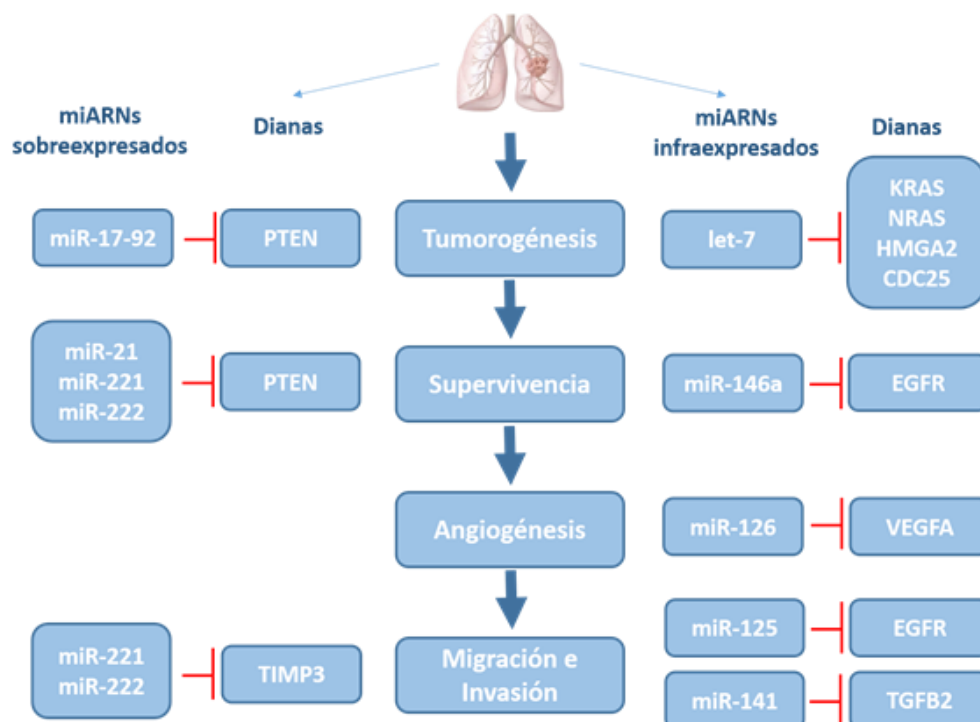


Figura 15. MiARNs y sus genes diana en cáncer de pulmón.



### 5.1. MIARNs COMO BIOMARCADORES EN EL CÁNCER DE PULMÓN

Según el Instituto Nacional del Cáncer (NCI), un biomarcador es “una molécula biológica encontrada en sangre, otros fluidos corporales o tejidos que es signo de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad”. Existen una gran variedad de biomarcadores, que pueden incluir proteínas, ácidos nucleicos y anticuerpos entre otros. Además un biomarcador puede ser un grupo de alteraciones tales como perfiles de expresión de genes, y firmas proteómicas o metabólicas. Entre los diferentes tipos de biomarcadores podemos encontrar: i) biomarcadores diagnósticos, que son aquellos usados para discriminar individuos sanos de aquellos que presentan alguna enfermedad; ii) biomarcadores pronósticos, que determinan la evolución del paciente independientemente del tratamiento; iii) biomarcadores predictivos, que determinan que tratamiento es probablemente el más efectivo, o en otras palabras la probabilidad de respuesta a un tratamiento específico.

Tradicionalmente, las características clínico-patológicas del tumor se han usado para evaluar el pronóstico. Para la búsqueda de biomarcadores se tiene que tener en cuenta dos puntos fundamentalmente: la robustez de evidencia para respaldar su uso y la cantidad de información proporcionada por un biomarcador, que se suma a lo que ya se sabe previamente de la enfermedad con respecto a parámetros clínicos y patológicos.

Durante las últimas décadas, se han realizado una gran cantidad de estudios para descubrir y validar biomarcadores en CPNM. Algunos de estos resultados han sido trasladados a la práctica clínica, pero muchos biomarcadores potenciales aún no han sido validados y por tanto no pueden utilizarse. Entre los biomarcadores validados, están las mutaciones activadoras en el gen *EGFR*, que son marcadores predictivos de respuesta al tratamiento con ITKs (Paez et al., 2004), o la presencia de traslocaciones en *ALK*, que son biomarcadores predictivos de respuesta a los inhibidores de ALK. A parte de estos, existen numerosos biomarcadores potenciales que aún están siendo investigados y que han sido propuestos como posibles herramientas para el manejo del CPNM. El *TP53*, que está frecuentemente alterado en CPNM, es un biomarcador de mal pronóstico en algunos tumores, aunque el pronóstico en CPNM es controvertido (Graziano et al., 2010). Como se ha comentado anteriormente, el valor pronóstico de

*KRAS*, aún es controvertido debido a las discrepancias entre los resultados reportados hasta la fecha.

Además de los marcadores individuales, también se han propuesto firmas como biomarcadores útiles en CPNM. Algunos autores han identificado firmas génicas pronósticas basadas en los niveles de expresión usando plataformas como los *microarrays* y la secuenciación masiva o la PCR cuantitativa a tiempo real (RTqPCR). Por ejemplo, nuestro grupo identificó una firma de expresión génica que comprendía tres genes angiogénicos (VEGFA/VEGFB/VEGFD) asociada con mal pronóstico y además fue un biomarcador pronóstico independiente en CPNM (Sanmartín et al., 2014). Recientemente, nuestro grupo también ha identificado un inmune *score* asociado con prognosis (Usó et al., 2017), además de unos perfiles de metabolitos, cuantificados por resonancia magnética en sangre, capaces de discriminar individuos sanos de pacientes con CPNM, así como entre diferentes estadios de la enfermedad (Puchades-carrasco et al., 2016).

Los miARNs son altamente estables tanto en tejido como en sangre, por esta razón el origen tumoral, el histotipo e incluso el estadio de la enfermedad pueden presentar patrones de expresión específicos (Melo and Esteller, 2011). De este modo, los miARNs podrían tener un gran valor en el diagnóstico y el pronóstico, que los convierten en candidatos prometedores para su uso como biomarcadores en cáncer de pulmón (Zandberga et al., 2013).

Existen estudios previos que han demostrado la importancia diagnóstica, pronóstica y predictiva de los miARNs en el cáncer de pulmón. El problema es la disparidad de resultados entre los diferentes estudios y el poco consenso que se ha establecido hasta la fecha. En cuanto al valor diagnóstico de los miARNs existen estudios en tejido, donde hay diferencias significativas en los niveles de expresión entre el tejido tumoral y el tejido pulmonar normal adyacente. En base a esto, los miARNs pueden usarse en el diagnóstico temprano del cáncer de pulmón en la clínica. Se ha demostrado mediante comparación de muestras pareadas tumor-normal, que miR-210, miR-21, miR-31 y miR-182 permanecen aparentemente *up*-regulados en tejido pulmonar tumoral, mientras, por el contrario, miR-126 y miR-145 están *down*-regulados (Guan et al., 2012). Por ejemplo Sun y col. usaron la tecnología de *microarrays* para detectar la

expresión diferencial existente entre tejido pulmonar normal, tejido tumoral primario y tejido metastásico. Encontraron que 4 miARNs (miR-150, miR-18b-, 5p, miR-643, miR-3940-5p), diferenciaban claramente los tejidos metastásicos de los primarios de pulmón, y miR-150, miR-3940-p, permanecían *down*-regulados en tejido tumoral primario comparado con el tejido pulmonar normal (Sun et al., 2013). Sin embargo, en muchos casos, existen datos contradictorios sobre el papel que juegan algunos miARNs en CPNM, lo que justifica que el campo siga en constante crecimiento desde inicios de la década de los 2000.

Las muestras de sangre periférica han sido una fuente de análisis para la búsqueda de biomarcadores en CPNM, especialmente en el caso de los estadios avanzados, debido a que en general, la disponibilidad de tejido es escasa. Analizando los patrones de expresión de miARNs en suero y plasma, se encontraron diferencias significativas entre pacientes con cáncer y donantes sanos. Los miARNs en suero y plasma son bastante estables, ya que pueden resistir altas temperaturas, medios ácidos y alcalinos y la degradación enzimática. Se ha demostrado que la mayoría de miARNs en donantes sanos tienen co-expresión en suero y plasma, mientras en pacientes con CPNM, hay también 76 tipos de miARNs que se expresan solo en suero, lo que compromete el supuesto que la mayoría de miARNs en suero pertenecen a los tejidos tumorales (Chen et al., 2008). En pacientes con CPNM, la expresión anormal de miARNs en suero y en tejido tumoral se corresponde con bastante precisión (Foss et al., 2011; Shen et al., 2011; Keller et al., 2009), lo que sienta las bases del uso de miARNs en el suero como método para diagnosticar clínicamente el cáncer de pulmón en estadios tempranos. El miR-1254, miR-574-5p, miR-21, miR-126, miR-210 y miR-486-5p son algunos miARNs descritos por presentar una elevada sensibilidad en el diagnóstico de CPNM, y específicamente en el diagnóstico en estadios tempranos (Foss et al., 2011; Shen et al., 2011). Estos son algunos ejemplos que muestran el creciente uso de los miARNs para intentar diagnosticar el cáncer y en especial el cáncer de pulmón en estadios tempranos de una manera más específica. Pero aún no existe un consenso claro de cuáles son los mejores miARNs diagnósticos para este tipo de cáncer.

Por otra parte, se ha mostrado que hay numerosos miARNs que pueden tener valor pronóstico en pacientes con CPNM en estadios tempranos resecables. El primer

estudio llevado a cabo en miARNs en cáncer de pulmón, describió que bajos niveles de let-7 fueron significativamente asociados con una peor supervivencia en pacientes con CPNM resecaados (Takamizawa et al., 2004), sugiriendo un valor pronóstico de este miARN, lo que fue confirmado posteriormente por un meta-análisis (Xia et al., 2014). Por otra parte, la correlación de elevados niveles de miR-21, tanto en tumor como en suero, con una peor supervivencia se ha reportado en diferentes estudios (Gao et al., 2010; Z.-X. Wang et al., 2011). Además del let-7, como supresor de tumores y el miR-21 como oncomiR, se han descrito otros cuya baja expresión se correlaciona con una peor supervivencia o alta tasa de recurrencia en cáncer de pulmón como el miR-34a, miR-374a, miR-181a, miR-221, miR-200c y miR-218 y otros donde se han encontrado similares resultados que en el miR-21, incluyendo la familia del miR-183 (miR-182, miR-183 y miR-96), miR-31, miR-92a-2 (Qi and Mu, 2012). Por otra parte, se ha demostrado que la baja expresión de miR-146a en cáncer de pulmón a menudo se relaciona con estadios avanzados de la enfermedad. Así, este miARN puede usarse como un biomarcador pronóstico y mantener un potencial terapéutico ya que pacientes con elevados niveles de este presentan mayor SLP (supervivencia libre de progresión) (Chen et al., 2013).

Además de los estudios que existen sobre la asociación de miARNs con la supervivencia en CPNM y su valor como biomarcadores pronóstico, existen también meta-análisis que pretenden a partir de los resultados obtenidos en varios estudios hacer un análisis global para intentar elucidar el valor pronóstico de esos miARNs en una cohorte más numerosa. Un meta-análisis reciente en el que se incluyeron 28 estudios, reveló que la elevada expresión de miR-21, miR-200c, y miR-125b se asociaron negativamente con la supervivencia. Por el contrario, altos niveles de miR-148b, miR-365, miR-124, miR-32, miR-146a, y miR-375 se asociaron significativamente con un mejor pronóstico (Zhan et al., 2016). Además de los mARNs o biomarcadores individuales, existen firmas basadas en los niveles de expresión combinados de varios miARNs. Prueba de ello es la firma basada en altos niveles de miR-486 y miR-miR-30d combinado con bajos niveles de miR-1 y miR-499 en suero que podría significativamente predecir un peor pronóstico en CPNM (Hu et al., 2010). Estos son algunos ejemplos que demuestran el creciente uso de los miARNs como

biomarcadores pronósticos en cáncer de pulmón de una manera más específica. Pero aún no existe un consenso claro de cuáles son los mejores miARNs pronósticos para este tipo de cáncer ya que hemos visto que diferentes estudios obtienen resultados distintos.

Por último, los miARNs pueden actuar también como biomarcadores predictivos de la respuesta a tratamiento en CPNM, tanto a las terapias convencionales como a las nuevas terapias antidiaria. Existen algunos miARNs como el miR-210, cuyos niveles altos en suero de pacientes se asoció con el estadio clínico y con baja respuesta a quimioterapia basada en cisplatino (Z.-H. Li et al., 2013). También los niveles del oncomiR miR-21 en plasma de pacientes con CPNM se correlacionó con el estadio y la quimioterapia basada en platinos (Wei et al., 2011), mientras que en sangre periférica, los niveles altos del miR-22 se relacionaron con la pérdida de respuesta a la quimioterapia con pemetrexed, por tanto se puede considerar que miR-22 puede ser también un biomarcador para la quimioterapia con pemetrexed en pacientes con CPNM (Franchina et al., 2014).

Con todo lo expuesto hay suficiente evidencia que los miARNs juegan un importante papel en el proceso de carcinogénesis, y por consiguiente ser unos biomarcadores útiles en CPNM, pero hasta el momento no existe ninguno implementado en la práctica clínica. Por lo que se tendrá que continuar profundizando es su estudio para consensuar cuáles de ellos serán mejores para el uso en la práctica clínica.

## 5.2. MIARNs EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER DE PULMÓN

Los diferentes subtipos histológicos o moleculares de cáncer de pulmón, definen grupos de pacientes que recibirán terapias diferentes y que, a su vez, difieren en los patrones de sensibilidad/ resistencia a los tratamientos. Como es esperable, debido a su función en el control de la expresión génica, los miARNs juegan un papel central en la regulación de estas resistencias y sensibilidades.

Existen diversos artículos en los cuales se resume la asociación de los miARNs con la modulación de vías de resistencia a fármacos y en la Tabla 3 mostramos algunos ejemplos (Zang et al., 2017; Sin et al., 2016; Tibaldi et al., 2015; Rolfo et al., 2014). Sin embargo los mecanismos por los cuales estos miARNs afectan a la sensibilidad o a la

resistencia a fármacos de las células tumorales aún no están completamente esclarecidos.

La sobreexpresión o infraexpresión de miARNs afecta a la expresión de proteínas diana involucradas en respuesta a fármacos, determinando cambios en la sensibilidad a los mismos a través de diferentes mecanismos moleculares. Estas proteínas pueden ser dianas de fármacos, transportadores, o componentes relacionados con el ciclo celular y la apoptosis u otras vías clave de señalización celular. Por consiguiente, las nuevas aproximaciones para predecir la respuesta a fármacos deberían integrar los perfiles de expresión de miARNs y ARNm, considerándolos como biomarcadores moleculares potenciales. Además, los miARNs como dianas terapéuticas es un campo emergente para la optimización de tratamientos antitumorales para inhibir la proliferación celular e incrementar la sensibilidad a quimioterapia. Algunos estudios han demostrado que oligonucleótidos antisentido, llamados anti-miARNs (anti-miRs) o miARNs antagonistas (antagomiRs), pueden bloquear la función de los miARNs.

**Tabla 3. MiARNs involucrados en resistencia a fármacos.** A) Quimioterapia convencional, B) Fármacos antidiana.

| A. MiARNs involucrados en la resistencia a quimioterapia convencional |           |                               |                  |
|---|-----------|-------------------------------|------------------|
| miARNs  | Expresión | Fármaco                       | Dianas           |
| miR-200b  | ↓         | Docetaxel                     | E2F3             |
| miR-194/212   | ↓         | Docetaxel                     | Varios           |
| miR-192   | ↑         | Docetaxel                     | RB1              |
| miR-98/424  | ↑         | Docetaxel                     | Varios           |
| miR-100   | ↓         | Docetaxel                     | PIK1             |
| miR-135a  | ↑         | Paclitaxel                    | APC              |
| miR-34c-5p  | ↑         | Paclitaxel                    | BMF,MYC          |
| miR-337-3p  | ↓         | Paclitaxel, Docetaxel         | STAT3, RAP1A     |
| miR-181a  | ↓         | Cisplatino                    | BCL2, ATG5, MAPK |
| miR-630   | ↑         | Cisplatino                    | BAX              |
| miR-98/453  | ↑         | Cisplatino                    | TP53             |
| miR-181b/497  | ↓         | Cisplatino                    | BCL2             |
| miR-451   | ↓         | Cisplatino                    | BCL2, AKT        |
| Cluster miR-20b/429   | ↓         | Cisplatino                    | BCL2, XIAP       |
| miR-21  | ↑         | Cisplatino                    | PTEN             |
| miR-138   | ↓         | Cisplatino                    | ERCC1            |
| miR-513a-3p   | ↓         | Cisplatino                    | GSTP1            |
| miR-24  | ↓         | TRAIL                         | XIAP             |
| miR-221-222   | ↑         | TRAIL                         | PTEN, TIMP3, P27 |
| miR-130a  | ↓         | TRAIL                         | MET              |
| miR-212   | ↓         | TRAIL                         | PED              |
| miR-1   | ↓         | Doxorubicina                  | MET              |
| miR-128-2   | ↑         | Cisplatino, Doxorubicina, 5-F | E2F5             |
| miR-330   | ↑         | Gemcitabina                   | E2F1, DCK        |

| B. MiARNs involucrados en la resistencia a fármacos antitumorales |           |                                  |               |
|---|-----------|----------------------------------|---------------|
| miARN   | Expresión | Fármaco                          | Dianas        |
| miR-21/23b  | ↑         | Erlotinib, Vandetanib, Sunitinib | TKR           |
| miR-32a/29  | ↑         | Sunitinib                        | N/S           |
| miR-424   | ↓         | Erlotinib, Vandetanib            | N/S           |
| miR-200c  | ↓         | Erlotinib                        | EMT           |
| miR-214   | ↑         | Gefitinib                        | PTEN, AKT     |
| miR-30b/30c   | ↑         | Gefitinib                        | BIM           |
| miR-221/222   | ↑         | Gefitinib                        | APAF-1        |
| miR-103   | ↓         | Gefitinib                        | PKC-          |
| miR-203   | ↓         | Gefitinib                        | SRC           |
| miR-128b  | ↓         | Gefitinib                        | EGFR          |
| miR-126   | ↑         | Gefitinib                        | AKT, ERK      |
| miR-145   | ↓         | Gefitinib                        | AKT, ERK, MYC |

E2F3: factor de transcripción E2F3; PLK1, *polo like kinase 1*; APC, *adenomatous polyposis coli*; Bcl2, factor modificador de Bcl2; MYC, proto-oncogén MYC; STAT3, transductor de señal y activador de la transcripción 3; RAP1A, miembro de la familia del oncogén RAS; BCL2, regulador de la apoptosis, BCL2; ATG5, gen de autofagia 5; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno; BAX, regulador de apoptosis X asociado a BCL2; TP53, proteína tumoral p53; XIAP, inhibidor de la apoptosis ligado a X; ERCC1, ERCC reparación de escisión 1, subunidad no catalítica de la endonucleasa; GSTP1, glutatión S-Transferasa P1; TIMP3, inhibidor tisular de la metaloproteína 3; P27, subunidad 26S del proteasoma, no ATPasa 9; MET, proto-oncogén MET, receptor tirosina quinasa; PED, miembro 1 de la familia de portadores de soluto 2; E2F5: E2F, factor de transcripción E2F 5; E2F1, factor de transcripción E2F 1; DCK, deoxicitidina quinasa; TKR, transcetolasa 1; EMT, miembro 3 de la familia de portadores de soluto 22; BIM, *BCL2 like 11*; APAF1, factor activador de la peptidasa apoptótica 1; PKCE, proteína quinasa C épsilon; SRC, proto-oncogén SRC, tirosina quinasa no receptora; ERK, proteína quinasa activada por mitógeno 1 (Traducida de Rolfo et al., 2014).

Por lo expuesto anteriormente, parece evidente el papel tan importante que pueden ejercer ciertos miARNs en el inicio y mantenimiento del cáncer de pulmón, así como su utilidad como biomarcadores para la asignación de pronóstico o para la elección del tratamiento adecuado y por lo tanto, es importante seguir buscando, estudiando y validando nuevos miARNs biomarcadores utilizando técnicas fiables y sensibles como son la secuenciación masiva y la RTqPCR, antes de que estos biomarcadores puedan convertirse en herramientas clínicas oncológicas útiles.

## **II. OBJETIVOS**





El CPNM es una enfermedad heterogénea y de una etiopatología compleja. Los pacientes presentan diferente evolución que remarca la importancia de establecer nuevos biomarcadores pronósticos que permitan una mejor estratificación de los mismos. Por lo tanto, el objetivo principal de esta tesis es realizar un análisis exhaustivo del perfil de expresión de miARNs en CPNM en estadios resecables mediante una tecnología innovadora como es la secuenciación de nueva generación, validando los resultados obtenidos en cohortes independientes, de manera que se puedan proponer nuevos biomarcadores que puedan ser trasladables a la práctica clínica.

Los objetivos específicos de este estudio son:

1. Analizar en un grupo de prueba mediante secuenciación masiva el microARNoma en tejido tumoral y tejido normal adyacente.
2. Analizar mediante el uso de herramientas bioinformáticas los datos obtenidos de secuenciación (análisis de expresión diferencial entre grupos, GO y KEGG).
3. Validar la información obtenida en un grupo muestral independiente mediante una metodología diferente (RTqPCR).
4. Integrar los resultados obtenidos en variables analíticas con características clínico-patológicas de la cohorte de pacientes analizados.
5. Encontrar nuevos perfiles y firmas de miARNs y evaluar su posible papel como biomarcadores para mejorar la estratificación de los pacientes.
6. Validar los marcadores individuales o firmas pronósticos en diferentes cohortes de CPNM en estadios resecables.



### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**



## 1. PACIENTES Y MUESTRAS

### 1.1. PACIENTES

En este estudio se usaron dos cohortes de pacientes independientes. En el grupo de prueba se incluyeron 32 pacientes, mientras que 178 pacientes fueron seleccionados para la cohorte de validación. En ambos grupos los pacientes provenían del Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, y habían sido sometidos a cirugía entre los años 2004 al 2013. Los criterios de selección seguidos fueron los siguientes: pacientes con un diagnóstico histológico de CPNM reseca do y no pretratados (ni con radio ni con quimioterapia) en estadios I a IIIA (de acuerdo con *The American Joint Committee Cancer Staging* manual, 6ª edición). Todos los pacientes aceptaron participar voluntariamente en el estudio firmando el correspondiente consentimiento informado. Dicho estudio se llevó a cabo de acuerdo a la Declaración de Helsinki y a los requisitos regulatorios a nivel nacional. Además el protocolo de estudio se aprobó por el comité ético de investigación del CHGUV.

### 1.2. MUESTRAS

La obtención de las muestras de tejido pulmonar tuvo lugar inmediatamente después de la resección quirúrgica de los pacientes, donde un patólogo experto seleccionó dos muestras para realizar los análisis moleculares: una correspondiente al tejido tumoral y otra al tejido normal adyacente lo más alejada posible de la localización del tumor. Ambas muestras se preservaron en RNAlater® (Applied Biosystems) para evitar la degradación del ARN y se conservaron a -80º C hasta su uso.

## 2. EXTRACCIÓN DE ARN Y ADN

La extracción del ARN y ADN del tejido tumoral y tejido pulmonar sano adyacente se realizó utilizando la solución *TriReagent*® (Sigma), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Brevemente, se diseccionó una pequeña pieza de tejido de aproximadamente 10-20 mg y con la ayuda de un bisturí estéril, se disgregó manualmente. Posteriormente se colocó en un microtubo de rosca con 1 ml de *TriReagent*® para su homogeneización mediante el *Tissue Lyser*® (Qiagen) y seguidamente se añadió cloroformo al homogeneizado tisular con el fin de poder separar la fase acuosa que contiene el ARN de la interfase blanca de ADN. A

continuación, se procedió a la precipitación del ARN con isopropanol y posteriores lavados con etanol al 75% (2 lavados). Finalmente, el ARN se resuspendió en agua libre de nucleasas (*Qiagen*) y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

La interfase correspondiente al ADN se recogió en etanol 100%, realizándose sucesivamente tres lavados con solución de lavado (10% etanol/0.1M citrato sódico) y a continuación dos lavados más con etanol 75%. Por último se resuspendió el ADN en agua libre de nucleasas (*Qiagen*) y se almacenó a -80°C hasta su posterior análisis.

La cuantificación del ADN y ARN obtenidos en cada muestra se realizó mediante un nanoespectrofotómetro (*NanoDrop 2000C, Thermo Fisher Scientific*). Paralelamente, se evaluó la integridad y el tamaño del ARN mediante un análisis electroforético, empleando un bioanalizador basado en microfluidos, con el chip *Agilent RNA 6000 Nano (Agilent 2100, Agilent Technologies)*.

### **3. AISLAMIENTO DE ARN DE PEQUEÑO TAMAÑO**

La extracción del ARN de pequeño tamaño del tejido tumoral y normal adyacente se llevó a cabo mediante el kit *Purelink™ miRNA Isolation (Invitrogen)*, siguiendo las indicaciones del manual del kit *SOLID™ Total RNA-seq (Applied Biosystems)*. Brevemente, 10 ng de ARN total se llevaron a un volumen final de 90 µl con agua libre de nucleasas (*Qiagen*), se añadieron 300 µl de *Binding Buffer (L3)* y 210 µl de etanol 100%. Se cargó todo el volumen en la columna-tubo colector y se centrifugó para posteriormente descartar la columna y quedarse con el volumen eluido en el tubo colector, donde se añadieron 700 µl de etanol 100% y se homogenizó bien mediante pipeteo. A continuación se cargó la mitad del volumen en una segunda columna con su tubo colector y se centrifugó para descartar el líquido eluido. Se procedió de igual modo con la otra mitad del volumen. Posteriormente se realizaron dos lavados sucesivos a la columna, donde está retenido el ARN de pequeño tamaño, con el tampón de lavado y se desechó el tubo colector. Por último se eluyó el ARN de pequeño tamaño en 50 µl de agua libre de nucleasas y se almacenó a -80° C hasta su posterior uso.

#### 4. DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN *EGFR*

Para el análisis de las mutaciones del gen *EGFR* se usó el kit theraScreen® *EGFR* RGQ PCR (Qiagen). Este kit permite analizar 29 mutaciones somáticas localizadas en los exones 18-21 del gen *EGFR* (Tabla 4) mediante RTqPCR combinada con tecnología ARMS® y Scorpions®. Este método es altamente selectivo y, dependiendo de la cantidad de ADN mutado presente, tiene una sensibilidad de entre un 1-3%.

**Tabla 4. Mutaciones en el gen *EGFR* detectadas por el kit de TheraScreen.**

| EXON | MUTACIÓN                     |
|------|------------------------------|
| 18   | G719X (G719S, G719A, G719C)* |
| 19   | 19 deleciones*               |
| 20   | 3 inserciones*               |
| 20   | S768I                        |
| 20   | T790M                        |
| 21   | L858R                        |
| 21   | L861Q                        |

\* El kit no distingue entre ellas.

Cada reacción se llevó a cabo en placas de 96 pocillos con un volumen de reacción de 12,5 µl comprendiendo 9,75 µl de mix de reacción (cebadores, sondas, dNTPs y tampón de reacción con Cl<sub>2</sub>Mg), 0,25 µl de Taq DNA polimerasa y 2,5 µl de ADN (2-10ng/µl) aislado de muestras de cáncer de pulmón fresco congelado. Se incluyeron los controles pertinentes (positivo y negativo, proporcionados por el fabricante) en cada carrera. La reacción se llevó a cabo con el termociclador *LightCycler 480 II* (Roche) siguiendo las condiciones establecidas en la tabla 5:

**Tabla 5. Condiciones de la PCR.**

| Ciclos | Tiempo      | Temperatura |
|--------|-------------|-------------|
| 1      | 15 minutos  | 95° C       |
| 40     | 30 segundos | 95° C       |
|        | 60 segundos | 60° C       |

#### 5. DETERMINACIÓN DEL ESTADO MUTACIONAL DEL GEN *KRAS*

El análisis de las mutaciones de *KRAS* se llevó a cabo usando el kit theraScreen® *KRAS* Pyro® (Qiagen). Este kit se usa para la detección cuantitativa de mutaciones en los codones 12, 13 y 61 del gen *KRAS* mediante pirosecuenciación. Los codones 12/13 y el codón 61 se amplificaron por PCR usando 5 µl de ADN (10ng de ADN genómico), 12,5 µl de PyroMark® PCR Master Mix 2x, 2,5 µl de Coral Load 10x, 4 µl de agua libre



de nucleasas y 1 µl de cebadores de PCR KRAS 12/13 o 61. Las reacciones se llevaron a cabo en un MasterCycler® *thermocycler* (Eppendorf) siguiendo las condiciones detalladas en la Tabla 6.

**Tabla 6. Condiciones de la PCR**

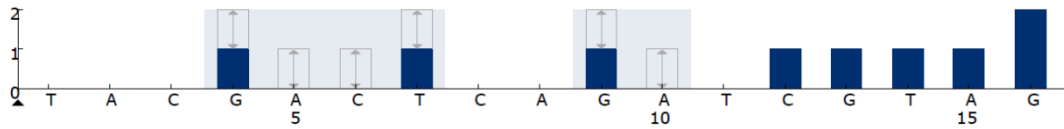
| <b>Etapa</b>       | <b>Tiempo</b> | <b>Temperatura</b> |
|--------------------|---------------|--------------------|
| Activación inicial | 15 minutos    | 95° C              |
| Ciclos (42)        |               |                    |
| Desnaturalización  | 20 segundos   | 95° C              |
| Annealing          | 30 segundos   | 53° C              |
| Extensión          | 20 segundos   | 72° C              |
| Extensión final    | 5 minutos     | 72° C              |

Los amplicones se inmovilizaron con microesferas de *Streptavidin Sepharose® High Performance* (GE Healthcare) y posteriormente se incubaron con los cebadores de secuenciación correspondientes mediante una placa PyroMark Q24 y una estación de vacío. Después se prepararon los reactivos del *PyroMark Gold Q24* (enzima, sustrato y nucleótidos) para cargarlos en el cartucho y poder ser dispensados durante el proceso de secuenciación. Finalmente, la placa y el cartucho se cargaron en el sistema PyroMark Q24 y se empezó el proceso de secuenciación. Las secuencias se analizaron mediante el *software* proporcionado por el fabricante. En cada carrera, se incluyeron dos controles: un control no metilado de ADN que sirvió como control positivo para las reacciones de secuenciación y PCR, y un control negativo (el ADN fue sustituido por agua libre de nucleasas).

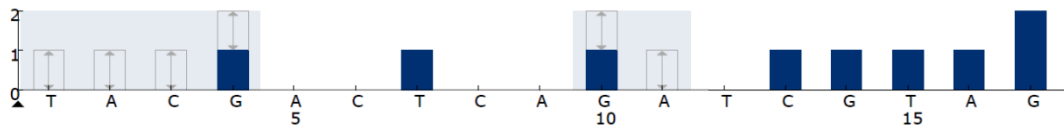
Este kit permite la detección de las mutaciones más frecuentes de *KRAS* localizadas en los codones 12, 13 y 61. El orden de dispensación de los nucleótidos para la secuenciación de los codones 12/13 fue *TACGACTCAGATCGTAG*, y para el codón 61 fue *GCTCAGTCAGACT*. El análisis de la secuencia para los codones 12/13 fue *GNTGRCGTAGGC*, que permite detectar las mutaciones más frecuentes en el codón 12, nucleótido 35 (segunda posición) y la mutación en el codón 13. Para analizar si las mutaciones estaban presentes en el nucleótido 34 (primera posición), la secuencia de análisis se cambió por *NGTGRCGTAGGC*. En el caso del exón 61, la secuencia de análisis fue *CTCDTGACCTG*, que representa la mutación más frecuente en este codón, detectada en el nucleótido 183 (tercera posición). Para analizar si la mutación estaba en el nucleótido 182 (segunda posición), la secuencia de análisis se cambió por

CTCTHGACCTG y para analizar si estaba presente en el nucleótido 181 (primera posición), la secuencia fue CTCTTSACCTG. Los histogramas esperados para cada secuencia se representan en la Figura 16.

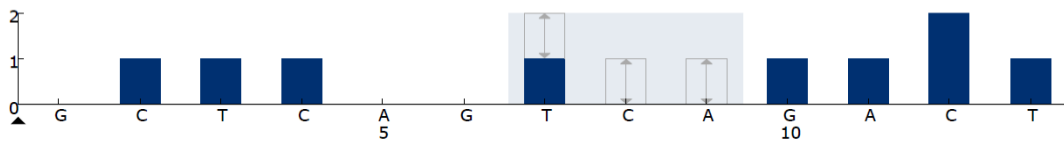
**Histograma de los codones 12 (nucleótido 35) y 13 (nucleótido 38)**



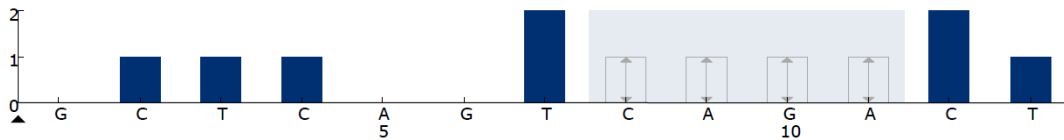
**Histograma de los codones 12 (nucleótido 34) y 13 (nucleótido 38)**



**Histograma del codón 61 (nucleótido 183)**



**Histograma del codón 61 (nucleótido 182)**



**Histograma del codón 61 (nucleótido 182)**

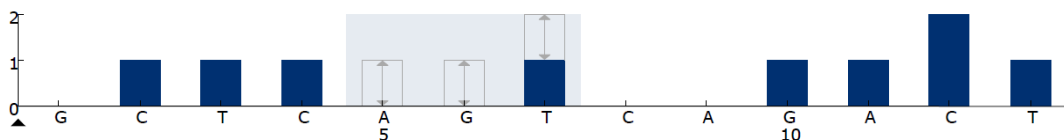


Figura 16. Representación gráfica de los histogramas para los codones o nucleótidos de acuerdo con las secuencias de análisis.

## 6. SELECCIÓN DE MUESTRAS PARA SECUENCIACIÓN MASIVA

La selección de muestras para su posterior secuenciación se llevó a cabo evaluando los perfiles de los electroferogramas obtenidos de cada par de muestras de ARN (tumor-normal; Figura 17). Para ello se siguió la siguiente dinámica de trabajo:

Primero las muestras se sometieron a un análisis de calidad del ARN total utilizando el chip *Agilent RNA 6000 Nano (Agilent 2100, Agilent Technologies)*. Aquellas muestras que obtuvieron un *RIN* (Número de integridad del ARN) mayor de 7 se analizaron con el chip *Agilent small RNA*. Las muestras que presentaron un perfil con picos definidos

para ARN de transferencia (ARNt), y ARN ribosómico (ARNr) 5S y 5.8S entre los 40 y los 150 nucleótidos y además obtuvieron un porcentaje de miARNs, entre los 6 y los 40 nucleótidos, inferior al 30% se sometieron a un aislamiento de la fracción de ARNs de tamaño pequeño (explicado previamente en el apartado 3). Esta fracción se sometió posteriormente a un análisis en bioanalizador usando el chip *Agilent small RNA*, donde se constató la presencia en el electroferograma de un perfil con los picos correspondientes a ARNt y ARNr como se ha explicado anteriormente (Figura 17).

Las muestras que superaron los tres procesos de selección se designaron como óptimas para someterse a la posterior ultrasecuenciación.

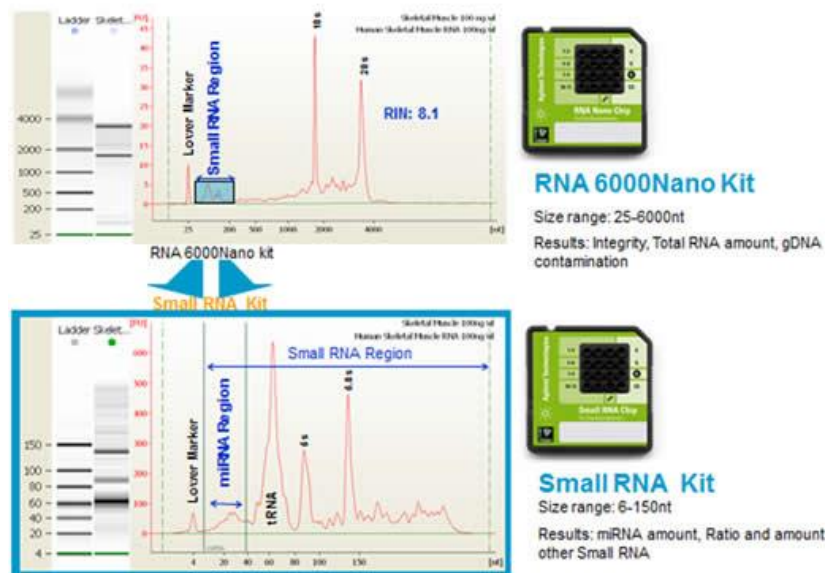


Figura 17. Electroferogramas esperados en el kit RNA 6000 Nano y en el Small RNA. En el primero se observan los dos picos pertenecientes al ARN ribosómico (18S y 28S) y la región que corresponde a los miARNs. En el segundo se observan los picos del ARN de transferencia, y del ARN ribosómico 5S, 5.8S, así como la región de miARNs.

## 7. SECUENCIACIÓN MASIVA

A partir de la fracción correspondiente a los ARNs de pequeño tamaño (6 - 40 nucleótidos) aislada, se procedió a la preparación de las muestras a secuenciar como sigue a continuación.

### 7.1. CONSTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS DE ADNc A PARTIR DE ARN PEQUEÑO

La construcción de las librerías se realizó mediante el kit *SOLID™ Total RNA-Seq* (Applied Biosystems), y en los posteriores apartados se detalla el procedimiento.

### 7.1.1. Hibridación y ligación del ARN

Se preparó la mezcla de hibridación como se detalla en la Tabla 7, utilizando tubos de PCR de 0,5 ml y posteriormente se homogeneizó.

**Tabla 7. Mezcla de hibridación**

| Componente                        | Volumen (μl) |
|-----------------------------------|--------------|
| ARN pequeño tamaño                | 3            |
| Solución de hibridación           | 3            |
| Mezcla de adaptadores             | 2            |
| <b>Volumen total por reacción</b> | <b>8</b>     |

Se puso en marcha la reacción de hibridación utilizando el termociclador, ABI GenAmp 9700 (*Life Technologies*). Las condiciones de hibridación utilizadas fueron las recomendadas por el fabricante: 10 minutos a 65 °C, seguidas de una incubación de 5 minutos a 16 °C.

Una vez terminada la reacción de hibridación se añadieron a cada microtubo los reactivos de ligación del ARN: tampón de ligación 2X (10 μl) y mezcla de enzimas de ligación (2 μl). Posteriormente se incubó en el termociclador a 16° C durante 16 horas.

### 7.1.2. Transcripción reversa (RT)

Una vez terminada la ligación se preparó la mezcla de reacción de la RT para un volumen final de 19 μl por reacción tal y como se muestra en la Tabla 8.

**Tabla 8. Componentes de la reacción de RT**

| Componente                        | Volumen (μl) |
|-----------------------------------|--------------|
| Agua libre de nucleasas           | 11           |
| Tampón 10X RT                     | 4            |
| Mezcla de dNTPs                   | 2            |
| Primers RT SOLiD™                 | 2            |
| <b>Volumen total por reacción</b> | <b>19</b>    |

Posteriormente se añadieron 19 μl de mezcla a cada 20 μl de reacción de ligación, se homogeneizó e incubó en el termociclador con una temperatura de la tapa de 70 °C durante 5 minutos y se enfrió rápidamente el hielo. Luego, se agregó 1μl de transcriptasa reversa *ArrayScript™* a cada reacción. Se mezcló bien con vortex, se centrifugó y se Incubó en el termociclador a 42 °C durante 30 minutos. El ADNc se almacenó a -80 °C hasta su utilización.

### 7.1.3. Purificación del ADNc

Para la purificación se usó el *kit MiniElute® PCR Purification* (Qiagen). Brevemente, se añadieron 60 µl de agua libre de nucleasas y 500 µl de tampón PBI al ADNc de simple cadena y se mezcló bien. Seguidamente se cargó todo el volumen en la columna y se centrifugó a 13000 g durante 1 minuto. Posteriormente se lavó el ADNc con 750 µl de tampón PE para posteriormente proceder a la elución con 10 µl de tampón EB (todos los tampones son provistos en el kit antes mencionado).

### 7.1.4. Selección del tamaño del ADNc

En este paso se usaron los productos de Novex® para preparar los geles, un marcador de peso molecular de 10pb para diferenciar entre los distintos tamaños de los fragmentos de ADNc, y *SYBR® Gold nucleic acid gel stain* (Invitrogen) para teñir los geles.

Brevemente, se preparó el gel tal y como se describe en el manual *Novel Pre-Cast Gel electrophoresis* (Invitrogen), posteriormente se desnaturalizaron las muestras y el marcador de peso molecular con solución tampón de urea (Novex TBE-Urea Sample Buffer 2X, Invitrogen) mediante incubación a 95 °C durante 3 minutos. Seguidamente se cargaron las muestras y el marcador en el gel teniendo en cuenta las siguientes directrices: i) no usar los pocillos externos del gel, ii) cargar el marcador a ambos lados de cada muestra de ADNc para servir de ayuda en la realización de cortes más precisos. Después, se corrió el gel a 180 V hasta que la segunda marca del frente rebasó la mitad ( $\approx$  45 minutos), para luego teñir el gel durante 5-10 minutos con *SYBR Gold nucleic acid gel stain*. Se puso el gel en el transiluminador y se cortó y recogió el trozo de gel que contenía los fragmentos de ADNc de 60 a 80 nucleótidos. Seguidamente se transfirió el trozo de gel a una zona limpia, manteniendo la orientación, y se cortó el gel verticalmente en cuatro trozos. Posteriormente se pasaron los dos trozos del centro a un tubo de PCR de 0,2 ml (son los que posteriormente se usan para la PCR), y los dos trozos exteriores a un microtubo de 1,5ml para su almacenaje a -20 °C.

Las longitudes esperadas del inserto y producto de PCR de acuerdo con la longitud del ADNc escindido son las que se indican en la Tabla 9.

Tabla 9. Longitudes del inserto y del producto de PCR.

| Longitud del ADNc escindido (nt) | Longitud del inserto (pb) | Longitud del producto de PCR (pb) |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------------------------|
| 42                               | ≈ 0                       | ≈ 93                              |
| 60                               | ≈ 18                      | ≈ 110                             |
| 80                               | ≈ 38                      | ≈ 130                             |

### 7.1.5. Amplificación del ADNc

En el proceso de amplificación de la librería de ADNc se incorporan los cebadores habituales P1 (dirección 5') y P2 (dirección 3'). En nuestro caso, el cebador P2 posee una particularidad, y es que contiene una secuencia correspondiente a un código de barras o *barcode* y un adaptador interno (IA), que permite construir librerías de ADNc para el sistema de secuenciación multiplexado de SOLiD (Figura 18). A los fragmentos de ADNc de cada muestra se les asigna un *barcode* diferente, de manera que se pueden combinar todas las muestras en la misma carrera de secuenciación (además se aprovecha mayor espacio en el portaobjetos o *slide*) y, posteriormente, cuando se realiza el análisis de las secuencias, se identifica qué secuencias corresponden a cada una de las muestras analizadas.

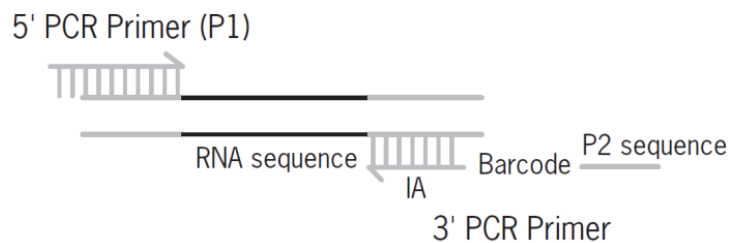


Figura 18. Amplificación de la librería de ADNc con cebadores del kit *SOLiD RNA Barcoding*. IA (adaptador interno).

De los dos cortes de gel para la PCR se pasó uno a un nuevo tubo de PCR de 0,2 ml de manera que para cada muestra se prepararon 98  $\mu$ l de mezcla para cada lámina del gel según la tabla 10:

Tabla 10. Componentes de la reacción de PCR.

| Componente                        | Volumen ( $\mu$ L)/reacción |
|-----------------------------------|-----------------------------|
| Agua libre de nucleasas           | 76,8                        |
| Tampón 10X PCR                    | 10                          |
| Mezcla de dNTPs 2.5mM             | 8                           |
| Cebador PCR SOLiD™ 5'             | 2                           |
| ADN polimerasa AmpliTaq®          | 1,2                         |
| <b>Volumen total por reacción</b> | <b>98</b>                   |

Transferir 98 µl de la mezcla de PCR a cada tubo. Posteriormente añadir 2 µl del cebador de PCR SOLiD 3' con código de barras del kit *SOLiD™ RNA barcoding* a cada tubo. Las condiciones de la PCR fueron las que se indican en la Tabla 11.

**Tabla 11. Programa de ciclado para la PCR de amplificación.**

| Etapa         | Temperatura | Tiempo |
|---------------|-------------|--------|
| Calentamiento | 95 °C       | 5 min  |
| Ciclos (15)   | 95 °C       | 30 seg |
|               | 62 °C       | 30 seg |
|               | 72 °C       | 30 seg |
| Calentamiento | 72 °C       | 4 min  |

#### 7.1.6. Purificación del ADN amplificado

Para la purificación del ADN amplificado se utilizó el kit *Purelink™ PCR Micro* (Invitrogen). Brevemente, se combinaron los volúmenes de las dos reacciones de una muestra en un mismo tubo de 1,5 ml donde se añadieron 800 µl de *Binding Buffer* (B2) y se mezcló bien. Posteriormente, se colocó una columna en un tubo colector y se cargó la mitad de la muestra, se centrifugó y descartó el eluido y se repitió el mismo procedimiento con la otra mitad de muestra. Se lavó la columna con 600 µl de *Wash Buffer* (W1) se centrifugó y se descartó el eluido y se volvió a centrifugar para secar el filtro de la columna. Se eluyó el ADN con 12 µl de *Elution Buffer*.

#### 7.1.7. Evaluación del rendimiento y distribución del tamaño del ADN amplificado

Para ello se utilizó el Bioanalizador Agilent 2100 con el kit *DNA 1000 (Agilent)*. Se cargó 1 µl de ADN purificado en el cartucho siguiendo las instrucciones del fabricante.

### 7.2. PREPARACIÓN DE LAS BEADS CON EL SISTEMA SOLiD™

Para la preparación de las *beads* se siguió el protocolo *Applied Biosystems SOLiD™ 4 System, Templated Bead Preparation Guide* (Figura 19) que se detalla a continuación.

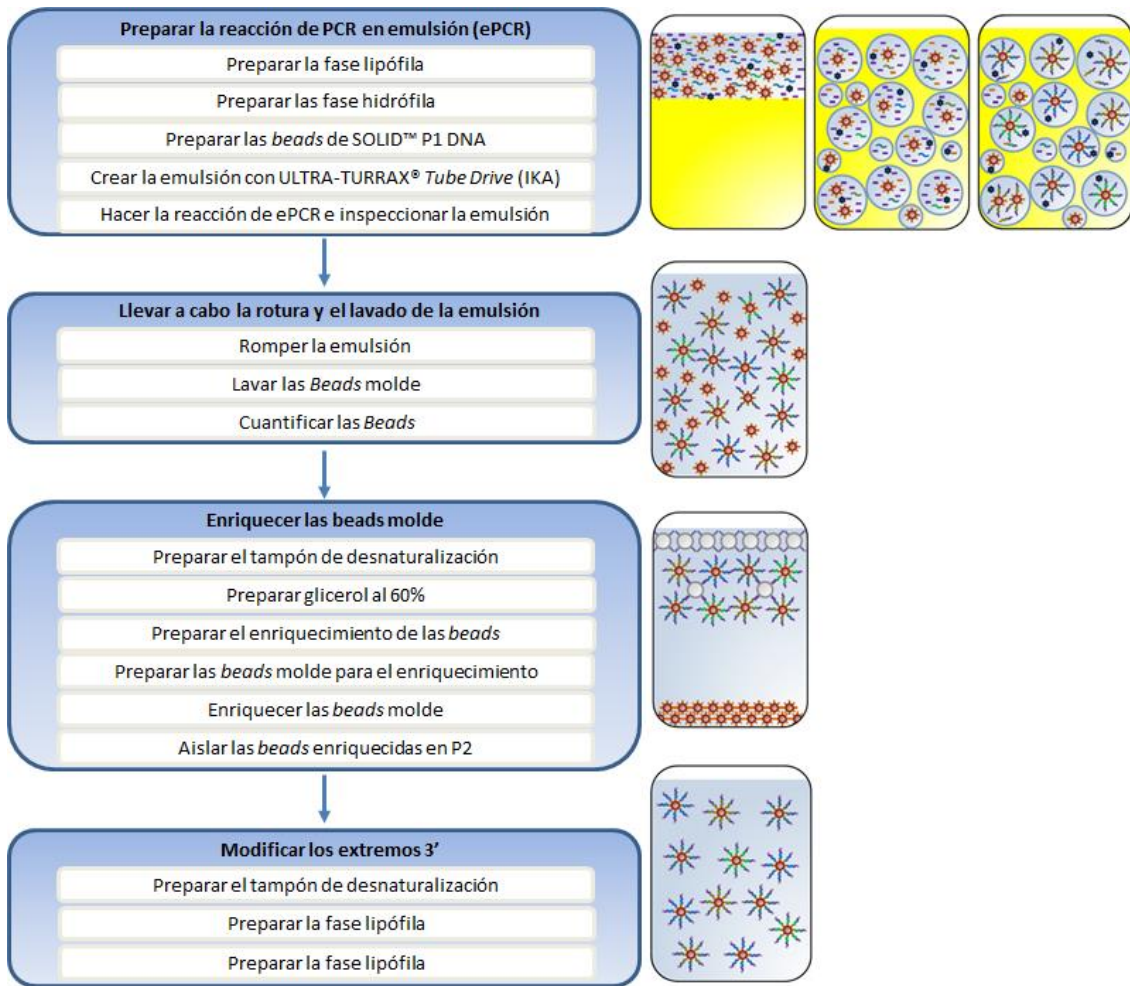
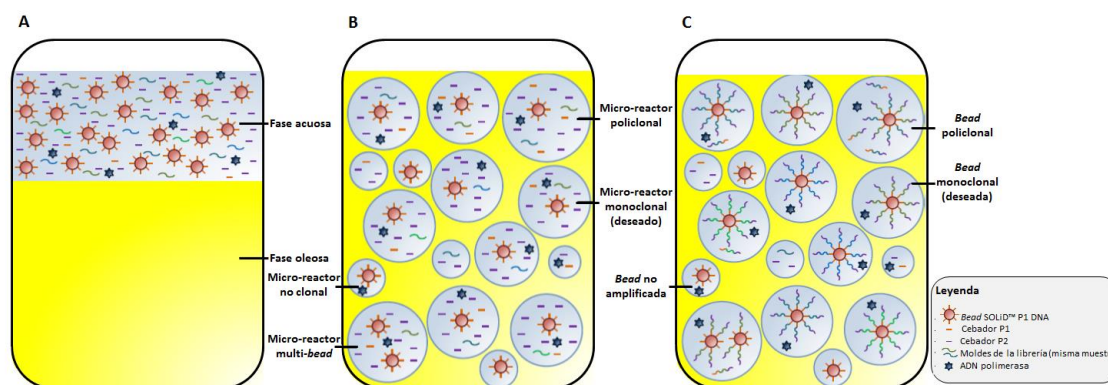


Figura 19. Esquema de trabajo para la preparación de las *beads* molde.

### 7.2.1. Preparar la PCR en emulsión (ePCR)

Tras la amplificación y purificación del ADNc se realizó una PCR en emulsión. Esta PCR consiste en la preparación de una emulsión de una fase acuosa con aceite mineral, que da lugar a microgotas que van a funcionar como microreactores. En el interior de cada uno de estos microreactores habrá una mezcla acuosa de la mezcla de PCR, que contiene el tampón correspondiente, nucleótidos, la ADN polimerasa, los cebadores para P1 y P2, y las bolas o *beads* que llevan unidos los adaptadores P1; además de los fragmentos o moléculas de ADNc (Figura 20A). Idealmente, en cada microreactor hay un solo fragmento de ADNc, de tal forma que una vez finalizada la PCR en emulsión, en el interior del microreactor se encuentre una *bead* en la que se ha amplificado un solo tipo de fragmento de ADNc (Figura 20B-C).





**Figura 20. Preparación de la emulsión.** A) Fase hidrófila e lipófila antes de la emulsificación. Las dos fases se preparan por separado para luego pasar a la emulsión de las mismas. B) Emulsión antes de la amplificación. C) Emulsión después de la PCR.

La fase lipófila e hidrófila de la emulsión se preparan por separado según las instrucciones del fabricante y después se emulsionan usando el sistema *ULTRA-TURRAX® Tube Drive* (IKA). Posteriormente se preparan las *beads* (*SOLiD™ P1 DNA beads*), vorteadando el tubo vigorosamente para posteriormente ponerlo en el magneto durante un minuto y eliminar el sobrenadante. Se resuspenden las *beads* con 200  $\mu$ l de solución de bloqueo de *beads*. Seguidamente se sonicen las *beads* usando el programa *Bead Block Declump* en el sistema *Covaris™ S2* (Covaris), y se pone el tubo en el magneto durante un minuto para eliminar el sobrenadante. Se resuspenden las *beads* con 200  $\mu$ l de Tampón *TEX 1X*. Se pone en tubo de ePCR que contiene la fase oleosa en el *ULTRA-TURRAX® Tube Drive* (IKA). Se sonicen las *beads* de *SOLiD™ P1 DNA* usando el programa *Covalent Declump 1* en el sistema *Covaris™ S2*. Inmediatamente se añaden 80  $\mu$ l de las *beads* a la fase acuosa, y después se mezcla suavemente moviendo la botella para asegurarse que las *beads* quedan uniformemente repartidas. Poner en marcha el *ULTRA-TURRAX* con el tubo con la fase oleosa y dispensar el volumen de la fase acuosa más las *beads* a la fase oleosa que está en rotación (Figura 20B). Con cuidado se dispensan 100  $\mu$ l de la emulsión en cada pocillo de una placa de 96, sellar la placa y ponerla en el termociclador. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las que se detallan en la Tabla 12.

Tabla 12. Condiciones de PCR.

| Etapa         | Paso              | Temperatura | Tiempo |
|---------------|-------------------|-------------|--------|
| Calentamiento | Desnaturalización | 95 °C       | 5 min  |
| Ciclos (60)   | Desnaturalización | 93 °C       | 15 seg |
|               | Anneling          | 62 °C       | 30 seg |
|               | Extensión         | 72 °C       | 75 seg |
| Calentamiento | Extensión final   | 72 °C       | 7 min  |
| Calentamiento | --                | 4 °C        | ∞      |

Después de la PCR se inspecciona el fondo de los pocillos de la placa para ver las *beads* que han quedado fuera de la emulsión. Las *beads* aparecen como de color ámbar al fondo del pocillo. Un pequeño número de beads puede caer fuera de la emulsión y aparecer como una manchita marrón al fondo del pocillo.

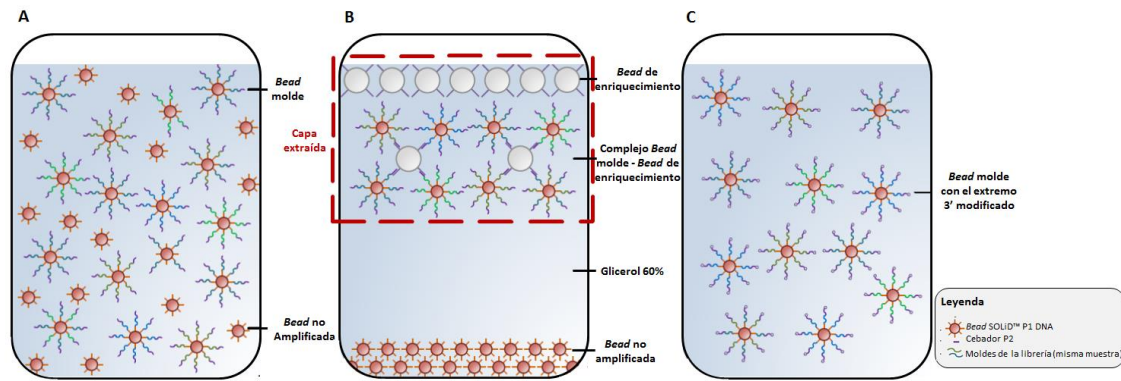
Seguidamente se procedió a la rotura de la emulsión, usando el *SOLiD Emulsion Collection tray* e invirtiendo la placa para su centrifugado durante 2 min a 550 g.

Cada emulsión se sembró con 800 millones de *beads SOLiD™ P1 DNA*, para luego transferirlas a una placa de 96 pocillos y hacer la PCR.

### 7.2.2. Rotura de la emulsión y lavado de las *beads*

Posteriormente, se realizó un enriquecimiento de *beads*, separando las que poseen las cadenas molde extendidas de las que no han unido de fragmentos de ADNc ni ha tenido lugar la amplificación. Las cadenas molde de las *beads* seleccionadas se modifican por su extremo 3' para permitir una unión covalente al portaobjetos de vidrio o *slide*.

La rotura de la emulsión se llevó a cabo añadiendo 2-butanol para purificar las beads emulsionadas de la fase oleosa, después se lavaron para quitar los restos de 2-butanol, aceite y los restos de reactivos de la PCR de la fase acuosa y se centrifugaron (Figura 21A). La Una vez rota la emulsión se transfirió a un tubo de 50 ml para su posterior procesado.



**Figura 21. Rotura de la emulsión.** A) *Beads* molde y no amplificadas tras la rotura de la emulsión y el lavado de las mismas. B) Enriquecimiento de las *beads* con el SOLiD™ P1 DNA después de la centrifugación con 60% de glicerol. C) *Beads* molde después de la modificación en el extremo 3'.

### 7.2.3. Enriquecimiento de las *beads*

El proceso de enriquecimiento de las *beads* se llevó a cabo mediante aislamiento por hibridación usando la secuencia del cebador P2. Para ello se usan unas *beads* de polistireno unidas a un fragmento complementario al cebador 2. La mezcla de *beads* enriquecidas se centrifugó con glicerol 60%. Las *beads* policlonales y las monoclonales enriquecidas se extrajeron y desnaturalizaron para disociarlas de las *beads* de polistireno (Figura 21B).

### 7.2.4. Modificación de los extremos 3'

Las *beads* enriquecidas se extendieron con un *bead linker* mediante transferasa terminal (Figura 21C). Después se cuantificó la cantidad de *beads* y se ajustó el volumen para tener una concentración entre 750.000 y 1,25 millones *beads*/μl.

## 7.3. PROCESO DE SECUENCIACIÓN

Una vez las *beads* estaban a la concentración requerida se depositaron en la lámina (*slide*), que posteriormente se cargó en el secuenciador, según las instrucciones del fabricante descritas en *Applied Biosystem SOLiD 4® System Instrument Operation Guide* (PN 44498379C). En la Figura 22 se describe el flujo de trabajo seguido en este paso.

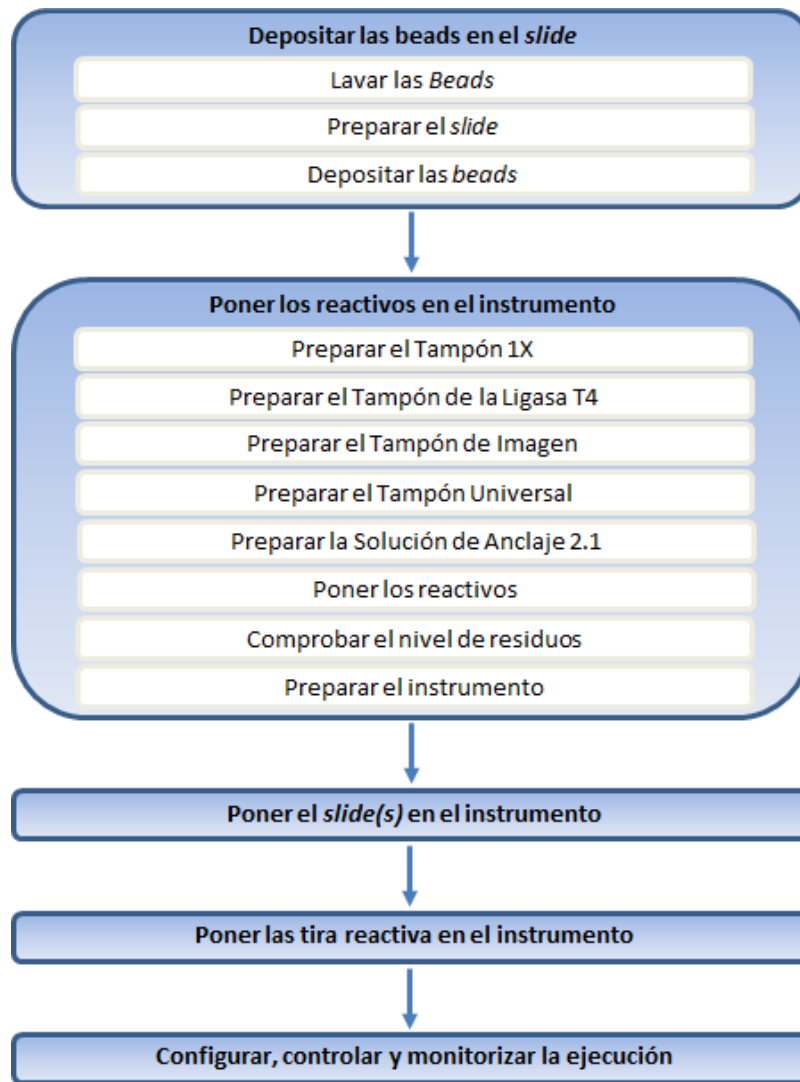
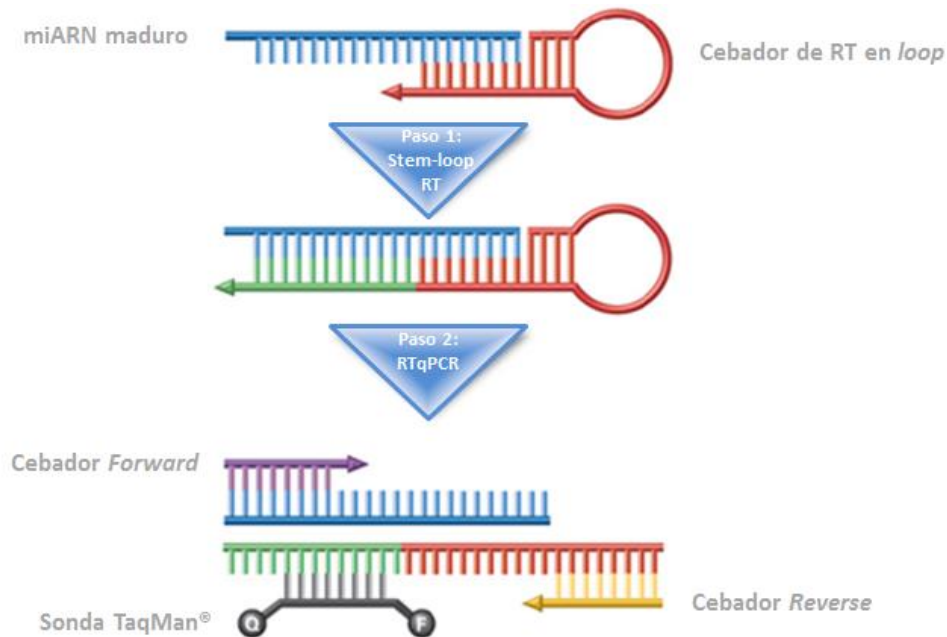


Figura 22. Flujo de trabajo seguido para llevar a cabo la secuenciación mediante el sistema SOLiD 4.

## 8. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

La cuantificación de los miARNs se realizó usando los ensayos *TaqMan*<sup>®</sup> *MicroRNA* (Applied Biosystems), que contienen los cebadores para la RT (transcripción reversa) y las sondas de hidrólisis para la qPCR. Su diseño innovador resuelve un problema fundamental en la cuantificación de miARNs: el pequeño tamaño de los miARNs maduros no permite un diseño convencional en el que primero se lleva a cabo una RT con cebadores al azar seguido por un ensayo específico de PCR a tiempo real. El cebador de *stem-loop* cumple dos objetivos: 1) la especificidad para sólo un miARN maduro diana, y 2) la formación de una quimera cebador de RT/ miARN maduro, que extiende el extremo 5' del miARN. El amplicón de RT resultante se somete a una PCR a

tiempo real estándar, usando ensayos TaqMan. Se puede ver un esquema del proceso en la Figura 23. Por tanto este mecanismo se divide en dos pasos que se detallan a continuación.



**Figura 23. Mecanismo del TaqMan® MicroRNA assay.** Un simple modo de acción dividido en dos pasos que confiere las ventajas de la PCR a tiempo real a la cuantificación de miARNs.

### 8.1. TRANSCRIPCIÓN REVERSA (RT)

En la RT el ADNc es transcrito a partir de muestras de ARN total, mediante un cebador *stem-loop* de RT específico para cada miARN de los TaqMan® MicroRNA Assays y usando los reactivos del kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems). Para ello se utilizó el protocolo *Creating Custom RT and Preamplification Pools using TaqMan® MicroRNA Assays* (4465407) sin preamplificación posterior. Primero, se preparó una mezcla de cebadores (primer pool) con todos los cebadores *stem-loop* de RT específicos de cada miARN del estudio con tampón Tris-EDTA (TE) pH 8 para conseguir una concentración final de 0,05X por ensayo en la solución. La finalidad de este protocolo es conseguir que en un misma RT se retrotranscriban todos los miARNs del estudio y optimizar así tanto la cantidad de ARN como de reactivos utilizados. Cada reacción constó de 0,75 µl de tampón de retrotranscripción 10x (RT), 0,15 µl de mezcla de dNTPs, 3 µl de la mezcla de cebadores, 1,5 µl de la transcriptasa reversa MultiScribe™ (Applied Biosystems), 0,1 µl

de inhibidor de RNAsas y 500 ng de ARN. Se llevó a un volumen final de 7,5  $\mu$ l con agua libre de nucleasas. Las reacciones de RT se llevaron a cabo en placas de 96 pocillos usando un termociclador MasterCycler® (Eppendorf) siguiendo las condiciones descritas en la Tabla 13. El ADNc obtenido fue diluido 1:25 veces con agua libre de nucleasas y almacenado a -80° C hasta su posterior análisis.

**Tabla 13. Programa de ciclado para la reacción de la transcripción reversa.**

| Etapa | Temperatura | Tiempo   |
|-------|-------------|----------|
| 1     | 16 °C       | 30 min   |
| 2     | 42 °C       | 30 min   |
| 3     | 85 °C       | 5 min    |
| 4     | 4 °C        | $\infty$ |

## 8.2. PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RTqPCR)

La cuantificación de los miARNs se llevó a cabo mediante RTqPCR usando sondas de hidrólisis ligadas a un fluoróforo en el extremo 5' de las sondas específicas de miARNs (TaqMan® microRNA, Applied Biosystems). Este sistema también incluye un *non-fluorescent quencher* (NFQ) en el extremo 3' de la sonda y un *Minor Groove Binder* (MGB) anclado al NFQ que incrementa la temperatura de *melting* ( $T_m$ ) sin aumentar la longitud de la sonda (Figura 24).

En este estudio se analizaron un total de 22 miARNs que fueron seleccionados por el número de lecturas que se obtuvieron en el estudio previo de secuenciación (los miARNs analizados tenían un media en las muestras de > 150 lecturas). Los niveles de expresión fueron evaluados usando *TaqMan MicroRNA Assays* (Applied Biosystems) y son descritos en la Tabla 14. El miARN que se usó como control endógeno fue el miR-16. Previamente testamos la expresión de este miARN para comprobar que no hubiera diferencias significativas entre las muestras normales y tumorales.

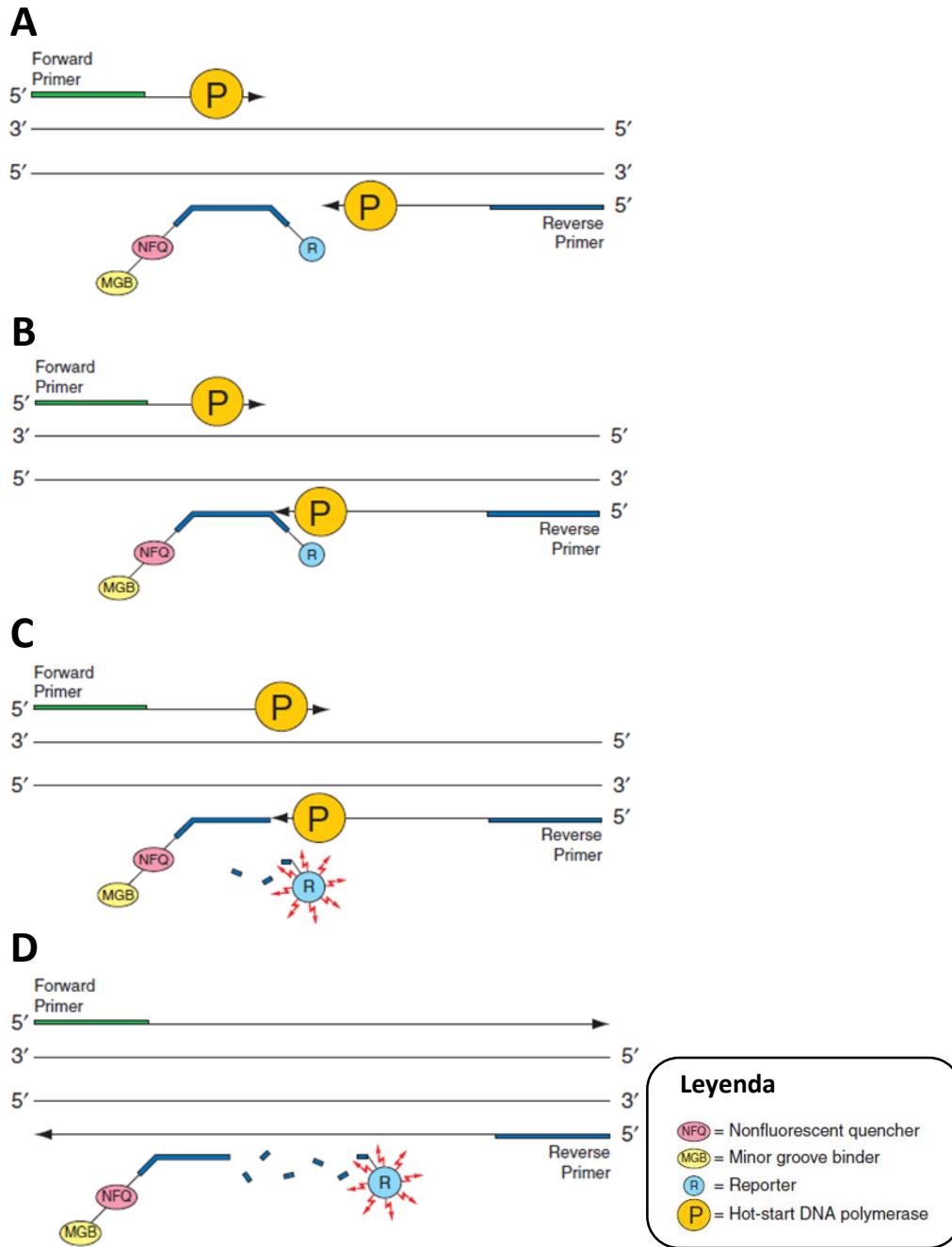


Figura 24. Pasos de la reacción de qPCR con ensayos *TaqMan*<sup>®</sup> *microRNA*. A) Polimerización. B) Elongación de la cadena, C) Rotura. D) Polimerización completa (Modificada de *TaqMan MicroRNA Assays protocol*).

Tabla 14. MiARNs analizados en este estudio y su identificación de ensayo TaqMan.

| microRNA              | Ensayo |
|-----------------------|--------|
| hsa-miR-16 (endógeno) | 391    |
| hsa-miRNA-145         | 002278 |
| hsa-miRNA-139-5p      | 002289 |
| hsa-miRNA-30a-5p      | 000417 |
| hsa-miRNA-218         | 000521 |
| hsa-miRNA-34a         | 000426 |
| hsa-miRNA-196b        | 002215 |
| hsa-miRNA-188-5p      | 002320 |
| hsa-miRNA-135b        | 002261 |
| hsa-miRNA-182         | 002334 |
| hsa-miRNA-590-5p      | 001984 |
| hsa-miRNA-31          | 002279 |
| hsa-miRNA-224         | 002099 |
| hsa-miRNA-195         | 000494 |
| hsa-miRNA-125a-5p     | 002198 |
| hsa-miRNA-126         | 000451 |
| hsa-miRNA-144         | 002148 |
| hsa-miRNA-199b        | 000500 |
| hsa-miRNA-19b-1       | 002425 |
| hsa-miRNA-29a         | 002447 |
| mmu-miR-451a          | 001141 |
| hsa-miRNA-339-5p      | 002257 |
| hsa-miRNA-21          | 000397 |

Cada reacción se realizó por duplicado en placas de 384 pocillos con una volumen final de 5  $\mu$ l, de los cuales, 2,5  $\mu$ l de *TaqMan Gen Expression Master Mix II, no UNG* (Applied Biosystems), 1,25  $\mu$ l de agua libre de nucleasas, 0,25  $\mu$ l de *TaqMan MicroRNA Assay* (Applied Biosystems), y 1  $\mu$ l de ADNc. En cada PCR se incluyeron controles negativos, así como un control positivo (ARN de la línea celular NCI-H23 de CPNM, ATCC: CRL-5800TM). Las reacciones se llevaron a cabo en el equipo *7900HT Fast Real-Time PCR thermocycler* (Applied Biosystems) siguiendo las condiciones que se describen en la Tabla 15.

Tabla 15. Condiciones de la RTqPCR.

|                        | Etapa                      | Temperatura | Tiempo |
|------------------------|----------------------------|-------------|--------|
| <b>Pre-PCR*</b>        | Activación de la Taq       | 95 °C       | 10 min |
| <b>PCR (40 ciclos)</b> | Desnaturalización          | 95 °C       | 15 seg |
|                        | <i>Anneling</i> /Extensión | 60 °C       | 1 min  |

\*La etapa de 95° C es indispensable para activar la enzima AmpliTaq Gold



Los niveles de expresión relativa de cada miARN se calcularon para el caso de la validación de la desregulación utilizando el método de Cq comparativo ( $2^{-(Cq_{\text{sample}} - Cq_{\text{control}})}$ ) (Bediaga et al., 2013) y para los análisis de supervivencia mediante el ratio de la expresión del miARN diana frente a la expresión del miARN de referencia utilizando la fórmula de Pfaffl (Pfaffl, 2001). La cuantificación relativa determina los cambios en los niveles de miARNs en estado estacionario de un miARN diana a través de múltiples muestras y lo expresa en relación a los niveles del miARN control.

## 9. ANÁLISIS DE DATOS

### 9.1. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO EN EL GRUPO PRUEBA E *IN SILICO*

El análisis de expresión diferencial de los datos obtenidos por secuenciación en el grupo prueba se llevó a cabo mediante el programa CLCbio. Los datos crudos obtenidos de la secuenciación, formatos *color space fasta* (csfasta) y *quality* (qual), se agruparon para cada muestra, ya que cada muestra tenía asociado un código de barras y se transformaron a archivos *fastq*. Estos archivos se importaron al *software CLC Genomics Workbench 5.5.2* en una plataforma Linux. El *triming* y el *count* se realizaron juntos para quitar los adaptadores y para encontrar diferentes marcas (*tags*) para el conteo. Seguidamente se realizó la anotación de miARNs, utilizando la plataforma *miRBase* versión 20.0 (*Homo sapiens*). Las lecturas para el mismo miARN maduro se agruparon para llevar a cabo el análisis de expresión. La normalización de los datos se realizó por totales (RPKM, del inglés lecturas por kilobase por millón), el número de lecturas de un miARN maduro entre el número total de lecturas por muestra. Posteriormente se procedió al análisis de componentes principales para analizar la distribución de las muestras respecto a los miARNs. El análisis de expresión diferencial tanto entre tejido tumoral y normal, como por subgrupos (histología, sexo, estadio) se llevó a cabo en el mismo programa usando el test de Baggerley que es un test pareado de proporciones.

El análisis de *clustering* se realizó usando código R haciendo una transformación logarítmica de los datos y aplicando la distancia euclídea. Los niveles de expresión se representaron escalados del 0 al 1 dependiendo del nivel de expresión.

Para el análisis funcional se siguió la metodología descrita por García-García y col.

Esta metodología está basada en el efecto inhibitorio aditivo que los miARNs pueden tener sobre los genes. Para ello se usaron los p-valores y los test estadísticos obtenidos de la expresión diferencial, donde el p-valor representa la robustez de la expresión diferencial del miARN entre muestras tumorales y normales, mientras que el signo del estadístico indica el sentido, o dirección, de la diferencia; en nuestro caso los valores del estadístico positivos indican sobreexpresión en el tumor, y valores estadísticos negativos indican infraexpresión en tumor. Para cada miARN estos dos valores se combinaron en un único índice, teniendo en cuenta la fuerza y el sentido de la expresión diferencial utilizando la siguiente transformación:  $r = -\text{signo}(\text{estadístico}) * \log(\text{p-valor})$  (García-García et al., 2016).

Este índice ordena los miARNs de acuerdo a sus diferencias en los niveles de expresión, desde más sobreexpresados en tejido tumoral (aquellos con valores positivos más altos) a los más infraexpresados (índices que son más negativos). De acuerdo con esto, miARNs con un índice cercano a 0 serán aquellos con semejantes niveles de expresión en ambos, tumor y normal, que serán aquellos no expresados diferencialmente. En nuestro caso los valores r se derivaron del test de Baggerley, utilizado para el análisis diferencial.

Por lo que se sabe, la inhibición de ciertos genes debe ser proporcional a la cantidad de moléculas de miARNs que lo regulan. Además, diferentes miARNs pueden inhibir el mismo gen, teniendo un efecto aditivo en sus niveles de expresión. Por esta razón la interferencia de un gen debe ser directamente relacionada con la suma de los niveles de expresión de sus miARNs reguladores. La inhibición diferencial de cada gen puede ser proporcional a la suma de las diferencias de expresión de sus miARNs reguladores.

Teniendo en cuenta la computación para todos los genes en un grupo de datos experimental, se derivó un nuevo índice transferido, que ordena los genes de acuerdo a su inhibición diferencial. Genes que muestren el índice de inhibición diferencial más alto serán aquellos más probablemente interceptados en tejido tumoral, mientras aquellos con índices más bajos corresponderán a genes que son más inhibidos en normales comparados con tumorales. Genes con índice de inhibición diferencial cercano a 0 serán aquellos que no muestren diferencias significativas en términos de su regulación por miARNs. Obviamente, para calcular este índice la relación entre los

miARNs y sus genes diana debe definirse previamente. En este estudio se extrajo tal información de *TargetScan Predicted and Conserved Targets database* (Friedman et al., 2009).

Este índice transferido implica la ordenación de los genes de tal manera que la regulación génica vía la acción de miARNs es fácilmente interpretable. Este ordenamiento de genes es, por supuesto, informativo es sí mismo pero también tiene la ventaja de ser sencillo de interpretar en términos de conjuntos de genes tales como los descritos por las bases de datos GO (Ashburner et al., 2000), KEGG (Kanehisa and Goto, 2000) o Reactome (Joshi-Tope et al., 2005). Modelos de regresión logística se han usado previamente con éxito para el análisis de conjuntos de genes basados en una estadística de ordenación (Sartor et al., 2009).

En nuestro estudio usamos los términos GO (Ashburner et al., 2000) para definir nuestro grupo de genes. La anotación se bajó de la página web Ensembl (<http://www.ensembl.org>). Analizamos las ontologías de proceso biológico, los componentes celulares y la función molecular para obtener una estimación y su correspondiente p-valor (p) para cada término GO analizado. Corregimos los valores de p para múltiples pruebas para controlar la tasa de falsos descubrimientos utilizando el método de FDR (del inglés *false discovery rate*; Benjamini and Yekutieli, 2001).

Para el análisis del grupo *in silico*, se usaron dos grupos de datos de cáncer de pulmón del consorcio del TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) (Cancer Genome Atlas Research Network, 2012; Cancer Genome Atlas Research Network, 2014). La información clínica y de secuenciación de miARNs (*miRNASeq*) se descargó del portal de datos de *The International Cancer Genome Consortium* (ICGC) (J. Zhang et al., 2011). En estos pacientes, los datos de secuenciación se obtuvieron por la plataforma de HiSeq Illumina y se proporcionan como RPKM normalizadas (lecturas por kilobase por millón de lecturas mapeadas). Como los datos de secuenciación proporcionados por el portal de datos del ICGC, no están clasificados por el nombre del miARN sino por su posición genómica, los valores de RPKM de miR-21-5p y miR-188-5p (a partir de ahora miR-21 y miR-188) se extrajeron usando sus posiciones genómicas, obtenidas de miRBase (<http://mirbase.org/>).

## 9.2. ANÁLISIS ESTADÍSTICO EN LOS GRUPOS DE VALIDACIÓN E *IN SILICO*

El primer análisis estadístico realizado fue el test de Kolmogorov-Smirnov para valorar si las variables utilizadas en el estudio seguían una distribución normal. Debido a que muchas de ellas no mostraron este tipo de distribución, el resto de análisis se hicieron utilizando estadística no paramétrica. Las variables continuas se compararon utilizando los tests U de Mann Whitney y Kruskal Wallis. El rango de Spearman se utilizó para analizar posibles correlaciones entre las variables continuas, y las asociaciones entre las variables dicotomizadas se evaluaron utilizando el test de Chi-cuadrado.

La supervivencia libre de enfermedad (SLE) y global (SG) se calcularon desde la fecha de cirugía hasta la fecha de la recaída (en el caso de que la hubiera, y siguiendo los criterios de *Response Evaluation Criteria in Solid Tumours*, RECIST) o de exitus, respectivamente (Therasse et al., 2000). En los casos no censurados, la fecha considerada para los cálculos fue la del último seguimiento registrado. Los análisis de supervivencia se llevaron a cabo mediante el método de regresión de Cox univariante usando las variables clinicopatológicas y la expresión relativa dicotomizada de los miARNs. Las curvas de supervivencia se construyeron utilizando el método de Kaplan-Meier, y la significación estadística entre las curvas se evaluó mediante el test de log-rango. La combinación de miARNs también se analizó para encontrar perfiles de expresión con valor pronóstico.

Finalmente, para evaluar el valor independiente de los miARNs analizados, se utilizó un modelo de regresión de Cox para análisis multivariantes. Todas las variables significativas (tanto analíticas como clinicopatológicas) en los análisis univariantes se integraron en los análisis multivariantes en un análisis de regresión de Cox paso a paso.

Una  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativa para todos los análisis. Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) version 15.0. Finalmente, *GraphPad Prism v5.0* (GraphPad Software Inc.) se utilizó para construir algunas de las gráficas presentadas en los resultados.



## **IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**



## 1. ANÁLISIS DE SECUENCIACIÓN MASIVA

Este análisis se llevó a cabo para estudiar el miARNoma en muestras frescas congeladas de tumores resecados en pacientes con CPNM. Se analizaron los miARNs en muestras de tejido tumoral y normal adyacente.

### 1.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Este estudio incluyó 32 pacientes con CPNM, que fueron sometidos a resección quirúrgica en el Consorcio Hospital General de Valencia. Se usaron muestras pareadas tejido tumoral/ tejido pulmonar normal adyacente conservadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en *RNAlater*<sup>®</sup>. Las características de esta cohorte, denominada cohorte de prueba, se muestran en la Tabla 16. La edad mediana de los pacientes fue de 64 años [rango: 47-82], el 81,2% fueron hombres, y el 59,4% fueron SCC. Además, el 53,1% de los pacientes fueron diagnosticados en estadio I de la enfermedad y el 68,8% presentaron un buen estado funcional (PS=0).

**Tabla 16. Características clinicopatológicas de los pacientes del grupo de prueba.**

| Características                            | N         | %              |
|--|-----------|----------------|
| <b>Edad a la cirugía (mediana, rango):</b> | <b>64</b> | <b>[47-82]</b> |
| <b>Género</b>                              |           |                |
| Hombre                                     | 26        | 81,2           |
| Mujer                                      | 6         | 18,8           |
| <b>Estadio<sup>a</sup></b>                 |           |                |
| I  | 17        | 53,1           |
| II   | 6         | 18,8           |
| IIIA                                       | 9         | 28,1           |
| <b>Histología</b>                          |           |                |
| SCC  | 13        | 40,6           |
| ADC  | 19        | 59,4           |
| <b>Estado Funcional (PS)</b>               |           |                |
| 0  | 22        | 68,8           |
| 1-2  | 10        | 31,2           |
| <b>Grado de Diferenciación</b>             |           |                |
| Pobre                                      | 10        | 31,2           |
| Moderado                                   | 12        | 37,5           |
| Bueno                                      | 7         | 21,9           |
| NE   | 3         | 9,4            |
| <b>Tabaquismo</b>                          |           |                |
| Fumador                                    | 16        | 50             |
| Exfumador                                  | 8         | 25             |
| No fumador                                 | 8         | 25             |

ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma de célula escamosa; NE, No Especificado.

<sup>a</sup> De acuerdo a *American Joint Committee on Cancer Staging Manual*, 6th edition.

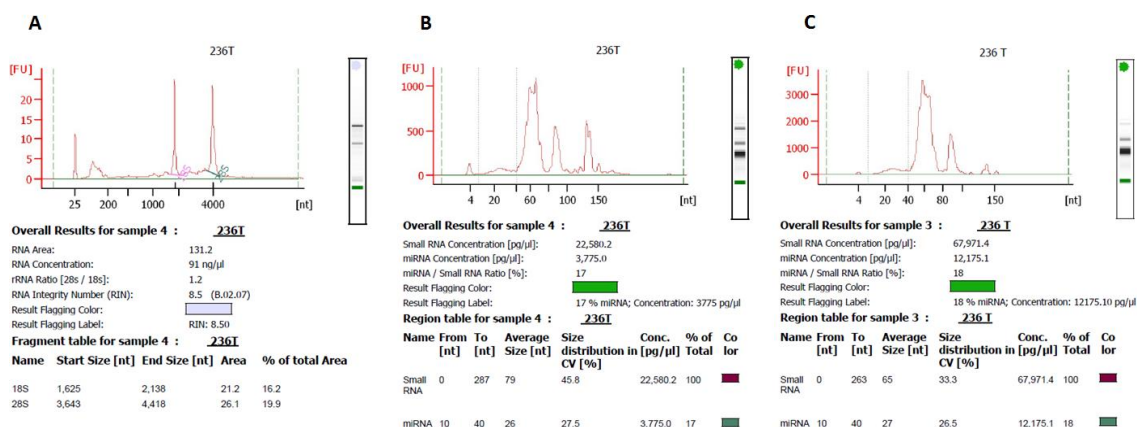


## 1.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD Y SELECCIÓN DEL ARN PARA SECUENCIAR

De todas las muestras analizadas, solo 32 pacientes resultaron tener un perfil óptimo de calidad tanto en la muestra correspondiente a tejido tumoral como a tejido sano para poder ser usadas posteriormente en los estudios de secuenciación masiva.

Una muestra de ARN se consideró óptima cuando los perfiles de ARN total y de la fracción de ARN de pequeño tamaño pre y post enriquecimiento cumplían con los siguientes parámetros (Figura 25):

- RIN (índice de integridad del ARN) superior a 7.0
- Línea basal baja (poco ruido de fondo)
- Un porcentaje de miARNs en la fracción de pequeños ARNs menor al 30% en la muestra pre-enriquecimiento.
- Presencia de tres picos correspondientes al ARNt y al ARNr 5.8S (tanto en las muestras pre-enriquecidas como post enriquecimiento) en el chip de *small RNAs*.

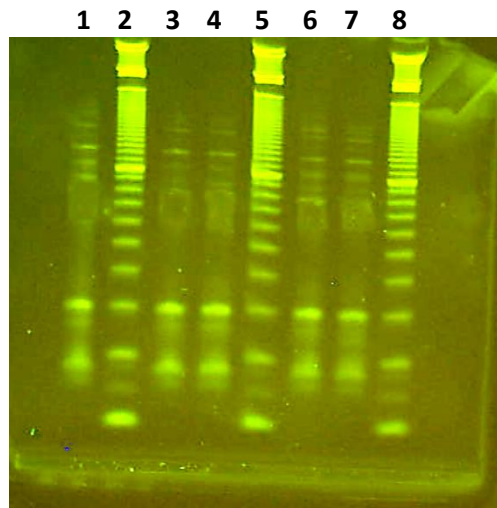


**Figura 25. Ejemplo de una muestra que cumplía con los criterios de calidad para ser incluida en el estudio de secuenciación masiva.** La figura A corresponde al chip de *RNA6000*, la B al chip de *small RNA* antes del enriquecimiento de la fracción de ARN de pequeño tamaño y la C al chip *small RNA* posterior al enriquecimiento de la fracción de ARN de pequeño tamaño. En todos los gráficos se pueden ver que los parámetros requeridos están dentro de los rangos establecidos para tomar una muestra como óptima para la secuenciación.

## 1.3. CONTRUCCIÓN DE LAS LIBRERÍAS

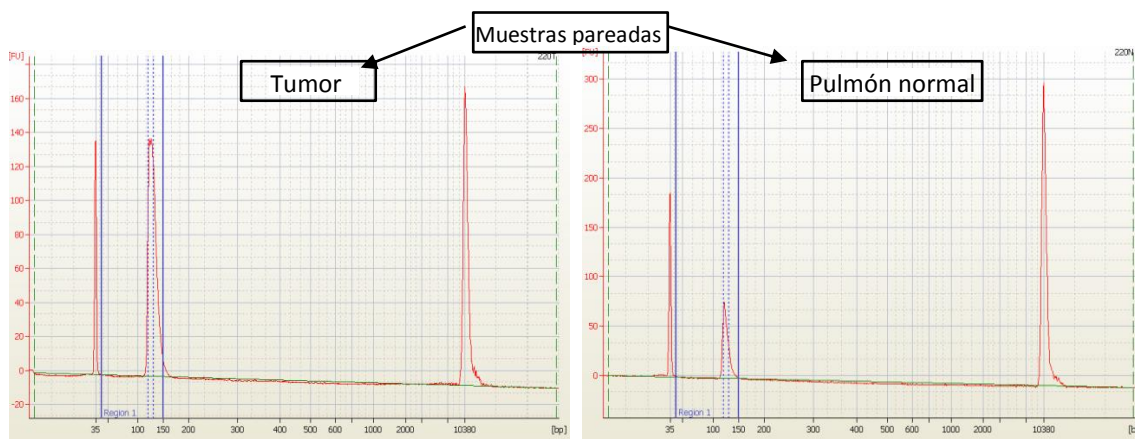
A partir de las muestras seleccionadas de 32 pacientes (tejido tumoral y sano adyacente, pareados) se construyeron las librerías de miARNs con el kit *SOLiD Total RNA-seq* partiendo de 3 μl de la fracción enriquecida de ARNs de pequeño tamaño.

Con la finalidad de realizar la secuenciación en SOLiD 4.0 del *pool* de librerías en una única lámina, cada una de las muestras fue etiquetada con una secuencia específica (código de barras o *barcode*) presente en el cebador 3' de la PCR que se realizó durante la construcción de las librerías. Este código de barras permitió asignar las secuencias obtenidas a cada una de las 64 muestras. Tras la hibridación y ligación de adaptadores, se realizó la retrotranscripción y el ADNc obtenido se sometió a una electroforesis en Novex 10% TBE-Urea para la selección de fragmentos de miARN-adaptador generados. En la Figura 26 se muestra el aspecto de los geles. De todas las muestras se obtuvieron dichos fragmentos con éxito con lo que se pudo pasar con todas las muestras al siguiente paso.



**Figura 26. Ejemplo del gel correspondiente a una electroforesis en Novex 10% TBE-Urea para seleccionar los miARNs que se han unido a los adaptadores.** Las carreras 2, 5, 8, 10 corresponden al marcador de peso molecular de 10 pb. Las carreras 1, 3, 4, 6 y 7 corresponden a cinco muestras analizadas.

Tras la PCR y la purificación, las librerías obtenidas se analizaron en un bioanalizador para el control de calidad y ver que el tamaño de los fragmentos de cada librería eran los esperados, entre 100 y 150 pb, y no se habían perdido durante el proceso de purificación. En todas ellas obtuvimos dichos fragmentos con éxito. El resultado de un par de ellas se muestra en la Figura 27.



**Figura 27. Ejemplo de los electroferogramas de control de calidad de las librerías obtenidas.** En la imagen se muestran los electroferogramas pertenecientes a un paciente con las librerías para la muestra tumoral y normal.

#### 1.4. ANÁLISIS DE LOS DATOS OBTENIDOS DE LA SECUENCIACIÓN MASIVA

Del análisis de los datos obtenidos de la secuenciación se extrajo que el número total de lecturas obtenidas en todas las muestras fue bastante similar, en la Tabla 17 mostramos el ejemplo de algunas de ellas. De esto podemos concluir que los datos fueron de muy buena calidad, además de que el multiplexado de las muestras no interfirió con el número de lecturas obtenidas. Por tanto, se puede decir que esta tecnología es adecuada para analizar el microARNoma y además permite correr 8 muestras en una misma *flow cell* minimizando el tiempo empleado y abaratando los costes de esta tecnología.

Posteriormente se realizó la anotación de las muestras. Para ello se usaron los datos de mirBase versión 20 (para *Homo sapiens*) para los miARNs y otras bases de datos extraídas de Ensembl.org y de tRNAscan-SE para otros biotipos de ARN de pequeño tamaño, calculándose el porcentaje que representaba cada uno de ellos en las diferentes muestras para después hacer la media de todas las muestras para cada biotipo. Como era de esperar, el porcentaje mayoritario (88%) correspondió a las secuencias de microARNs (Tabla 18), dato que demuestra una vez más que la secuenciación masiva y más concretamente la secuenciación masiva multiplexada es una técnica óptima para el análisis de miARNs.

**Tabla 17.** Ejemplos de número de lecturas totales obtenidas para diferentes muestras usando el sistema de código de barras (multiplex) para SOLiD.

| Muestra | Número lecturas |
|---------|-----------------|
| 145N    | 15374304        |
| 145T    | 14899881        |
| 220N    | 10582865        |
| 220T    | 12443522        |
| 230N    | 10391094        |
| 230T    | 12068691        |
| 236N    | 16487377        |
| 236T    | 17917594        |
| 237N    | 15350021        |
| 237T    | 16976857        |
| 240N    | 15754144        |
| 240T    | 17505228        |
| 242N    | 11395165        |
| 242T    | 14017997        |
| 243N    | 14111888        |
| 243T    | 17712104        |
| 244N    | 15041485        |
| 244T    | 16340267        |
| 245N    | 14564192        |
| 245T    | 14288391        |

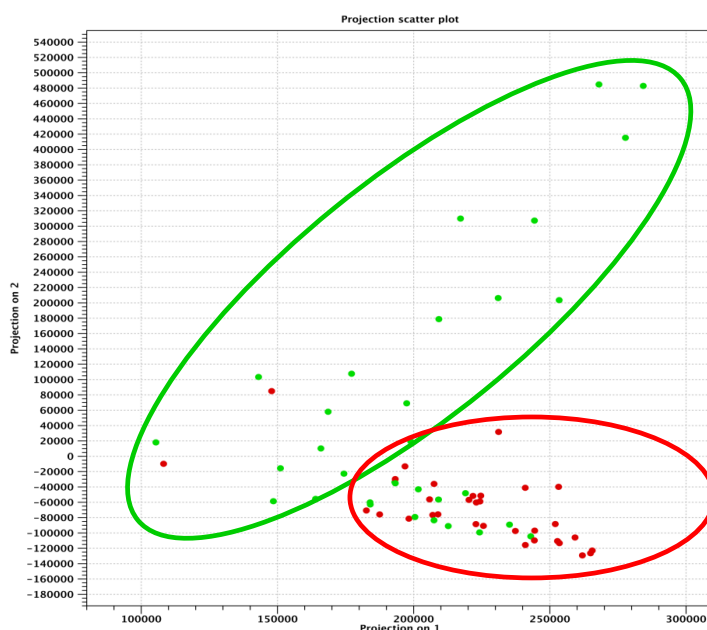
Además cuando se analizó la anotación de los miARNs, se detectaron un total de 940 miARNs maduros que mostraban expresión en al menos una de las muestras analizadas. El análisis de expresión diferencial se realizó para este universo de 940 miARNs.

**Tabla 18.** Biotipos representados en las muestras analizadas.

| Biotipo de ARN | %     |
|----------------|-------|
| miARN          | 88,62 |
| ARNt           | 6,64  |
| misc_ARN       | 1,43  |
| snoARN         | 1,03  |
| lincARN        | 0,93  |
| ARNr           | 0,42  |
| Mt_rARN        | 0,38  |
| Mt_tARN        | 0,32  |
| snARN          | 0,23  |

MiARN, microARN; ARNt, ARN de transferencia; misc\_ARN, otros ARNs; snoARN, ARN nucleolar de pequeño tamaño; lincRNA, ARN intergénico no codificante; ARNr, ARN ribosómico; Mt\_rARN, ARN ribosómico localizado en el genoma mitocondrial; Mt\_tARN, ARN de transferencia localizado en el genoma mitocondrial; snARN, ARN nuclear de pequeño tamaño.

Los análisis no supervisados (análisis de componentes principales, PCA) mostraron que las muestras tumorales y normales se agrupaban de manera diferencial (Figura 28), lo que daba a entender que existían diferencias en los niveles de expresión de los miARNs entre las muestras tumorales y las normales, ya que este análisis agrupa las muestras teniendo en cuenta el perfil de expresión de miARNs de cada una de ellas.



**Figura 28. Análisis de componentes principales (PCA).** En verde se señalan las muestra tumorales y en rojo las muestras de tejido pulmonar normal de los pacientes analizados.

### 1.5. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MIARNs ENTRE MUESTRAS TUMORALES Y NORMALES

El análisis de secuenciación masiva se llevó a cabo con la finalidad de detectar aquellos miARNs expresados diferencialmente en las 32 muestras tumorales y normales pareadas de pacientes con CPNM. Como hemos nombrado ya anteriormente esta tecnología es adecuada para analizar el microARNoma (Liu et al., 2012). Los análisis supervisados mostraron que 39 miARNs estaban diferencialmente expresados cuando comparamos los niveles de expresión normalizados de los tejidos tumorales frente a los normales de cada paciente. De estos 39 miARNs, encontramos 28 miARNs con mayores niveles de expresión en tumor comparado con tejido normal (*up-regulados*) (Tabla 19) y 11 miARNs que significativamente presentaban menos número de copias en tumor comparado con tejido sano (Tabla 20). Los análisis supervisados de *clusters* jerárquicos mostraron claramente dos grupos de muestras (tumorales vs

normales) diferenciados según el perfil de expresión de estos 39 miARNs diferencialmente expresados (Figura 29).

**Tabla 19. MiARNs sobreexpresados en tejido tumoral respecto al tejido normal.**

| miARNs <i>up</i> -regulados en tumor |       |         |       |
|--------------------------------------|-------|---------|-------|
| Nombre                               | stat  | p-valor | p-adj |
| miR-96                               | 4,75  | 0       | 0     |
| miR-182                              | 3,921 | 0       | 0,009 |
| miR-200b                             | 3,882 | 0       | 0,010 |
| miR-132                              | 3,83  | 0       | 0,011 |
| miR-629                              | 3,671 | 0       | 0,019 |
| miR-29a                              | 3,624 | 0       | 0,02  |
| miR-19b-1                            | 3,615 | 0       | 0,02  |
| miR-34a                              | 3,499 | 0       | 0,026 |
| miR-616                              | 3,465 | 0,001   | 0,026 |
| miR-339                              | 3,394 | 0,001   | 0,029 |
| miR-4536                             | 3,389 | 0,001   | 0,029 |
| miR-590                              | 3,376 | 0,001   | 0,029 |
| miR-200c                             | 3,375 | 0,001   | 0,029 |
| miR-31                               | 3,366 | 0,001   | 0,029 |
| miR-3194                             | 3,36  | 0,001   | 0,029 |
| miR-188                              | 3,34  | 0,001   | 0,03  |
| miR-21                               | 3,301 | 0,001   | 0,034 |
| miR-450a                             | 3,243 | 0,001   | 0,039 |
| miR-579                              | 3,235 | 0,001   | 0,039 |
| miR-135b                             | 3,206 | 0,001   | 0,042 |
| miR-199b                             | 3,18  | 0,001   | 0,043 |
| miR-25                               | 3,164 | 0,002   | 0,043 |
| miR-224                              | 3,16  | 0,002   | 0,043 |
| miR-141                              | 3,158 | 0,002   | 0,043 |
| miR-22                               | 3,153 | 0,002   | 0,043 |
| miR-4791                             | 3,115 | 0,002   | 0,046 |
| miR-2116                             | 3,108 | 0,002   | 0,046 |
| miR-196b                             | 3,055 | 0,002   | 0,050 |

Stat, estadístico; p-adj, p-ajustada por FDR (del inglés *false discovery rate*)

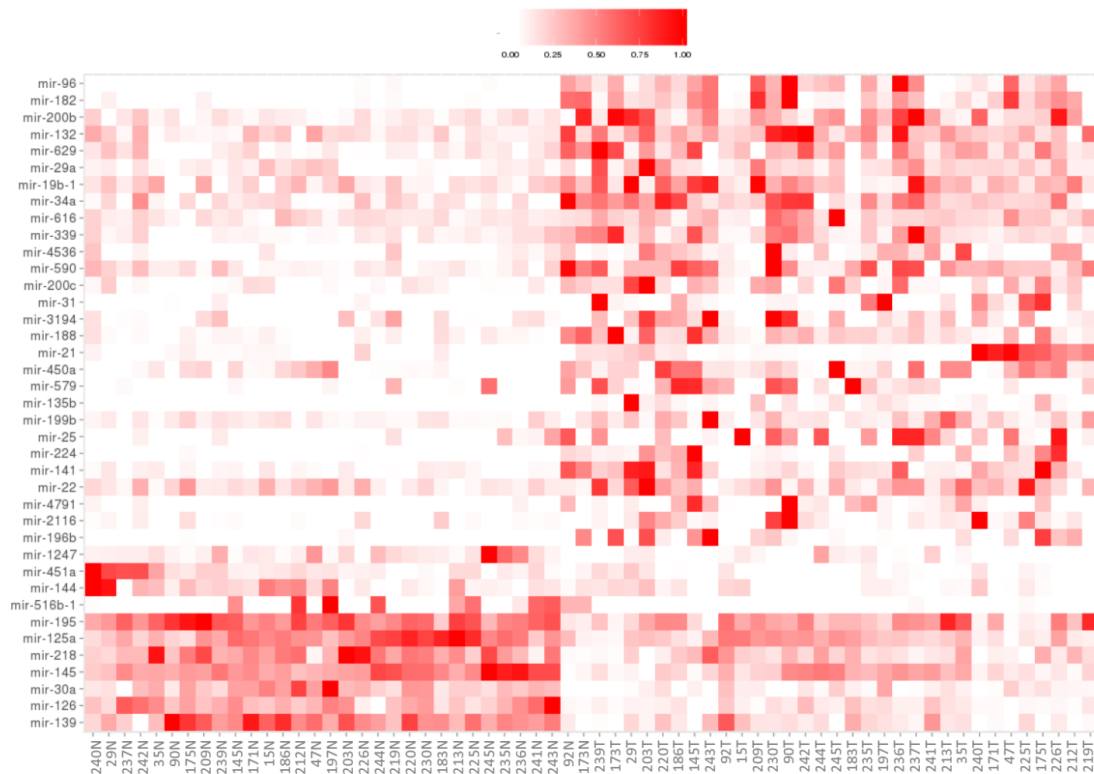
Tabla 20. MiARNs infraexpresados en tejido tumoral respecto al tejido normal.

| miARNs <i>down</i> -regulados en tumor |        |         |       |
|--|--------|---------|-------|
| name                                   | stat   | p-value | p-adj |
| miR-1247                               | -3,144 | 0,002   | 0,043 |
| miR-451a                               | -3,466 | 0,001   | 0,026 |
| miR-144                                | -3,494 | 0       | 0,026 |
| miR-516b-1                             | -3,535 | 0       | 0,025 |
| miR-195                                | -3,927 | 0       | 0,009 |
| miR-125a                               | -4,392 | 0       | 0,002 |
| miR-218                                | -4,467 | 0       | 0,001 |
| miR-145                                | -4,778 | 0       | 0     |
| miR-30a                                | -5,141 | 0       | 0     |
| miR-126                                | -5,795 | 0       | 0     |
| miR-139                                | -6,477 | 0       | 0     |

Stat, estadístico; p-adj, p-ajustada por FDR (del inglés *false discovery rate*).

Algunos estudios similares se han realizado usando diferentes plataformas de *microarrays* (Cho et al., 2009; Volinia et al., 2006; Vosa et al., 2011; Yanaihara et al., 2006), pero nuestro estudio es el primero en el que se analiza la desregulación de miARNs en muestras frescas congeladas tumorales y normales adyacentes de pacientes con CPNM mediante la tecnología SOLiD. Un estudio similar en otro tipo tumoral se llevó a cabo con esta misma tecnología obteniendo resultados satisfactorios (Liang et al., 2014). La diferencia fundamental con otras aproximaciones utilizadas en estudios previos al presente radica en que la secuenciación masiva permite analizar todo el microARNoma de cada muestra, mientras que las plataformas de *microarrays* solo analizan un cierto número de miARNs, dependiendo de la compañía que lo comercialice (Usó et al., 2014).

De acuerdo con nuestros resultados, dos meta-análisis encontraron desregulados 16 de los 39 miARNs desregulados en este estudio (miR-21, miR-182, miR-31, miR-200b, 135b, miR-96, miR-200c, miR-30a, miR-451a, miR-126-5p, miR-145, miR-139-5p, miR-125a, miR-144, miR-218 and miR-195) (Guan *et al.*, 2012; Vosa *et al.*, 2013). Pero a su vez existen dos miARN el miR-155 y el miR-210 que están ampliamente descritos en la literatura por estar desregulados en CPNM y que, sin embargo, en nuestro estudio no mostraron diferencias significativas entre tumor y tejido normal, lo que podría deberse, en parte a las diferencias en las características de la población analizada y a las metodologías usadas en los estudios.



**Figura 29.** Análisis de *clustering* jerárquico supervisado de los miARNs diferencialmente expresados. Los niveles de expresión de miARNs están codificados por intensidad de color. □ representa baja expresión de miARN y ■ representa alta expresión del miARN.

En el siguiente apartado de esta tesis doctoral se discutirán en profundidad los análisis de validación efectuados mediante una técnica diferente como es la RTqPCR.

El miR-96 y el *cluster* miR-200-miR-200c-miR-141 fueron algunos de los miARNs que se encontraron significativamente *up*-regulados en nuestro grupo de prueba. En los últimos años se han publicado dos estudios y un meta-análisis en CPNM que apuntan en la misma dirección que nuestros datos en relación con miR-96 (Wu et al., 2016; J. Li, Li, Chen, et al., 2015; Q.-H. Zhang et al., 2013) y lo mismo se puede decir del *cluster* miR-200-miR-200c-miR-141 (Cinegaglia et al., 2016; Nadal et al., 2015; Tejero et al., 2014).

La sobreexpresión del miR-132 no ha sido descrita en la literatura en pacientes con estadios tempranos de CPNM, sin embargo la sobreexpresión de miR-132 se describió en glioma y en cáncer gástrico cuando el tejido tumoral se comparó con el tejido normal adyacente, siendo también un factor pronóstico independiente para SG en ambos casos (Qiang Liu, Liao, et al., 2014; Xiaowen Liu, Yu, et al., 2014).



El papel del miR-629 en la carcinogénesis del CPNM parece menos claro. Existen dos estudios en carcinoma renal de células claras y en cáncer gástrico que comunican resultados similares a los obtenidos en el presente estudio (Shin et al., 2015; Jingushi et al., 2015). Tal vez este miARN no haya sido muy estudiado por estar poco representado en tejido pulmonar tal y como nos indican los análisis de secuenciación.

El miR-616 es otro miARN interesante, encontrándose niveles aumentados en suero de pacientes con ADC de pulmón, lo que puede tener relación con nuestros resultados, (Rani et al., 2013).

Los miARNs: miR-4536, miR-3194, miR-4791 hasta la fecha no han sido descritos en la literatura en relación con cáncer. Igual que en el caso anterior, aunque encontramos diferencias significativas entre tumor y tejido normal, se trata de miARNs poco representados en las muestras analizadas (bajo número de lecturas), por lo que en estudios realizados con otras metodologías son difíciles de detectar y encontrar diferencias debido a que requerirían de técnicas altamente sensibles para su determinación.

Los miARNs miR-450a, miR-579 y miR-2116 estaban sobreexpresados en nuestro estudio y han sido relacionados con otros tipos de cáncer como el de recto o el carcinoma hepatocelular (Svoboda et al., 2012; Azizian et al., 2016; Katayama et al., 2012). Para estos tres miARNs se desconoce su relevancia clínica en cáncer y especialmente en CPNM.

En relación al miR-25 varios estudios realizados tanto en tejido como en sangre de pacientes con CPNM, describen resultados en el mismo sentido que los nuestros (Zhize Chen et al., 2016; C. Wang et al., 2015; Wu et al., 2015; Xiang et al., 2015; T. Yang et al., 2015). Además, este mismo hallazgo se ha encontrado en otros tipos de cáncer como carcinoma hepatocelular, cáncer gástrico, cáncer de pulmón microcítico, cáncer colorrectal y glioma (Feng et al., 2014; Gong et al., 2015; B.-S. Li, Zuo, et al., 2015; Xiaojun Li et al., 2014; Y. Li et al., 2009; Nishida et al., 2012; Su et al., 2014; X. Wang et al., 2014; H. Zhang et al., 2012; J. Zhang et al., 2015; R. Zhang et al., 2014; Zhao et al., 2014; X. Zhou et al., 2015; C. Zhu et al., 2014), demostrando que el miR-25 es un miARN comúnmente desregulado en cáncer.

El miR-22 es otro miARN que se encuentra con mayor expresión en tejido tumoral en CPNM en el presente estudio, y que coincide con resultados previos publicados en cáncer de pulmón y de próstata (C. Xu et al., 2015; Budd et al., 2015). Por el contrario Ling y col, encuentran que los niveles de miR-22 en tejido de cáncer pulmón son más bajos que en el tejido pulmonar normal (Ling et al., 2012). En este sentido, encontramos diferentes estudios en otros tumores que describen el mismo hallazgo (Fan et al., 2016; Guangji Wang et al., 2015; Zhou et al., 2013). Debido a esta contradicción en los diferentes estudios se necesitan más estudios para entender el rol en cáncer de miR-22.

Respecto a los miARNs infraexpresados (no validados), se ha descrito la infraexpresión de miR-1247 y miR-516b-1 en estudios en tejido de ADC de pulmón y CPNM respectivamente (Cinegaglia et al., 2016; L. Hu et al., 2016). Además, estudios en osteosarcoma, cáncer de tiroides, de páncreas y melanoma obtienen también resultados en la misma línea (F. Zhao et al., 2015; Mancikova et al., 2015; S. Shi et al., 2014; Hanniford et al., 2015).

#### 1.6. ANÁLISIS FUNCIONALES - COHORTE DE PRUEBA

Para el enriquecimiento de genes en los análisis funcionales se usó un algoritmo que como ya hemos explicado en el apartado de materiales y métodos, no solo tiene en cuenta el p-valor del miARN expresado, sino también el signo del estadístico de contraste que aparte de señalar el sentido de la desregulación indica el peso de la misma. Además como ya sabemos que un miARN regula a más de un gen, dicho algoritmo también tiene en cuenta este hecho haciendo una especie de efecto sumatorio del miARN sobre sus genes diana.

En la Tabla 21 mostramos los resultados en términos de GO obtenidos mediante el enriquecimiento de genes usando este nuevo algoritmo. Como podemos ver hay tres términos específicos del sistema respiratorio, con lo que podemos extraer que estos miARNs serían tejido específicos.

Además también se muestran enriquecidos términos relacionados con la respuesta a estímulos de factores de crecimiento, tan necesarios para los procesos de proliferación y crecimiento tumoral. Esto nos indica que estos miARNs tendrían como dianas genes involucrados en esos procesos celulares y que la expresión anormal en ellos podría llevar a procesos de carcinogénesis.

**Tabla 21. Términos de GO desregulados por los miARNs expresados diferencialmente.**

|            | N   | lor      | pval     | padj     | pat | GO  |
|------------|-----|----------|----------|----------|-----|---|
| GO:0007517 | 306 | 0,258453 | 9,59E-06 | 0,031571 | 1   | muscle organ development                            |
| GO:0060541 | 151 | 0,34596  | 2,75E-05 | 0,031571 | 1   | respiratory system development                      |
| GO:0070848 | 498 | 0,191793 | 3,24E-05 | 0,031571 | 1   | response to growth factor stimulus                  |
| GO:0071363 | 489 | 0,1885   | 5,12E-05 | 0,031571 | 1   | cellular response to growth factor stimulus         |
| GO:0030324 | 131 | 0,358327 | 5,18E-05 | 0,031571 | 1   | lung development                                    |
| GO:0008543 | 150 | 0,336667 | 5,42E-05 | 0,031571 | 1   | fibroblast growth factor receptor signaling pathway |
| GO:0061061 | 406 | 0,204676 | 5,69E-05 | 0,031571 | 1   | muscle structure development                        |
| GO:0030323 | 134 | 0,348344 | 6,87E-05 | 0,033321 | 1   | respiratory tube development                        |
| GO:0050767 | 336 | 0,215493 | 0,000109 | 0,040653 | 1   | regulation of neurogenesis                          |
| GO:0048015 | 148 | 0,320334 | 0,000126 | 0,040653 | 1   | phosphatidylinositol-mediated signaling             |
| GO:0048017 | 148 | 0,320334 | 0,000126 | 0,040653 | 1   | inositol lipid-mediated signaling                   |
| GO:0044087 | 296 | 0,226529 | 0,000128 | 0,040653 | 1   | regulation of cellular component biogenesis         |
| GO:1901698 | 468 | 0,180575 | 0,000137 | 0,040653 | 1   | response to nitrogen compound                       |
| GO:0010243 | 441 | 0,184938 | 0,000147 | 0,040653 | 1   | response to organonitrogen compound                 |
| GO:0035295 | 381 | 0,197236 | 0,000164 | 0,042486 | 1   | tube development                                    |
| GO:0030510 | 56  | 0,502461 | 0,000201 | 0,045892 | 1   | regulation of BMP signaling pathway                 |
| GO:0033238 | 42  | -0,55751 | 0,000193 | 0,045892 | -1  | regulation of cellular amine metabolic process      |

N, número de genes; lor, *Log Odds Ratio*; pval, p-valor; padj, p-valor ajustado por el método del test múltiple; pat, vía (del inglés *pathway*); GO, término del *Gen Ontology* (procesos biológicos).

## 2. ANÁLISIS DE VALIDACIÓN

Este estudio se llevó a cabo para validar algunos de los miARNs desregulados encontrados en el grupo de prueba. Para ello se usó una cohorte independiente de pacientes con CPNM con muestras frescas congeladas de tumores resecados. Se analizaron nuevamente muestras pareadas tumor/normal en las cuales se determinaron los niveles de expresión de un grupo de miARNs mediante RTqPCR.

## 2.1. CARACTERÍSTICAS DE LOS PACIENTES

Este estudio incluyó muestras de 178 pacientes con CPNM estadios I-III A, que fueron sometidos a resección quirúrgica en el Consorcio Hospital General de Valencia. Las características de la cohorte se muestran en la Tabla 22. La mediana de edad de los pacientes fue de 65 años [rango: 26-85], el 85,5% fueron hombres, el 47,2% fueron SCC y un 86,5% de los pacientes fueron diagnosticados en estadio I de la enfermedad.

**Tabla 22. Características clinicopatológicas de los pacientes del grupo de validación.**

| Características                            | N                 | %    |
|--|-------------------|------|
| <b>Edad a la cirugía (mediana, rango):</b> | <b>65 [26-85]</b> |      |
| <b>Género</b>                              |                   |      |
| Hombre                                     | 154               | 85,5 |
| Mujer                                      | 24                | 13,5 |
| <b>Estadio<sup>a</sup></b>                 |                   |      |
| I  | 105               | 86,5 |
| II   | 35                | 19,7 |
| III A                                      | 38                | 21,3 |
| <b>Histología</b>                          |                   |      |
| SCC  | 84                | 47,2 |
| ADC  | 74                | 41,6 |
| Otros                                      | 20                | 11,2 |
| <b>Estado funcional (PS)</b>               |                   |      |
| 0  | 118               | 66,3 |
| 1-2  | 60                | 33,7 |
| <b>Grado de diferenciación</b>             |                   |      |
| Pobre                                      | 43                | 24,2 |
| Moderado                                   | 77                | 43,3 |
| Bueno                                      | 31                | 17,4 |
| NE   | 27                | 15,2 |
| <b>Tabaquismo</b>                          |                   |      |
| Fumador                                    | 86                | 48,3 |
| Exfumador                                  | 72                | 40,4 |
| No fumador                                 | 20                | 11,2 |

ADC, adenocarcinoma; SCC, carcinoma de célula escamosa; NE, No Especificado.

<sup>a</sup> De acuerdo a *the American Joint Committee on Cancer Staging Manual, 6th edition*.

Antes de hacer los análisis de validación, se comprobó que las diferencias entre las dos cohortes no eran significativas y por lo tanto los resultados podían ser comparables. En la tabla 23 se puede ver que para ninguna de las variables estudiadas existieron diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), y por lo tanto los dos grupos de pacientes (prueba y validación) eran lo suficientemente homogéneos como para realizar al análisis de validación.

**Tabla 23. Resultado de los análisis estadísticos utilizados para definir si había diferencias significativas entre el grupo prueba y el de validación.**

| Características                     | p     |
|-------------------------------------|-------|
| Edad a la cirugía (mediana, rango): | 0,630 |
| Género                              | 0,433 |
| Estadio                             | 0,695 |
| Histología                          | 0,055 |
| Estado funcional                    | 0,786 |
| Grado de diferenciación             | 0,640 |
| Hábito tabáquico                    | 0,062 |
| Recaída                             | 0,435 |
| Muerte                              | 0,827 |

### 2.1.1. Análisis del estado mutacional de *EGFR* y *KRAS*

El análisis mutacional de *KRAS* se realizó en 173 muestras de ADN tumoral, de las cuales 151 (87,3%) fueron nativas y 22 (12,7%) presentaban alguna mutación. La mayoría de los pacientes que presentaban mutaciones fueron hombres (77,3%) y tenían histología de ADC (77,3%; Tabla 24). Estos porcentajes son similares a otras cohortes, los cuales también han descrito que los porcentajes de mutaciones en el gen *KRAS* fueron más altos en hombres y en pacientes con ADC (Schmid et al., 2009; Tam et al., 2006). Además, la mutación más frecuente fue GLY12ASP, que estuvo presente en el 36,4% de los casos (Tabla 25).

El análisis mutacional del gen *EGFR* se realizó en 64 pacientes; 54 (84,4%) fueron nativos y 10 (15,6%) presentaron alguna mutación. La mayoría de los pacientes con estas mutaciones eran mujeres (70%), con una histología de ADC (90%), que nunca habían fumado (60%; Tabla 24), resultados que concuerdan con datos de estudios multicéntricos de población caucásica (Rosell et al., 2009; Molina et al., 2008). En nuestra cohorte, la mutación L858R en el exón 21 fue la que se encontró con mayor frecuencia (60%) (Tabla 25).

**Tabla 24.** Frecuencia de mutaciones en los genes *EGFR* y *KRAS* según las características de los pacientes.

| Características         | EGFR                    |                      | KRAS                    |                      |
|-------------------------|-------------------------|----------------------|-------------------------|----------------------|
|                         | Pacientes<br>analizados | Pacientes<br>mutados | Pacientes<br>analizados | Pacientes<br>mutados |
|                         | N (%)                   | N (%)                | N (%)                   | N (%)                |
| <b>Total</b>            | 64                      | 10                   | 173                     | 22                   |
| <b>Género</b>           |                         |                      |                         |                      |
| Hombre                  | 49 (76,6)               | 3 (30)               | 149 (86,1)              | 17 (77,3)            |
| Mujer                   | 15 (23,4)               | 7 (70)               | 24 (13,2)               | 5 (22,7)             |
| <b>Estadio</b>          |                         |                      |                         |                      |
| I                       | 36 (56,3)               | 7 (70)               | 101 (58,4)              | 16 (72,7)            |
| II                      | 17 (26,6)               | 1 (10)               | 35 (20,2)               | 5 (22,7)             |
| IIIA                    | 11 (17,2)               | 2 (20)               | 37 (21,4)               | 1 (4,5)              |
| <b>Histología</b>       |                         |                      |                         |                      |
| SCC                     | 9 (14,1)                | 1 (10)               | 80 (46,2)               | 3 (13,6)             |
| ADC                     | 44 (68,6)               | 9 (90)               | 73 (42,2)               | 17 (77,3)            |
| Otros                   | 11 (17,1)               | -                    | 20 (11,6)               | 2 (9,1)              |
| <b>Edad (años)</b>      |                         |                      |                         |                      |
| ≤ 65                    | 37 (57,8)               | 5 (50)               | 93 (53,8)               | 11 (50)              |
| ≥ 65                    | 27 (42,2)               | 5 (50)               | 80 (46,2)               | 11 (50)              |
| <b>Hábito tabáquico</b> |                         |                      |                         |                      |
| Fumador                 | 29 (45,3)               | 2 (20)               | 85 (49,1)               | 8 (36,4)             |
| Exfumador               | 21 (32,8)               | 2 (20)               | 68 (39,3)               | 7 (31,8)             |
| No fumador              | 14 (21,9)               | 6 (60)               | 20 (11,5)               | 7 (31,8)             |

**Tabla 25.** Frecuencia de las diferentes mutaciones detectadas para los genes *EGFR* y *KRAS*.

| Tipo de mutación | N | %    |
|------------------|---|------|
| <b>EGFR</b>      |   |      |
| Del. 19          | 1 | 10   |
| Exon 20          | 3 | 30   |
| Exon 21          | 6 | 60   |
| <b>KRAS</b>      |   |      |
| 12ASP            | 8 | 36,4 |
| 12CYS            | 6 | 27,3 |
| 12VAL            | 7 | 31,8 |
| 12SER            | 1 | 4,5  |

## 2.2. ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE MIARNs

De los 39 miARNs desregulados descritos en el grupo prueba, siete presentaron una media de menos de 30 lecturas (miR-4536-1, -3194, -579, -25, -4791, -2116, and -516b-1), por lo que fueron excluidos del análisis de validación.

De los 32 restantes, 22 fueron seleccionados para su validación (según el número de lecturas obtenidas en el análisis de secuenciación, explicado en el apartado de materiales y métodos) en una cohorte independiente de pacientes (N=178).

### 2.2.1. Cuantificación y evaluación de la calidad

Para la determinación de la expresión relativa de los miARNs se analizaron muestras de tejido pulmonar tumoral y normal adyacente de 178 pacientes. El ARN se aisló de alícuotas de tejido (aproximadamente de 10-20 mg). De todas las muestras se obtuvo una cantidad óptima de ARN, siendo la mediana para el tejido tumoral de 1340 ng/ $\mu$ l [92-5779 ng/ $\mu$ l] y 385 ng/ $\mu$ l [77-3642 ng/ $\mu$ l] para el tejido normal adyacente.

Además, la calidad y la integridad del ARN se evaluaron previamente por electroforesis capilar con el objetivo de detectar la presencia o ausencia de productos de degradación del ARN. Como ya hemos explicado anteriormente, dependiendo del perfil obtenido en el electroferograma, el bioanalizador utiliza un algoritmo que denomina RIN que provee información sobre la integridad del ARN de cada muestra. Todas las muestras obtenidas presentaban una adecuada calidad e integridad porque su RIN fue superior a 7, los picos de 18S y 28S estaban claramente definidos, y había bajo ruido de peso molecular.

### 2.2.2. Análisis de validación de la expresión de miARNs

Para analizar si los resultados obtenidos mediante secuenciación podían ser confirmados utilizando otra metodología, 22 de los 39 miARNs desregulados fueron sometidos a un análisis de expresión mediante RTqPCR. La expresión relativa en este caso se calculó usando el miR-16 como gen de referencia endógeno (Huang, 2016; Rinnerthaler et al., 2016) mediante el método del Cq comparativo ( $2^{-(Cq \text{ muestra} - Cq \text{ control})}$ ) (Bediaga et al., 2013). Los 22 miARNs validados fueron los siguientes: miR-182, -19b-1, -29a, -34a, -339, -31, -590, -188, -21, -199b, -224, -135b, -196b, -451a, -144, -195, -125a, -218, -145, -30a, -126 y -139, de los cuales 13 estaban sobreexpresados y 9 infraexpresados en tumor.

Previamente, la expresión del miR-16 se había testado en los dos tipos de muestras, normales y tumorales para verificar que su expresión era estable y se podía utilizar como miARN de referencia endógeno. La media y la mediana de expresión en ambos grupos (18,55 y 18,46 para normales y 19,42 y 19,27 para tumorales, respectivamente) indicaron que no había diferencias significativas en cuanto a la expresión de miR-16 entre los dos grupos muestrales.

La técnica de RTqPCR fue usada en nuestro análisis de validación porque es

considerada como el método *gold standard* para los análisis de expresión tanto génica como de miARNs y es una técnica fácil y muy extendida entre los laboratorios de biología molecular para detectar miARNs diferencialmente expresados en muestras tumorales (Buitrago et al., 2015; Jun Wang et al., 2015; Pak et al., 2015; Yang et al., 2016; Razzak et al., 2016). Las principales ventajas son su rapidez, sensibilidad y la baja cantidad de ARN que se requiere (Benes and Castoldi, 2010). Sin embargo, la RTqPCR presenta dificultades importantes en cuanto a la evaluación de miARNs se refiere, el uso de ARNs endógenos como controles para normalizar y referenciar las muestras, porque ninguno de los genes endógenos descritos ha sido ampliamente aceptado como un control estándar para RTqPCR. En nuestro estudio hemos usado el miR-16 porque los resultados experimentales demostraron que no había variaciones significativas entre muestra tumorales y normales, además el miR-16 también ha sido utilizado para normalizar niveles de expresión de miARNs en otros estudios realizados con muestras de CPNM (Huang, 2016).

Para la validación se comparó la expresión relativa de cada muestra para tumor frente a su pareja normal con el test de Wilcoxon para muestras pareadas. Los resultados del análisis confirmaron que había diferencias estadísticamente significativas en la expresión de muestras tumorales frente a las normales para todos los miARNs analizados a excepción del miR-125a (Tabla 26A-B). El miR-125a es uno de los muchos miARNs que permanecen aún sin ser totalmente caracterizados en cáncer. Usando análisis de *microarray*, Yanaihara y col encontraron que el miR-125a, específicamente el hsa-miR-125a-5p, se localiza en 19q13.41 y está infraexpresado en CPNM (Yanaihara et al., 2006). Además, se ha descrito que miR-125a está regulado por la activación de la vía EGFR y que intervine en procesos de invasión y metástasis (Wang et al., 2009). Esta sobreexpresión también ha sido descrita en otros cánceres como mama y ovario (X. Guo et al., 2009; W. Li et al., 2009; O'Day and Lal, 2010; Nam et al., 2008). La posible discrepancia entre las dos metodologías para evaluar la expresión de miARNs poco abundantes se ha descrito en estudios previos de miARNs utilizando *microarrays*, RTqPCR y ultra secuenciación (Markou et al., 2013; Jun Wang et al., 2015; Huang, 2016; Ma et al., 2014). Una de las razones para explicar estos resultados podría ser que la RTqPCR en algunos casos es un poco menos sensible que



la secuenciación masiva, y por esto no sería capaz de detectar diferencias entre los niveles de expresión de algunos miARNs entre tejido tumoral y normal cuando estas no son muy acusadas.

**Tabla 26. Resultados del test de Wilcoxon para los miARNs analizados por RTqPCR.** NGS, del inglés Secuenciación de Nueva Generación; p-adj, p-valor ajustado; stat, estadístico de contraste.

| A) MicroRNAs <i>up</i> -regulados   |        |         |                    |         |
|-------------------------------------|--------|---------|--------------------|---------|
| Name                                | NGS    |         |                    | RTqPCR  |
|                                     | stat   | p-valor | p-adj <sup>§</sup> | p-valor |
| miR-182                             | 3,921  | 0       | 0,009              | <0,001  |
| miR-29a                             | 3,624  | 0       | 0,020              | <0,001  |
| miR-19b-1                           | 3,615  | 0       | 0,020              | <0,001  |
| miR-34a                             | 3,499  | 0       | 0,026              | <0,001  |
| miR-339                             | 3,394  | 0,001   | 0,029              | <0,001  |
| miR-590                             | 3,376  | 0,001   | 0,029              | <0,001  |
| miR-31                              | 3,366  | 0,001   | 0,029              | <0,001  |
| miR-188                             | 3,340  | 0,001   | 0,030              | <0,001  |
| miR-21                              | 3,301  | 0,001   | 0,034              | <0,001  |
| miR-135b                            | 3,206  | 0,001   | 0,042              | <0,001  |
| miR-199b                            | 3,180  | 0,001   | 0,043              | <0,001  |
| miR-224                             | 3,160  | 0,002   | 0,043              | <0,001  |
| miR-196b                            | 3,055  | 0,002   | 0,050              | <0,001  |
| B) MicroARNs <i>down</i> -regulados |        |         |                    |         |
| Name                                | NGS    |         |                    | RTqPCR  |
|                                     | stat   | p-valor | p-adj <sup>§</sup> | p-valor |
| miR-451a                            | -3,466 | 0,001   | 0,026              | <0,001  |
| miR-144                             | -3,494 | 0       | 0,026              | <0,001  |
| miR-195                             | -3,927 | 0       | 0,009              | 0,039   |
| miR-125a                            | -4,392 | 0       | 0,002              | 0,679   |
| miR-218                             | -4,467 | 0       | 0,001              | <0,001  |
| miR-145                             | -4,778 | 0       | 0                  | 0,001   |
| miR-30a                             | -5,141 | 0       | 0                  | <0,001  |
| miR-126                             | -5,795 | 0       | 0                  | <0,001  |
| miR-139                             | -6,477 | 0       | 0                  | <0,001  |

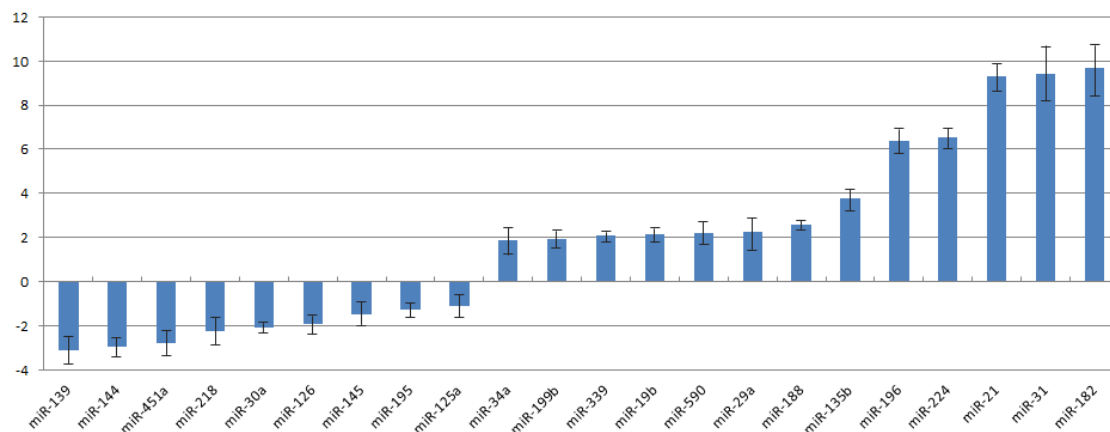
<sup>§</sup> p-adj calculado mediante FDR.

En el resto de miARNs estudiados, los resultados fueron coincidentes cuando se compararon ambas técnicas (secuenciación masiva multiplexada vs. RTqPCR), por lo que la secuenciación masiva multiplexada se afianza como una tecnología útil para analizar perfiles de expresión en muestras tumorales frescas.

Con los datos del estudio de validación, se realizó una normalización de los niveles

de expresión, para calcular la expresión relativa de los 22 miARNs en tejido tumoral *versus* su expresión en tejido pulmonar adyacente. La normalización se realizó usando la fórmula matemática de Pfaffl. En la Figura 30 se representan las medianas de expresión de cada miARN.

De acuerdo con nuestros resultados, algunos estudios en cáncer de pulmón incluyendo dos meta-análisis, encuentran resultados similares (Guan et al., 2012; Vosa et al., 2013). Por ejemplo, 13 de los 22 miARNs analizados (miR-21, miR-182, miR-31, 135b, miR-30a, miR-451a, miR-126-5p, miR-145, miR-139-5p, miR-125a, miR-144, miR-218, y miR-195) habían sido también identificados en uno o ambos de los meta-análisis mencionados utilizando metodologías diferentes a la utilizada en este estudio. Aún así, existe un grupo de miARNs que hemos descrito como diferencialmente expresados en nuestro estudio de secuenciación y confirmados por RTqPCR que no habían sido previamente relacionados con CPNM.



**Figura 30. Niveles de expresión relativa de los 22 miARNs analizados.** En esta gráfica se representan las medianas con su correspondiente error. Los miARNs infraexpresados se sometieron a la transformación de  $-1/(\text{inversa de la mediana})$  para poder representar mejor los datos.

Los miARNs sobreexpresados validados miR-182, miR-31, miR-21, miR-135b, miR-199b, miR-224, miR-196b y miR-34a ya habían sido previamente descritos en la literatura. El miR-182 fue uno de los miARNs más significativamente sobreexpresados en el grupo de prueba. Estudios extensos de perfiles han relacionado los niveles desregulados del *cluster* miR-182-miR-183-miR-96 con muchos tipos de cáncer, incluyendo, cáncer colorrectal, de pulmón, vejiga, ovario, próstata, carcinoma

endometrial, hepatocelular y glioma (Wallis et al., 2015; Casanova-Salas et al., 2014; Stenvold et al., 2014; S. Wang et al., 2014; Lee et al., 2013; Q.-H. Zhang et al., 2013). Además, el miR-182 puede funcionar como un oncomiR aumentando la proliferación celular, supervivencia, tumorigénesis y resistencia a fármacos. Algunos genes diana del miR-182 están involucrados en la reparación del ADN (Krishnan et al., 2013) y otros son genes supresores de tumores tales como *PTEN* y *TP53* (datos de miRTarBase).

Un miARN interesante con una posible función dual es el miR-31. Por un lado, ha sido descrito como un anti-oncomiR, y su expresión se ha visto disminuida en algunos tipos tumorales como mama, ovario, próstata, vejiga, carcinoma hepatocelular, gástrico y melanoma (Creighton et al., 2010; Greenberg et al., 2011; J. Guo et al., 2009; Kim et al., 2015; Laurila and Kallioniemi, 2013; Schaefer et al., 2010; Wszolek et al., 2011; Yan et al., 2008). Por el contrario, y avalando nuestros resultados, una función proliferativa también ha sido descrita en carcinoma colorrectal, de cabeza y cuello, CMP y carcinoma esofágico de células escamosas (Laurila and Kallioniemi, 2013; T. Zhang et al., 2011; Tan et al., 2011; Slattery et al., 2015; C.-J. Liu et al., 2010). Además, recientemente se ha demostrado que miR-31 está sobreexpresado en metástasis de nódulos linfáticos de pacientes con ADC y en tumores de pulmón de ratones transgénicos para la ciclina E (X. Liu et al., 2010; Meng et al., 2013). Recientemente, se vió que este miARN estaba sobreexpresado en estadios tempranos de CPNM aumentado su expresión con la progresión del tumor, llegando a niveles muy elevados en enfermedad avanzada (Edmonds et al., 2016). Algunos de sus genes diana descritos hasta el momento son genes supresores de tumores como el gen supresor de tumor grande 2 (*LATS2*) y el gen de la isoforma  $\alpha$  de la unidad reguladora B de PP2A (*PPP2R2A*; Meng et al., 2013). Además un análisis de dianas predictivas para este miARN encontró una relación entre éste y la iniciación, progresión y la respuesta al tratamiento de cáncer de pulmón a través del ciclo celular, vía citocromo P450, vías metabólicas, apoptosis, vía de señalización de quimiocinas, y vía de señalización de MAPK (Gao et al., 2014).

El miR-21 es un miARN sobradamente descrito en cáncer. En CPNM, se ha demostrado que el miR-21 está sobreexpresado tanto en tejido tumoral como en plasma de pacientes con CPNM (Capodanno et al., 2013; Markou et al., 2013; Wang et

al., 2016; Yang et al., 2016; W. Zhao et al., 2015). Estudios en otros tipos de tumores, incluyendo cáncer de páncreas, próstata, colorrectal, mama, esófago y cervical han encontrado los mismos resultados demostrando así el valor de miR-21 como un biomarcador potencial en cáncer (Armstrong et al., 2015; Zexin Chen et al., 2016; Y. Han et al., 2015; Koppers-Lalic et al., 2016; S.-W. Wen et al., 2015; Yamada et al., 2015; W. Yu et al., 2016; G. Sun et al., 2016; Lee et al., 2007). Mecanísticamente, se ha descrito que la sobreexpresión de miR-21 lleva a la inhibición de algunos genes supresores de tumores, como *PTEN*, tropomiosina 1 (*TPM1*) y el gen de la muerte celular programada 4 (*PDCD4*) (Li and Rana, 2014).

La sobreexpresión de miR-224, al igual que en nuestra cohorte, ha sido detectada tanto en CPNM (Cui, Kim, et al., 2015; Cui, Meng, et al., 2015) como en otros tipos de cáncer como colorrectal, hepatocelular, esofágico de célula escamosa, cervical, de vejiga y glioma (Adamopoulos et al., 2015; An et al., 2015; Avgeris et al., 2015; He et al., 2015; Li and Hu, 2015; Li et al., 2016; Liao et al., 2013; Lu et al., 2013; Shen et al., 2013; Shi et al., 2015; Sohn et al., 2015; Yang et al., 2014; Yu et al., 2014; G.-J. Zhang et al., 2013; Y. Zhang et al., 2013), lo que demuestra el importante papel de este miARN en el proceso de carcinogénesis. El miR-224 funciona como un oncomiR en CPNM por inhibición directa de genes como el factor de necrosis tumoral alfa-inducido por la proteína 1 (*TNFAIP1*) y el miembro 4 de la familia SMAD (*SMAD4*). Además, promueve parcialmente la proliferación y migración de células tumorales de pulmón inhibiendo directamente al gen de la caspasa 7 (*CASP7*) y atenúa la apoptosis inducida por el factor de necrosis tumoral alfa (*TNF*) inhibiendo a la caspasa 3, sugiriendo un rol oncogénico de este miARN (Cui, Kim, et al., 2015; Cui, Meng, et al., 2015).

Respecto a la sobreexpresión del miR-196b, dos estudios en tejido de cáncer de pulmón y ADC muestran resultados en la misma línea que los descritos en el presente trabajo (Xuelian Li et al., 2014; S.-L. Yu et al., 2016). El gen *Homeobox A9* (*HOXA9*) se ha sugerido como diana del miR-196b jugando un papel central en el control del comportamiento agresivo de las células tumorales de pulmón (S.-L. Yu et al., 2016).

Sorprendentemente, el miR-34a se encontró *up*-regulado en el grupo de prueba, y posteriormente se obtuvieron los mismos resultados en el grupo de validación. El miARN se ha encontrado por estar *down*-regulado en CPNM (Ma et al., 2015; Y. Shi et

al., 2014; Gallardo et al., 2009), y en otros tipos de cáncer, ya que está descrito que es un supresor de tumores (Xiang et al., 2016; Long et al., 2017; Lin et al., 2015; Ren et al., 2015).

En el grupo de los miARNs infraexpresados encontramos a miR-451a, miR-144 y miR-195 entre los que muestran diferencias significativas entre tejido tumoral y normal. Estos tres miARNs han sido descritos tanto en diferentes modelos *in vitro* y como en muestras provenientes de pacientes por estar *down*-regulados en CPNM (Solomides et al., 2012; R. Wang et al., 2011; Gao et al., 2015; Guo et al., 2014; B. Liu et al., 2015; Yongchun et al., 2014). *AKT* y el oncogén *MYC* han sido descritos como genes diana del miR-451a, lo que ha demostrado su papel en el proceso de carcinogénesis (Minna et al., 2016), mientras que el proto-oncogén met (*MET*), amplificado a menudo en cánceres humanos, ha sido identificado como diana de miR-144 (J. Liu et al., 2015). La sobreexpresión de miR-195 puede inhibir la viabilidad, migración e invasión celular e inducir apoptosis inhibiendo directamente al receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2 (*VEGFR2*) y por consiguiente las vías de señalización PI3K/AKT y Raf/MEK/ERK (P. Sun et al., 2016).

Respaldando los resultados del miR-218 en nuestro análisis hay un estudio en pacientes con CPNM en el que encuentran que los niveles de este miARN están infraexpresados (K. Zhu et al., 2016), así como en un gran número de otros tumores sólidos (Cheng et al., 2015; G. Han et al., 2015; B.-S. Li, Liu, et al., 2015; Li et al., 2012; Liu et al., 2016; Z. Liu et al., 2015; Nishikawa et al., 2014; Sui et al., 2015; Ting Wang et al., 2015; Wei et al., 2014; M. Yang et al., 2015; Yu et al., 2013; Z. Zhu et al., 2014). Todos estos datos apuntan a que el miR-218 podría ser una buena diana terapéutica en la mayoría de tumores, ya que inhibe a genes como el de la proteína 1 que contiene dominio CUB (*CDCP1*), disminuyendo la proliferación y metástasis en CPNM ( Zeng et al., 2017).

La infraexpresión de miR-145 al igual que en nuestro estudio, ha sido descrita en algunos estudios de pacientes con CPNM, donde tal desregulación ha sido valorada en muestras tumorales frente a tejido normal adyacente (Shen et al., 2015; Ye et al., 2015; Y. Zhang et al., 2015; Markou et al., 2013; Campayo et al., 2013; Guan et al., 2012; Wang et al., 2012; Chen et al., 2010). Además, se han obtenido resultados

similares en diferentes tipos de cáncer (Ding et al., 2016; Karatas et al., 2016; Zheng et al., 2016; Avgeris et al., 2015; Bufalino et al., 2015; Xiaobo Chen et al., 2015; Xiangjian Chen et al., 2015; Li and Hu, 2015; Liang et al., 2015; Peng et al., 2015; Z. Sun et al., 2015; Guohui Wang et al., 2015; Shi et al., 2015; H. Zhou et al., 2015; Duan et al., 2014; Schaefer et al., 2010; Zaman et al., 2010). Estos hallazgos sugieren que el miR-145 podría ser una importante aproximación terapéutica para el manejo de diferentes tumores, siendo algunas de sus dianas genes tan relevantes como el *MYC*, el miembro 3 de la familia SMAD (*SMAD3*) o el receptor del factor de crecimiento transformante beta 2 (*TGFBR2*) (Chen et al., 2010; H. Hu et al., 2016; Xiang et al., 2017).

Respecto al miR-30a, avalando nuestros resultados diferentes estudios en CPNM *in vivo* e *in vitro* demostraron que los niveles de expresión de miR-30a en muestras de tejido tumoral fueron más bajos comparados con los del tejido normal y que la sobreexpresión de miR-30a en cultivos de líneas celulares de pulmón inhibía la migración y la invasión celular afectando a genes como el coactivador transcripcional EYA y fosfatasa 2 (*EYA2*) y el receptor del factor de crecimiento similar a la insulina tipo I (*IGF1R*) (Kumarswamy et al., 2012; W.-Y. Zhu et al., 2014; Tang et al., 2015; X. P. Wen et al., 2015; Zhu et al., 2015; Yuan et al., 2016). En otros tumores también se han encontrado niveles más bajos de expresión de miR-30a posicionando a este miARN como un supresor de tumores y como una diana terapéutica interesante en cáncer (Visone et al., 2007; Baraniskin et al., 2012; Sand et al., 2012; Fu et al., 2014; Katz et al., 2014; Zhaoyang Liu et al., 2014; Zhifang Liu et al., 2014; N. Zhang et al., 2014; Q. Zhang et al., 2015; F. Q. Li, Xu, Wu, et al., 2015; Chang et al., 2016).

La expresión anormal de miR-126 se ha descrito en diferentes tumores. Algunos estudios en CPNM avalan estos resultados mostrando que la expresión de miR-126 se vió reducida tanto en tejido tumoral pulmonar (comparado con su respectivo tejido normal) como en muestras sanguíneas (comparado con donantes sanos) (W. Zhu et al., 2016; S.-W. Chen et al., 2015; Jusufovic et al., 2012; Donnem et al., 2012), participando de manera especial en el control del proceso de angiogénesis. Además ensayos *in vitro* han mostrado que la sobreexpresión de miR-126 en líneas celulares de CPNM inhibe la proliferación, migración e invasión celular a través de diferentes genes diana, incluyendo el proto-oncogén CRK, proteína adaptadora (*CRK*), el EGF como dominio

múltiple 7 (*EGFL7*) y el gen de la subunidad reguladora 2 de la fostatidilinositol-3-quinasa (*PIK3R2*) (Crawford et al., 2008; Sun et al., 2010; Song et al., 2016).

En línea con nuestro hallazgo en los dos grupos, un estudio en muestras pareadas tumorales y normales de pacientes con CPNM encontró también el miR-139 infraexpresado en tumor (W. Xu et al., 2015). Resultados similares se han descrito en diferentes tipos de cáncer incluyendo, cáncer de páncreas, gástrico, carcinoma esofágico y hepatocelular (L. Li, Li, Chen, et al., 2015; Yue et al., 2015; Liu et al., 2013; J. Guo et al., 2009). Ensayos *in vitro* e *in vivo* han mostrado que miR-139 inhibe el crecimiento tumoral reprimiendo directamente a *MET*, lo que podría ser un posible mecanismo por el cual miR-139 regulara el crecimiento y el potencial metastásico (C. Sun et al., 2015).

Otros miARNs tales como, miR-135b, miR-199-5p, miR-29a, miR-19b-1, miR-339-5p, miR-590-5p, y miR-188 aunque presentan una marcada sobreexpresión en el presente estudio, han sido poco descritos en cáncer en general y en CPNM en particular. Tanto para miR-135b como para miR-199b-5p pocos estudios han descrito su papel en relación con CPNM. Recientemente, la sobreexpresión de miR-135b se ha reportado en tejido tumoral y en células con capacidad invasiva en CPNM (Lin et al., 2013; Xue et al., 2017), mientras que miR-199b-5p se ha relacionado con exposición a asbestos (Nymark et al., 2011).

Respecto al miR-29a, existe solo un estudio en pacientes con ADC de pulmón que encuentra una sobreexpresión de este miARN en un análisis con muestras pareadas tumor-normal (Cinegaglia et al., 2016). Otro estudio, encuentra resultados similares a los nuestros, pero sin especificar si se trata del 5p o el 3p (Z. Hu et al., 2016). Por tanto, existe cierta controversia y resultados dispares, por lo que es necesario ahondar en el papel biológico que juega miR-29a y sus posibles dianas en el proceso de carcinogénesis en CPNM.

Aunque el miR-19b-1, pertenece a un *cluster* de miARNs ampliamente estudiado en cáncer, miR-17-92, y la sobreexpresión de los mismos ha sido ampliamente descrita en linfoma de células B y en numerosos tumores sólidos como, pulmón, mama, colon, páncreas, próstata y estómago (Croce, 2009; Garzon et al., 2009; Mendell, 2008; Olive et al., 2010; van Haften and Agami, 2010), el papel de este miARN en particular aún

no está del todo claro. Estudios *in vivo* e *in vitro* han demostrado su participación en procesos de transición epitelio-mesénquima y metástasis (Fan et al., 2014; J. Li, Yang, Yan, et al., 2015) lo que puede explicar esa sobreexpresión encontrada en las muestras tumorales analizadas.

La sobreexpresión de miR-339-5p además de haber sido demostrada en nuestra cohorte de validación fue reportada en un estudio en sangre periférica de 100 individuos de los cuales 86 presentaban CPNM en estadios tempranos y 24 eran donantes sanos (Ulivi et al., 2013). Aunque estos resultados son consistentes con los nuestros obtenidos de tejido, existen pocos estudios sobre la relación del miR-339 y el CPNM.

En cuanto al papel de miR-590-5p, existen pocos datos publicados. Solo un estudio demostró que estaba sobreexpresado en ADC de pulmón además de acelerar la migración e invasión celular por la inhibición directa del gen de la olfactomedina 4 (*OLFM4*) (Yanhong Liu et al., 2017). Este resultado está en concordancia con los niveles encontrados en nuestro estudio. Además, en otros tumores se han reportado resultados similares, relacionándolo también con la activación de procesos tales como crecimiento celular, ciclo celular e invasión (Chu et al., 2014; Xiao et al., 2013).

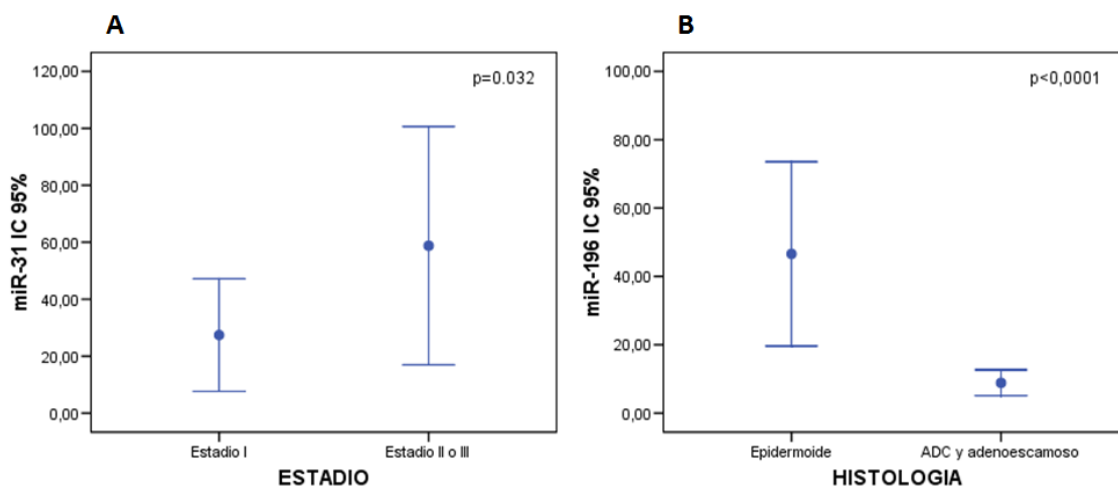
La sobreexpresión del miR-188 fue confirmada en nuestra cohorte de validación. Este miARN, está muy poco descrito en cáncer en general y específicamente no se lo había relacionado con CPNM hasta ahora. Se ha descrito en otros tipos de cáncer por tener función de supresor de tumores (Fang et al., 2015; Wang and Liu, 2016), pero hasta la fecha nada se sabe de su función en la carcinogénesis pulmonar. En leucemia mieloide aguda se ha observado un comportamiento similar al que hemos descrito en el presente estudio (Jinlong et al., 2015).

### **3. MIARNs DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN CPNM**

#### **3.1. CORRELACIÓN CON VARIABLES CLINICOPATOLÓGICAS**

Para analizar la asociación de los miARNs con las características clinicopatológicas se llevaron a cabo tests no paramétricos (U de Mann-Whitney, Kruskal Wallis, y Chi-cuadrado) debido a que muchas variables no siguen la distribución normal.



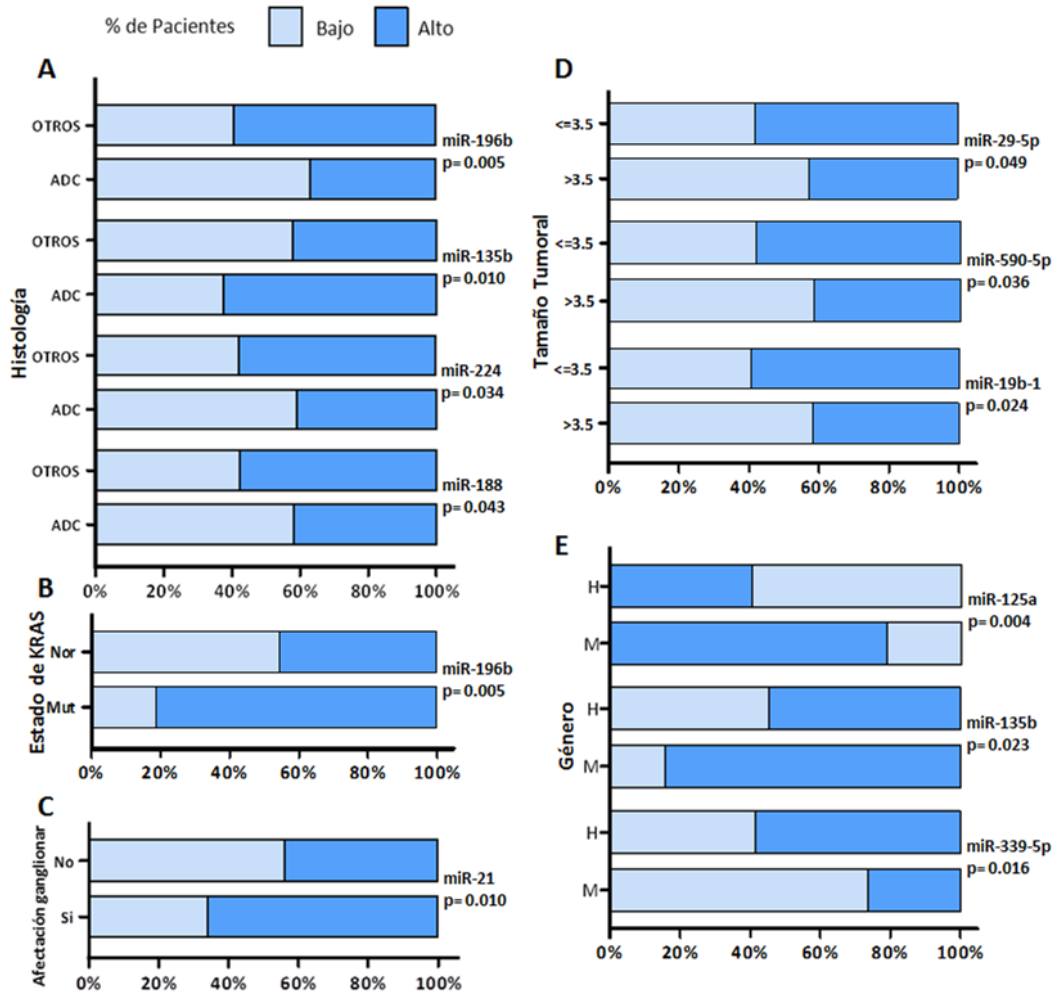


**Figura 31. Ejemplos de correlaciones entre variables clinicopatológicas y la expresión de miARNs.** A) Representación de la expresión miR-31 de acuerdo con el estadio y B) representación de la expresión de miR-196 de acuerdo con la histología.

En la Figura 31 se muestran las diferencias significativas encontradas entre algunos miARNs y variables clínicas, como el estadio tumoral para el miR-31 (Figura 31A, miR-31,  $p=0,032$ ) y la histología, donde niveles más altos de miR-196 se asociaron con histología epidermoide (Figura 31B, miR-196,  $p<0,0001$ ). Por el contrario, un estudio publicado por Hamamoto en población asiática encuentra que son los ADC los que expresan mayores niveles de miR-196 (Hamamoto et al., 2013).

En cuanto al tamaño tumoral, niveles altos de miR-182 y miR-135b se correlacionaron con tumores de menos de 3,5 cm ( $p= 0,033$  y  $p= 0,026$ , respectivamente). También se observaron asociaciones entre el tabaquismo y los miARNs: miR-126 y miR-125a, presentando niveles más bajos aquellos pacientes que nunca fumaron en ambos miARNs ( $p= 0,017$  y  $p= 0,014$ , respectivamente). Además niveles elevados de miR-125a se encontraron en el subgrupo de muestras que no presentaban mutaciones en *EGFR* ( $p= 0,039$ ). A continuación, los niveles de expresión de los miARNs se dicotomizaron de acuerdo a las medianas de expresión relativa de cada miARN en niveles altos ( $>$  mediana) y bajos ( $\leq$  mediana), y se analizaron posibles correlaciones con variables clinicopatológicas mediante la prueba de chi-cuadrado. Encontramos que miR-196b ( $p= 0,005$ ), miR-135b ( $p= 0,010$ ), miR-224 ( $p= 0,034$ ) y miR-188 ( $p= 0,043$ ) variaban significativamente entre los diferentes tipos histológicos (Figura 32A), altos niveles de miR-135b se correlacionaron con mutaciones en *KRAS* ( $p= 0,002$ ; Figura 32B) y altos niveles de miR-21 correlacionaron con la afectación

ganglionar ( $p= 0,010$ ; Figura 32C). Además, el tamaño tumoral correlacionó con miR-29a-5p ( $0,049$ ), miR-590-5p ( $p= 0,036$ ) y miR-19b-1 ( $p= 0,04$ ) (Figura 32D). También encontramos asociaciones entre el género y los miARNs: miR-125a ( $p= 0,022$ ), miR-135b ( $p= 0,002$ ) y miR-224 ( $p= 0,022$ ) (Figura 32E).



**Figura 32.** Representación gráfica mediante histogramas de las asociaciones estadísticamente significativas entre las variables clinicopatológicas y la expresión de los miARNs. Asociaciones estadísticamente significativas de los valores de expresión de miARNs dicotomizados con A) histología, B) estado de *KRAS*, C) afectación ganglionar, D) tamaño tumoral y E) género. El p-valor se obtuvo usando el test chi-cuadrado.

Otras correlaciones encontradas fueron las del hábito tabáquico, con miR-135b ( $p= 0,030$ ), miR-126 ( $p= 0,007$ ) y miR-125a ( $p= 0,007$ ). Estas correlaciones pueden indicar que entre los pacientes no fumadores existe un subgrupo que en un principio tendría una enfermedad más agresiva por tener una sobreexpresión mayor de miR-135 y una menor infraexpresión de miR-126 y miR-125a.

### 3.2. CORRELACIÓN CON PRONÓSTICO

#### 3.2.1. Variables clinicopatológicas

De los 178 pacientes con CPNM resecao incluidos en la cohorte de validación, 80 (44,9%) recayeron y 76 fueron exitus (42,7%) durante el seguimiento. La mediana de seguimiento fue de 81,23 meses [rango: 1-113]. El valor pronóstico de las diferentes variables clinicopatológicas se evaluó usando el método de regresión de Cox univariante para la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y supervivencia global (SG). Los resultados se muestran en la Tabla 27, donde se indican las tasas de riesgo o *hazard ratio* (HR) de que ocurra el evento (recaída o exitus según se considere SLE o SG, respectivamente) y el valor de la significación estadística (p-valor) para cada variable.

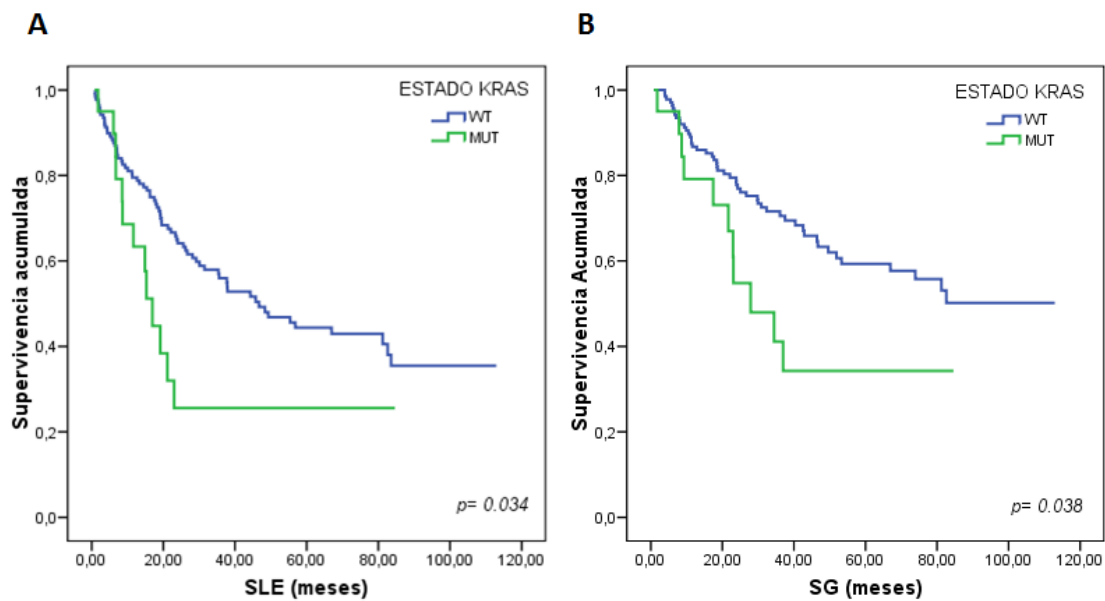
**Tabla 27. Resultados del análisis de Cox basados en variables clinicopatológicas**

| Variable                          | SLE   |             |         | SG    |             |         |
|-----------------------------------|-------|-------------|---------|-------|-------------|---------|
|                                   | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%      | p-valor |
| <b>Género</b>                     |       |             |         |       |             |         |
| Hombre vs. Mujer                  | 1,638 | 0,791-3,391 | 0,184   | 2,499 | 0,909-6,875 | 0,076   |
| <b>Edad (años)</b>                |       |             |         |       |             |         |
| >65 vs. ≤ 65                      | 1,207 | 0,792-1,841 | 0,382   | 1,290 | 0,792-2,100 | 0,065   |
| <b>Estadio</b>                    |       |             |         |       |             |         |
| II/IIIA vs. I                     | 1,258 | 0,824-1,920 | 0,288   | 1,081 | 0,662-1,768 | 0,755   |
| <b>Histología</b>                 |       |             |         |       |             |         |
| ADC vs. SCC vs. Others            | 1,141 | 0,813-1,601 | 0,446   | 1,038 | 0,702-1,536 | 0,850   |
| <b>Tamaño Tumoral</b>             |       |             |         |       |             |         |
| >3.5 cm vs. ≤ 3.5 cm              | 1,478 | 0,962-2,271 | 0,075   | 1,503 | 0,910-2,484 | 0,111   |
| <b>Afectación ganglionar</b>      |       |             |         |       |             |         |
| Si vs. No                         | 1,635 | 1,046-2,556 | 0,031*  | 1,502 | 0,892-2,529 | 0,126   |
| <b>PS</b>                         |       |             |         |       |             |         |
| 1/2 vs. 0                         | 1,457 | 0,924-2,296 | 0,105   | 1,405 | 0,829-2,382 | 0,206   |
| <b>Grado de diferenciación</b>    |       |             |         |       |             |         |
| Pobre vs. Bien/Moderado           | 1,009 | 0,614-1,659 | 0,972   | 0,943 | 0,546-1,756 | 0,979   |
| <b>Tabaquismo</b>                 |       |             |         |       |             |         |
| Ex fumador/Fumador vs. No fumador | 0,844 | 0,352-2,024 | 0,353   | 1,835 | 0,667-5,048 | 0,240   |
| <b>EGFR</b>                       |       |             |         |       |             |         |
| Mutado vs. Nativo                 | 0,908 | 0,380-2,170 | 0,828   | 0,528 | 0,160-1,745 | 0,295   |
| <b>KRAS</b>                       |       |             |         |       |             |         |
| Mutado vs. Nativo                 | 1,886 | 1,038-3,429 | 0,037*  | 1,970 | 1,024-3,790 | 0,042*  |

EGFR, receptor del factor de crecimiento epidérmico; HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; PS, estado funcional; SG, supervivencia global; SLE; supervivencia libre de enfermedad. Los resultados se obtuvieron mediante el método de regresión de Cox univariante. \*p < 0.05.

Los resultados significativos obtenidos del análisis univariante de Cox se analizaron también mediante el método de Kaplan-Meier (estadístico log-rango) para obtener las curvas de supervivencia. Este análisis univariante de las variables clinicopatológicas mostró que aquellos pacientes que albergaban alguna mutación de *KRAS* tenían una SLE más corta al igual que menor SG ( $p= 0,034$  y  $p= 0,038$ ; respectivamente, Figura 33), que el grupo de pacientes sin mutaciones. Estos resultados están en concordancia con resultados publicados previamente, aunque el valor pronóstico de *KRAS* en CPNM sigue siendo un tema controvertido (Camps et al., 2011; Gallach et al., 2013; Usó et al., 2017).

Además, como se había demostrado previamente (Suzuki et al., 2013), la afectación ganglionar fue significativamente asociada con menor SLE ( $p= 0,029$ ). Ninguna otra variable clínica parece tener valor pronóstico en nuestra cohorte.



**Figura 33. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier de acuerdo al estado mutacional de *KRAS*.** A) Análisis para la SLE, y B) SG. La línea azul representa los pacientes con *KRAS* nativo, mientras que la línea verde representa los pacientes mutados. P-valores obtenidos por test de log-rango.

### 3.2.2. Análisis por subgrupos histológicos

El valor pronóstico de las variables clinicopatológicas también se evaluó en relación a la histología. El subgrupo de ADC comprendía 78 pacientes (incluyendo las histologías ADC y adenoescamosos). En el análisis univariante, solo la afectación ganglionar se asoció con SLE ( $p= 0,020$ ; Tabla 28).

El subgrupo de SCC comprendía 84 de los 178 pacientes del estudio. En este subgrupo no se encontró ninguna asociación significativa entre las variables clinicopatológicas y las pronósticas (SLE y SG; no se muestran los datos).

**Tabla 28. Resultados del análisis de Cox basados en variables clinicopatológicas para los pacientes con histología ADC.**

| Variable                     | SLE   |             |         | SG    |              |         |
|------------------------------|-------|-------------|---------|-------|--------------|---------|
|                              | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%       | p-valor |
| <b>Género</b>                |       |             |         |       |              |         |
| Hombre vs. Mujer             | 1,956 | 0,860-4,449 | 0,110   | 3,215 | 0,963-10,728 | 0,058   |
| <b>Edad (años)</b>           |       |             |         |       |              |         |
| >65 vs. ≤ 65                 | 1,205 | 0,636-2,284 | 0,567   | 1,619 | 0,741-3,537  | 0,227   |
| <b>Estadio</b>               |       |             |         |       |              |         |
| II/IIIA vs. I                | 1,265 | 0,653-2,451 | 0,487   | 0,967 | 0,430-2,174  | 0,935   |
| <b>Tamaño tumoral</b>        |       |             |         |       |              |         |
| >3.5 cm vs. ≤ 3.5 cm         | 1,812 | 0,948-3,464 | 0,072   | 1,925 | 0,872-4,248  | 0,105   |
| <b>Afectación ganglionar</b> |       |             |         |       |              |         |
| Sí vs. No                    | 2,428 | 1,153-5,113 | 0,020*  | 1,786 | 0,707-4,511  | 0,220   |
| <b>PS</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| 1/2 vs. 0                    | 1,698 | 0,816-3,534 | 0,157   | 1,364 | 0,541-3,442  | 0,511   |
| <b>EGFR</b>                  |       |             |         |       |              |         |
| Mutado vs. Nativo            | 0,943 | 0,356-2,497 | 0,905   | 0,441 | 0,094-1,792  | 0,237   |
| <b>KRAS</b>                  |       |             |         |       |              |         |
| Mutado vs. Nativo            | 1,976 | 0,971-4,020 | 0,060   | 2,146 | 0,947-4,864  | 0,067   |

EGFR, receptor de factor de crecimiento epidérmico; HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; PS, estado funcional; SG, supervivencia global; SLE; supervivencia libre de enfermedad. Los resultados se obtuvieron mediante el método de regresión de Cox univariante. \* $p < 0.05$ .

### 3.2.3. MiARNs

El valor pronóstico de los diferentes miARNs se evaluó, al igual que en los apartados previos, usando el método de regresión univariante de Cox para SLE y SG. Los niveles de expresión génica se dicotomizaron de acuerdo con la mediana de expresión en altos (> mediana) o bajos ( $\leq$  mediana). Los resultados obtenidos en el análisis univariante se muestran en la Tabla 29.

Tabla 29. Resultados del análisis de supervivencia basados en la expresión de miARNs en la cohorte completa. A) MicroARNs *up*-regulados y B) MiARNs *down*-regulados.

| A) MicroRNAs <i>up</i> -regulados |       |             |         |       |              |         |
|-----------------------------------|-------|-------------|---------|-------|--------------|---------|
| Nombre                            | SLE   |             |         | SG    |              |         |
|                                   | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%       | p-valor |
| <b>miR-182</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 0,953 | 0,618-1,469 | 0,828   | 0,960 | 0,583-1,582  | 0,873   |
| <b>miR-29a</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,228 | 0,791-1,906 | 0,360   | 1,291 | 0,777-2,146  | 0,325   |
| <b>miR-19b-1</b>                  |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,043 | 0,678-1,605 | 0,847   | 1,254 | 0,761-2,066  | 0,374   |
| <b>miR-34a</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,427 | 0,927-2,197 | 0,106   | 1,538 | 0,930-2,542  | 0,930   |
| <b>miR-339</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,250 | 0,812-1,923 | 0,311   | 1,494 | 0,903-2,470  | 0,118   |
| <b>miR-590</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,009 | 0,655-1,552 | 0,969   | 1,076 | 0,653-1,772  | 0,774   |
| <b>miR-31</b>                     |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,200 | 0,778-1,850 | 0,410   | 1,224 | 0,740-2,024  | 0,430   |
| <b>miR-188</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,782 | 1,150-2,762 | 0,010*  | 2,198 | 1,305-3,702  | 0,003*  |
| <b>miR-21</b>                     |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,565 | 1,013-2,417 | 0,043*  | 1,675 | 1,010-2,780  | 0,046*  |
| <b>miR-135b</b>                   |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,236 | 0,800-1,910 | 0,340   | 1,242 | 0,751-2,055  | 0,398   |
| <b>miR-199b</b>                   |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,170 | 0,746-1,836 | 0,493   | 1,268 | 0,754-2,134  | 0,370   |
| <b>miR-224</b>                    |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,038 | 0,674-1,597 | 0,866   | 1,090 | 0,662-10,795 | 0,735   |
| <b>miR-196b</b>                   |       |             |         |       |              |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>              | 1,092 | 0,704-1,693 | 0,695   | 0,988 | 0,598-1,633  | 0,963   |

| B) MicroRNAs <i>down</i> -regulados     |       |             |         |       |             |         |
|---|-------|-------------|---------|-------|-------------|---------|
| Nombre                                  | SLE   |             |         | SG    |             |         |
|   | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%      | p-valor |
| <b>miR-451a</b><br><i>Alto vs. Bajo</i> | 1,091 | 0,709-1,680 | 0,692   | 1,485 | 0,893       | 2,467   |
| <b>miR-144</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 1,273 | 0,824-1,967 | 0,277   | 1,643 | 0,980-2,753 | 0,600   |
| <b>miR-195</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 1,188 | 0,770-1,833 | 0,436   | 1,355 | 0,817-2,248 | 0,239   |
| <b>miR-125a</b><br><i>Alto vs. Bajo</i> | 1,330 | 0,857-2,064 | 0,204   | 1,902 | 1,129-3,203 | 0,016*  |
| <b>miR-218</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 1,089 | 0,708-1,677 | 0,698   | 1,279 | 0,775-2,110 | 0,336   |
| <b>miR-145</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 1,383 | 0,897-2,134 | 0,143   | 1,537 | 0,925-2,553 | 0,097   |
| <b>miR-30a</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 1,148 | 0,745-1,769 | 0,532   | 1,284 | 0,775-2,129 | 0,331   |
| <b>miR-126</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 0,858 | 0,555-1,326 | 0,491   | 1,185 | 0,714-1,965 | 0,512   |
| <b>miR-139</b><br><i>Alto vs. Bajo</i>  | 1,043 | 0,678-1,605 | 0,847   | 1,047 | 0,636-1,723 | 0,858   |

Niveles de expresión de miARNs dicotomizados tomando como punto de corte la mediana. Los resultados se obtuvieron mediante el método de regresión de Cox univariante. IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; \*p < 0.05.

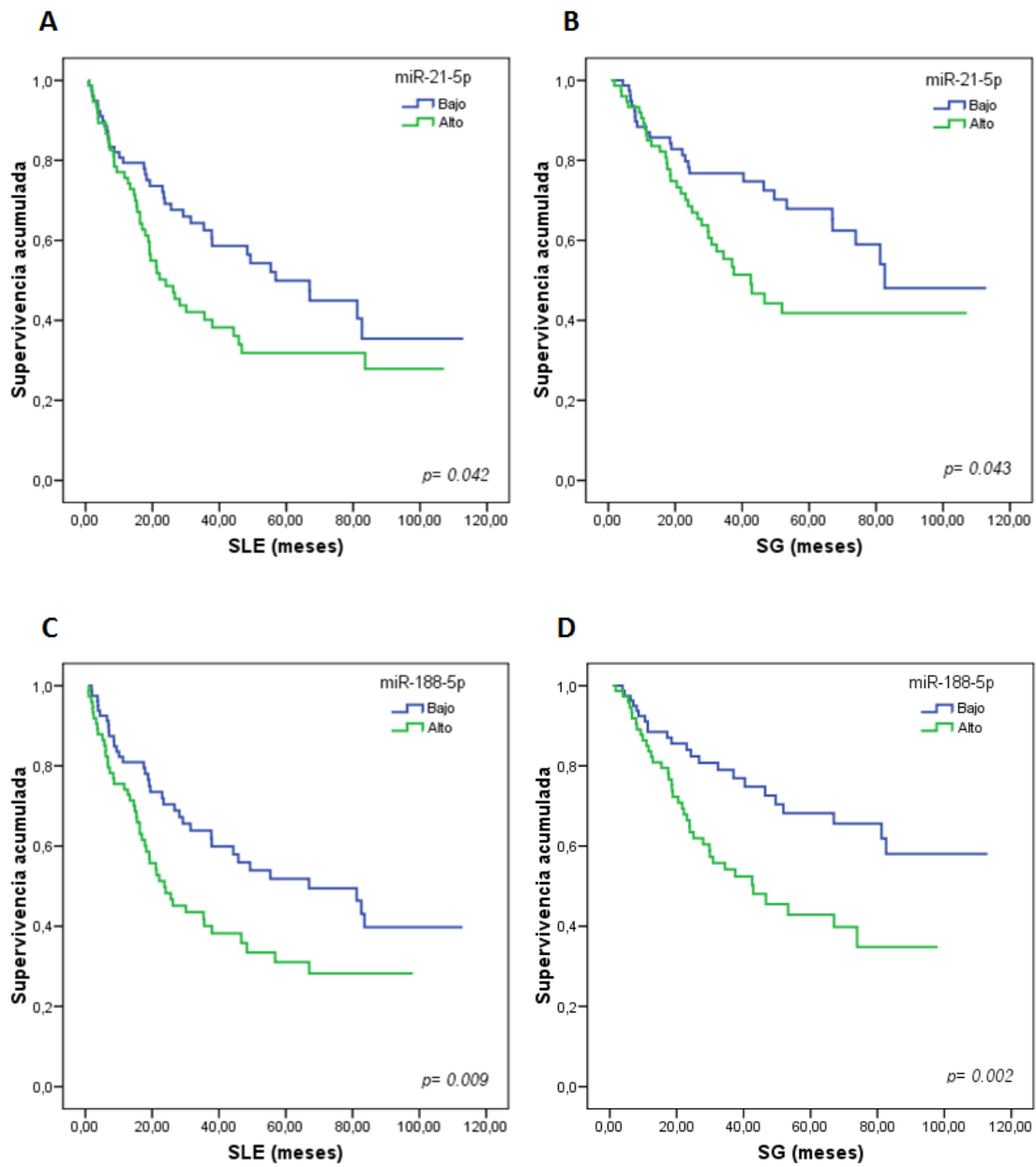
El análisis de regresión de Cox univariante reveló que altos niveles de miR-21 se asociaron con un riesgo mayor de recaída o muerte (SLE: HR= 1,565; [1,013-2,417]; p= 0,043 y SG: HR= 1,675; [1,010-2,780]; p= 0,046]. Los análisis de Kaplan-Meier se realizaron para obtener las curvas de supervivencia (Figura 34A-B) indicando que pacientes con altos niveles de miR-21 tenían una SLE más corta (24,03 vs. 56,83 meses, p= 0,042; Figura 34A) y una peor SG (42,60 vs. 82,60 meses, p= 0,043; Figura 34B). Este miARN ha sido ampliamente descrito por estar sobreexpresado en muchos tumores sólidos (Jepsen et al., 2016; Latchana et al., 2016; Farazi et al., 2011; Usmani et al., 2015), incluido el cáncer de pulmón (Yang et al., 2013; Capodanno et al., 2013). Apoyando nuestros resultados, algunos estudios han encontrado que niveles altos de miR-21 tanto en tejido tumoral como en plasma de pacientes con CPNM se asociaron con un mal pronóstico (Bediaga et al., 2013; Cinegaglia et al., 2016; Boeri et al., 2011; Ma et al., 2011; Seike et al., 2009). Diferentes meta-análisis llevados a cabo en varios tipos tumorales (Zhu and Xu, 2014; Zhou et al., 2014; Fu et al., 2011) y solo en CPNM (Vosa et al., 2013; Guan et al., 2012), encuentran una asociación entre el miR-21 y la supervivencia. Sobre su mecanismo de acción, se ha descrito que la sobreexpresión del

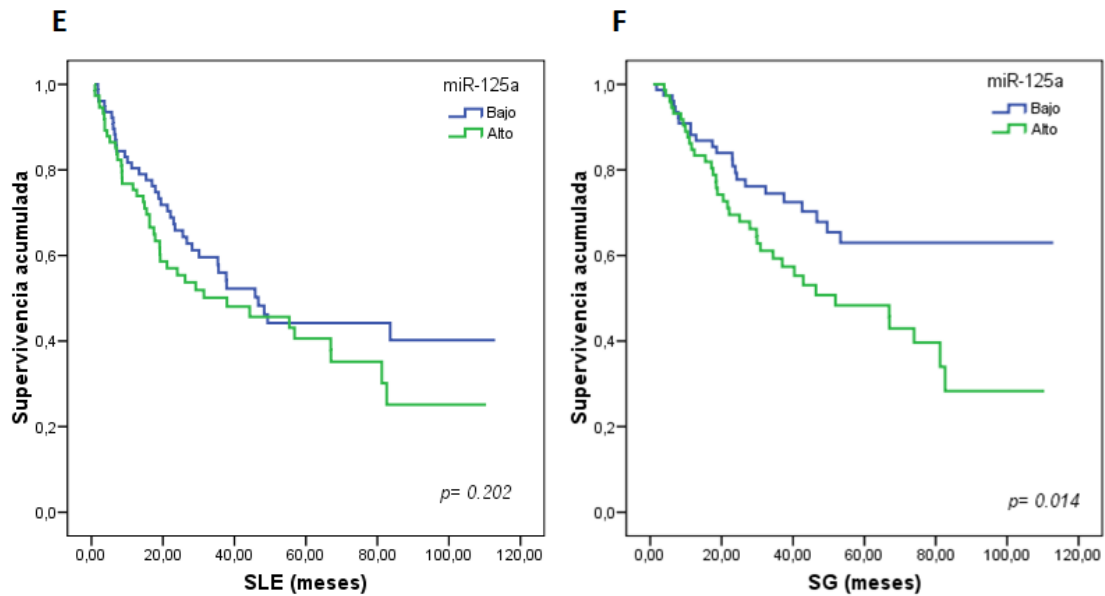
miR-21 lleva a la inhibición de varios supresores de tumores, tales como PTEN, TPM1 y PDCD4 (Li and Rana, 2014). Por todo esto, miR-21 parece ser un biomarcador prometedor y también una interesante diana terapéutica y cuya inhibición puede tener beneficios en pacientes con CPNM.

Otro miARN que correlacionó con una peor SLE (HR: 1,782; [1,150-2,762];  $p= 0,010$  y SG [HR=2,198; [1,305-3,702];  $p= 0,003$ ) fue el miR-188. Las medianas de supervivencia extraídas de las Kaplan-Meier (Figura 34C-D) indican que aquellos pacientes con niveles elevados de este miARN presentaron una SLE más reducida (23,67 vs. 66,97 meses,  $p = 0,009$ ) y OS más corta (42,90 vs. 81,23 meses,  $p = 0,002$ ). Este miARN, al contrario que el miR-21, no es un miARN muy descrito en relación con cáncer. De hecho existen pocos estudios en los que se analice su valor pronóstico y ninguno hasta la fecha que lo relacione con cáncer de pulmón, como ya hemos comentado anteriormente. En la misma línea que nuestros resultados, una elevada expresión de miR-188 ha sido significativamente asociada con una SG y una supervivencia libre de evento más cortas en pacientes con leucemia mieloide aguda (citogenéticamente normal) (Jinlong et al., 2015). Teniendo en cuenta el escaso conocimiento que se tiene sobre los mecanismos de acción de miR-188, son necesarios más estudios para clarificar su función en el proceso carcinogénesis y su implicación pronóstica en cáncer.

Finalmente, miR-125a fue uno de los miARNs validados en el estudio realizado por RTqPCR, encontrándose que una mayor expresión del miR-125a se correlacionó con una peor SG (HR: 1,902 [1,129-3,203];  $p= 0,016$ ). En la Figura 34E-F, se pueden ver las curvas de Kaplan-meier para este miARN, donde el grupo de buen pronóstico no alcanza la mediana de supervivencia. Este miARN se ha descrito por estar regulado por la vía EGFR, de manera que cuando hay niveles elevados de éste en el tumor, los niveles del miR-125a decrecen. En estudios *in vitro*, se ha descrito que miR-125a podría ser un inhibidor del proceso metastásico en cáncer de pulmón (Wang et al., 2009). Por lo que se esperaría un efecto contrario en el pronóstico de este miR-125a. En vista de nuestros resultados, creemos que una caracterización más exhaustiva de este miARN es necesaria para clarificar su papel en el proceso tumorigénico en cáncer de pulmón.







**Figura 34. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a los niveles de expresión de miARNs.** A-B) miR-21, y C-D) miR-188 y E-F) miR-125a. Los niveles de expresión de los miARNs se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea azul representa los pacientes con niveles de expresión de miARN bajos, mientras que la línea verde representa los pacientes con niveles altos. P-valores obtenidos en el test de log-rango.

#### *Análisis del valor pronóstico de miARNs en subtipos histológicos*

El CPNM es uno de los tumores más diversos en cuanto a alteraciones genómicas, con una gran variedad de subgrupos de pacientes definidos molecularmente. Diferentes mutaciones *driver* se han identificado en las histologías de SCC y en ADC, que han llevado a la suposición que son enfermedades molecularmente diferentes. Por esta razón, los análisis de supervivencia se realizaron también de acuerdo a la histología de los pacientes.

Los resultados del análisis de regresión de Cox para ADCs más significativos se recogen en la Tabla 30. No se encontraron asociaciones significativas entre la histología SCC y los 22 miARNs analizados.

**Tabla 30. Resultados del análisis de supervivencia basados en la expresión de miARNs para pacientes con ADC.**

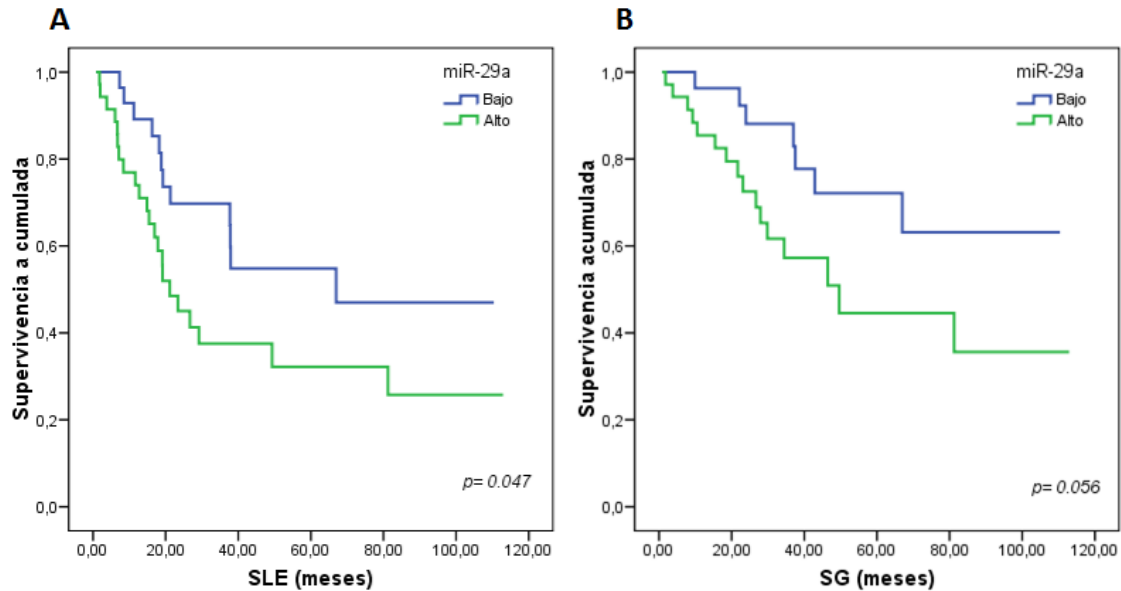
| Nombre               | SLE   |             |         | SG    |             |         |
|----------------------|-------|-------------|---------|-------|-------------|---------|
|                      | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%      | p-valor |
| <b>miR-29a</b>       |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i> | 2,020 | 0,996-4,097 | 0,050*  | 2,327 | 0,954-5,679 | 0,063   |
| <b>miR-19b-1</b>     |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i> | 1,723 | 0,871-3,409 | 0,118   | 3,187 | 1,307-7,771 | 0,011*  |
| <b>miR-339</b>       |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i> | 2,033 | 1,030-4,012 | 0,041*  | 2,910 | 1,204-7,032 | 0,018*  |
| <b>miR-188</b>       |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i> | 2,391 | 1,215-4.706 | 0,012*  | 3,533 | 1,510-8.267 | 0,004*  |
| <b>miR-21</b>        |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i> | 2,245 | 1,121-4,496 | 0,022*  | 2,290 | 0,972-5.398 | 0,058   |

Niveles de expresión de miARNs dicotomizados como altos y bajos tomando como punto de corte la mediana. Los resultados se obtuvieron mediante el método de regresión de Cox univariante. IC, intervalo de confianza; HR, hazard ratio; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; \* $p < 0.05$ .

Resulta interesante analizar el comportamiento de miR-29a, el cual se encontró sobreexpresado en nuestras dos cohortes de estudio, pero solo presentó asociación con el intervalo libre de enfermedad en el grupo de ADC (HR: 1,782 [0,954-5,679];  $p = 0,050$ ; Tabla 30). El análisis mediante Kaplan-Meier muestra que las medianas de supervivencia de aquellos pacientes con niveles elevados de miR-29a son significativamente más bajas que aquellos que presentan niveles más bajos de ese miARN (66,97 vs. NA meses,  $p = 0,047$ ; Figura 35). El miR-29a ha sido poco descrito en CPNM y específicamente en ADC pero apoyando estos datos existe un estudio en tejido de ADC de pulmón donde este miARN también se ha encontrado sobreexpresado (Cinegaglia et al., 2016), ahora bien ningún estudio hasta la fecha lo ha relacionado con pronóstico. Además estudios funcionales *in vitro* han mostrado que este miARN tiene un comportamiento dual: como oncomiR y también como supresor de tumores, ya que puede reprimir la función tanto de oncogenes como de genes supresores de tumores. Este hecho hace difícil evaluar su utilidad como diana terapéutica ya que tiene un abanico muy grande de genes diana, con funciones inversas.

Respecto al miR-19b-1, solo encontramos una asociación significativa con SG (HR: 3,187 [1,204-7,032];  $p = 0,018$ ). Si tenemos en cuenta el análisis mediante Kaplan-Meier los pacientes con niveles altos de este miARN presentaban una SG

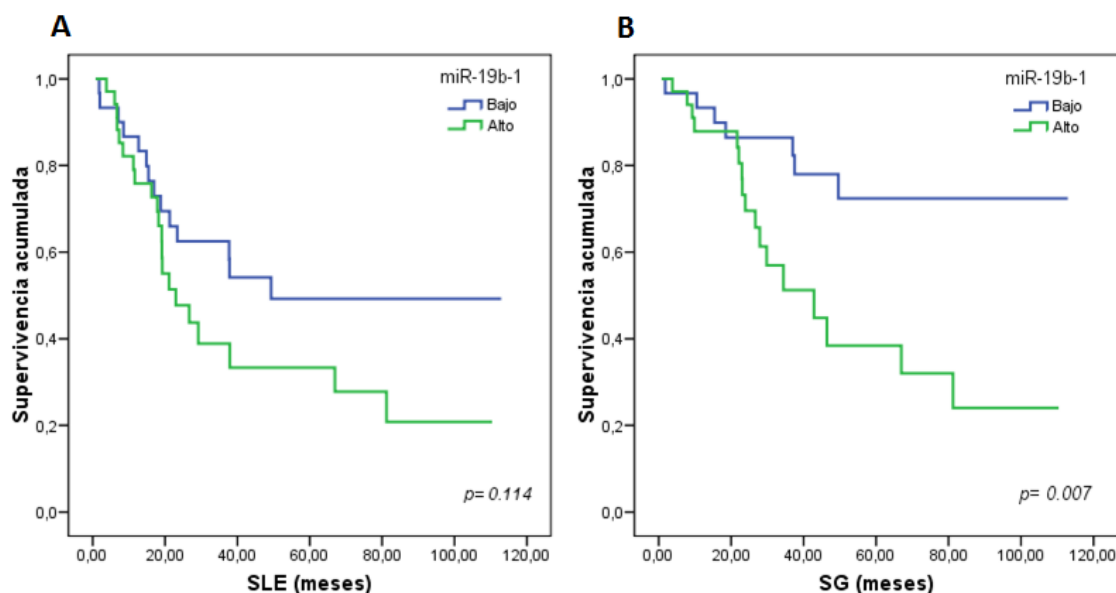
significativamente reducida (44,9 vs. NA meses,  $p= 0,007$ ; Figura 36B) respecto al grupo de pacientes con niveles más bajos. Otros estudios también reportan esta asociación entre miR-19b-1 y mal pronóstico en CPNM (Navarro et al., 2009; Wu et al., 2014), pero ningún estudio ha mostrado hasta ahora su valor pronóstico en la histología de ADC.



**Figura 35. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a los niveles de expresión de miR-29a.** A) SLE y B) SG. Los niveles de expresión del miARN se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea azul representa los pacientes con niveles de expresión del miARN bajos, mientras que la línea verde representa los pacientes con niveles altos. P-valores obtenidos por test log-rango.

El miR-339-5p también se correlacionó con SLE (HR: 2,033 [1,030-4,012];  $p= 0,041$ ) y SG (HR: 2,910 [1,307-7,771];  $p= 0,011$ ) en este subgrupo de pacientes. Las curvas de Kaplan-Meier indican que el grupo de pacientes con niveles altos de miR-339-5p tenían peor SLE (19,1 vs. 67,0 meses,  $p= 0.037$ ; Figura 37A) y SG (37,0 vs. NA meses,  $p= 0.013$ ; Figura 37B). Este miARN no se ha encontrado relacionado con supervivencia, aunque hay un estudio en líneas celulares de CPNM en el que lo relacionan con inhibición de los procesos de invasión y metástasis (Y. Li et al., 2014). En miRTarBase (<http://mirtarbase.mbc.nctu.edu.tw/>), la base de datos de interacciones entre miARN y mARN como dianas validadas experimentalmente (Chou et al., 2016), se relaciona este miARN con la regulación del gen *FBXO31*, que codifica una proteína de la familia Fbox, que media la degradación de la ciclina D1 para inducir el arresto celular en G1 después de sufrir daño celular (Santra et al., 2009). Con la sobreexpresión de miR-339, los

niveles de FBXO31 estarían reducidos, impidiendo el arresto celular en G1 y por tanto aumentando el crecimiento celular. Apoyando estos datos, estudios en carcinoma hepatocelular y carcinoma esofágico de célula escamosa encuentran este gen infraexpresado en tumor, sugiriendo una función de gen supresor de tumores (Huang et al., 2010; Kogo et al., 2011).

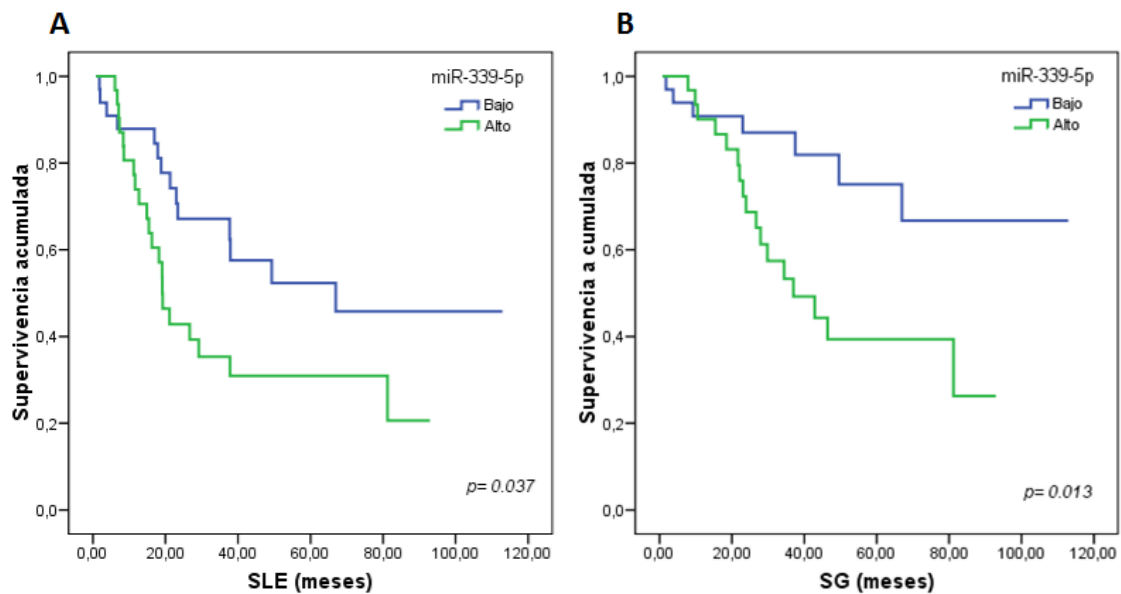


**Figura 36. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a los niveles de expresión de miR-19b-1.** A) SLE y B) SG. Los niveles de expresión del miARN se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea azul representa los pacientes con niveles de expresión del miARN bajos, mientras que la línea verde representa los pacientes con niveles altos. P-valores obtenidos por test log-rango.

Siguiendo con el análisis en el subgrupo de ADC, el modelo de regresión de Cox univariante, mostró la misma asociación entre altos niveles tanto de miR-21 como de miR-188 y peor pronóstico que se encontró en toda la cohorte de validación para SLE (Tabla 31), pero solo el miR-188 mostró una asociación significativa con SG, aunque el miR-21 muestra una clara tendencia hacia la significación (Tabla 31).

Teniendo en cuenta el análisis mediante curvas Kaplan-Meier, aquellos pacientes con unos mayores niveles de expresión de miR-188 presentaban medianas de supervivencia más reducidas en ambas SLE (18,2 vs. 67,0 meses,  $p=0,009$ ; Figura 38A) y SG (34,4 vs. NA meses,  $p=0,002$ ; Figura 38B), respecto a los pacientes con bajos niveles de este miARN. En cuanto al miR-21, las medianas de supervivencia de los pacientes con altos niveles del miARN tuvieron una SLE significativamente reducida

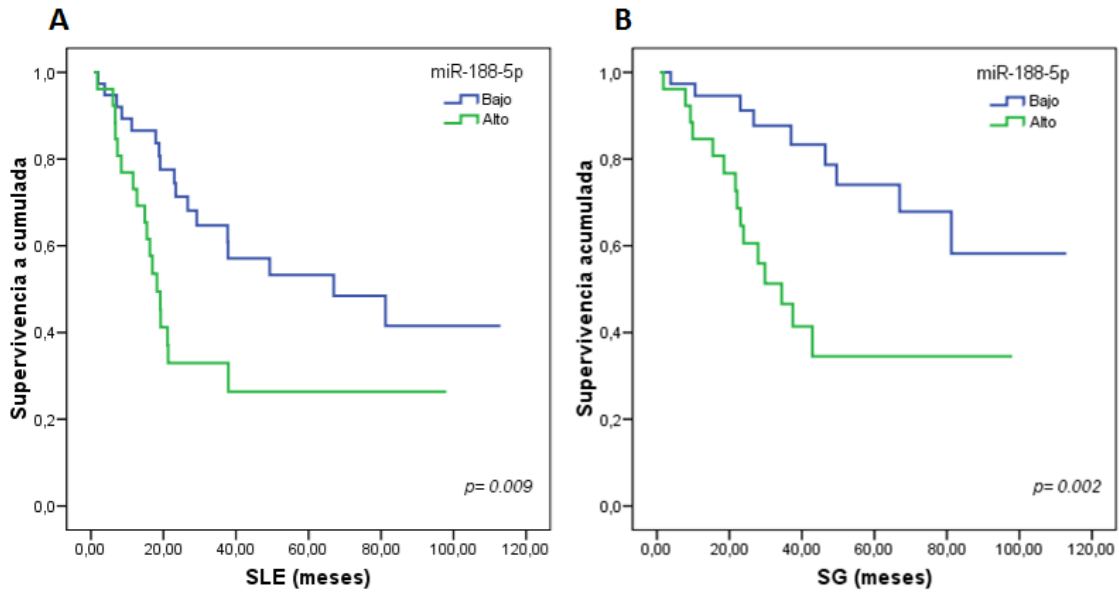
respecto a aquellos pacientes con niveles bajos (19,1 vs. 67,0 meses,  $p= 0,019$ ; Figura 39A). La Kaplan-Meier para la SG del miR-21 muestra una clara tendencia, donde se observa que niveles por encima de la mediana de este miARN se correlacionan con pacientes con medianas de supervivencia más cortas (37,5 vs. NA meses,  $p= 0,052$ ; Figura 39B).



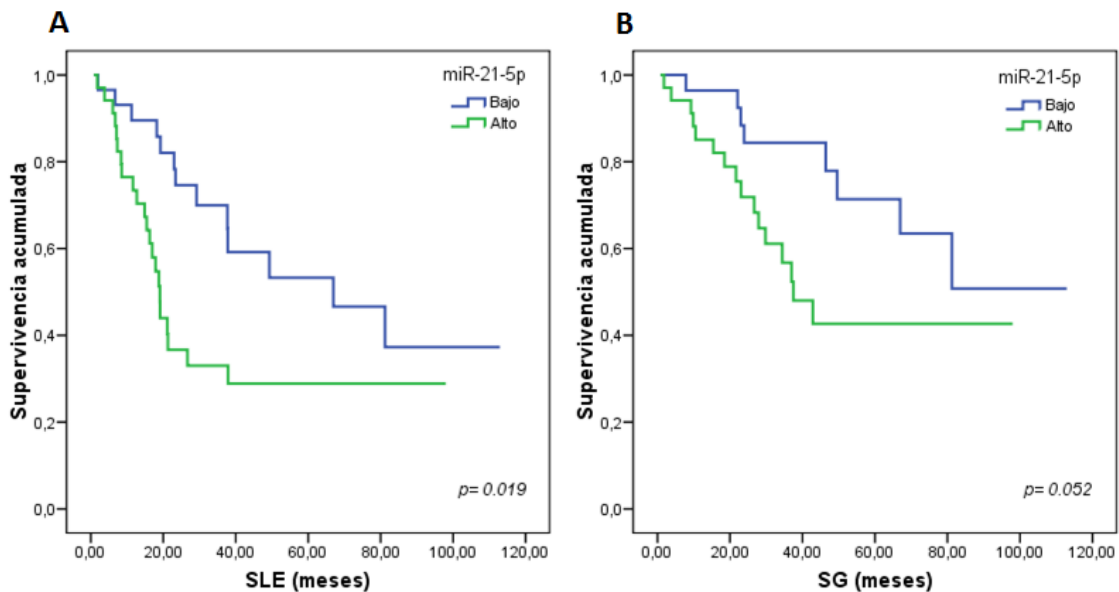
**Figura 37. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a los niveles de expresión de miR-339-5p.** A) SLE y B) SG. Los niveles de expresión del miARN se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea azul representa los pacientes con niveles de expresión del miARN bajos, mientras que la línea verde representa los pacientes con niveles altos. P-valores obtenidos por test log-rango.

Al igual que sucede con el CPNM, no existe actualmente ningún artículo en la literatura que describa la relación entre la histología ADC de pulmón y el miR-188. Así que se necesitan más estudios para conocer esta relación y el papel del miR-188 en el proceso de carcinogénesis del cáncer en general y del cáncer de pulmón en particular.

El miR-21 como ya hemos dicho es un miARN ampliamente conocido en cáncer, conociéndose su papel como oncogén en el proceso de carcinogénesis en la mayoría de tipos tumorales que ya citamos en apartados anteriores. En nuestro caso en concreto y avalando nuestros resultados, existen varios estudios en ADC de pulmón que describen tanto la sobreexpresión de este miARN en este subtipo histológico como su impacto tanto en SG como en SLE (Robles et al., 2015; Tian et al., 2016; Saito et al., 2011).



**Figura 38. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a los niveles de expresión de miR-188.** A) SLE y B) SG. Los niveles de expresión del miARN se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea azul representa los pacientes con niveles de expresión del miARN bajos, mientras que la línea verde representa los pacientes con niveles altos. P-valores obtenidos por test log-rango.



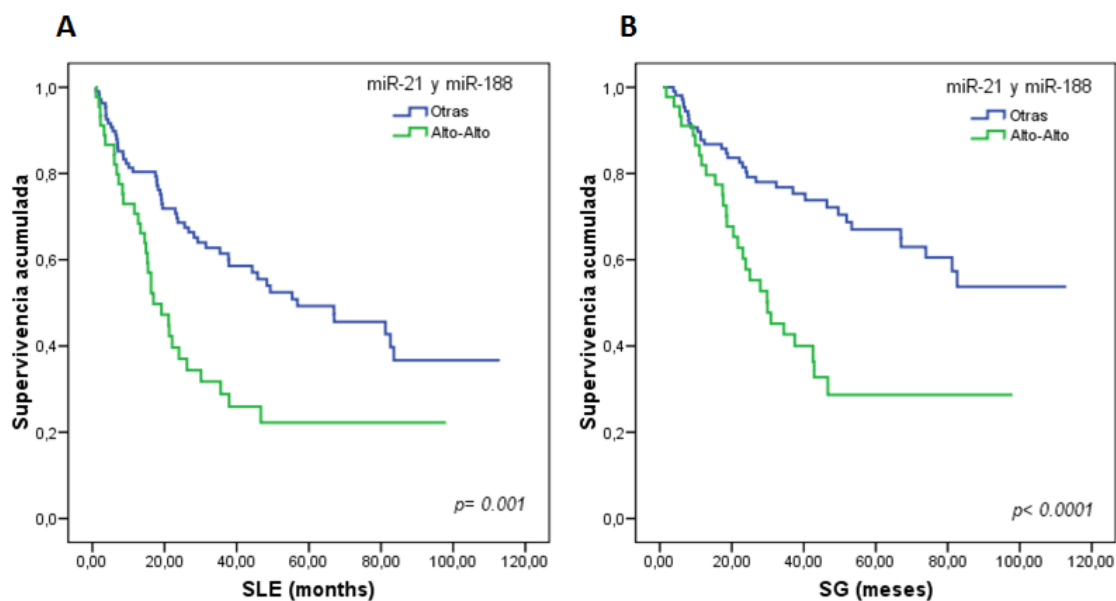
**Figura 39. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a los niveles de expresión de miR-21.** A) SLE y B) SG. Los niveles de expresión del miARN se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea azul representa los pacientes con niveles de expresión del miARN bajos, mientras que la línea verde representa los pacientes con niveles altos. P-valores obtenidos por test log-rango.

### 3.2.4. Firmas pronósticas basadas en miARNs

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, y para mejorar la evaluación del pronóstico de los pacientes, consideramos la posibilidad de buscar una firma que pudiera mejorar el valor pronóstico de cada miARN de manera individual, por lo que se generó una nueva variable en la que se tuvieron en cuenta las expresiones de los dos miARNs con mayor peso en cuanto a pronóstico en nuestra cohorte: miR-21 y miR-188. Para ello se creó una variable combinada con los dos miARNs que resultó de la suma de las variables dicotomizadas de ambos miARNs. Esta nueva variable diferenciaba los pacientes en tres subgrupos, uno presentaba aquellos pacientes con niveles de expresión altos para los dos miARNs, otro presentaba aquellos pacientes en los que uno de los miARNs tenía niveles altos de expresión y el otro bajos, y el último recogía aquellos pacientes cuya expresión de ambos miARNs era baja. Finalmente los pacientes se agruparon en dos subgrupos: i) pacientes con elevada expresión de ambos miARNs (miR-21<sup>alto</sup> y miR-188<sup>alto</sup>) y ii) pacientes con baja expresión de ambos miARNs o de alguno de ellos (grupo que denominamos “otros”).

En la Figura 40 se muestran las curvas de supervivencia para la firma de los dos miARNs, las cuales muestran diferencias significativas tanto en SLE (Figura 40A) como en SG (Figura 40B). En ellas se ve claramente como el grupo de pacientes con elevada expresión de ambos miARNs (miR-21<sup>alto</sup> y miR-188<sup>alto</sup>) se asocia con intervalos a la recaída más cortos así como también menor SG. Tanto es así, que el grupo de mejor pronóstico no alcanza la mediana de supervivencia para SG (29,90 mese vs. NA,  $p < 0,0001$ ). Como ya se mencionó anteriormente el miR-21 se ha asociado anteriormente con peor pronóstico en CPNM y en otros tipos de cáncer. Por el contrario, el miR-188, es un miARN poco descrito en cáncer en particular, y concretamente en cáncer de pulmón no existe hasta la fecha ningún estudio que relacione este miARN con supervivencia. Así en nuestro análisis además de describir la implicación de este miARN en pronóstico en CPNM por primera vez, se construyó una firma de miARNs que presenta más robustez que cada miARN por separado.





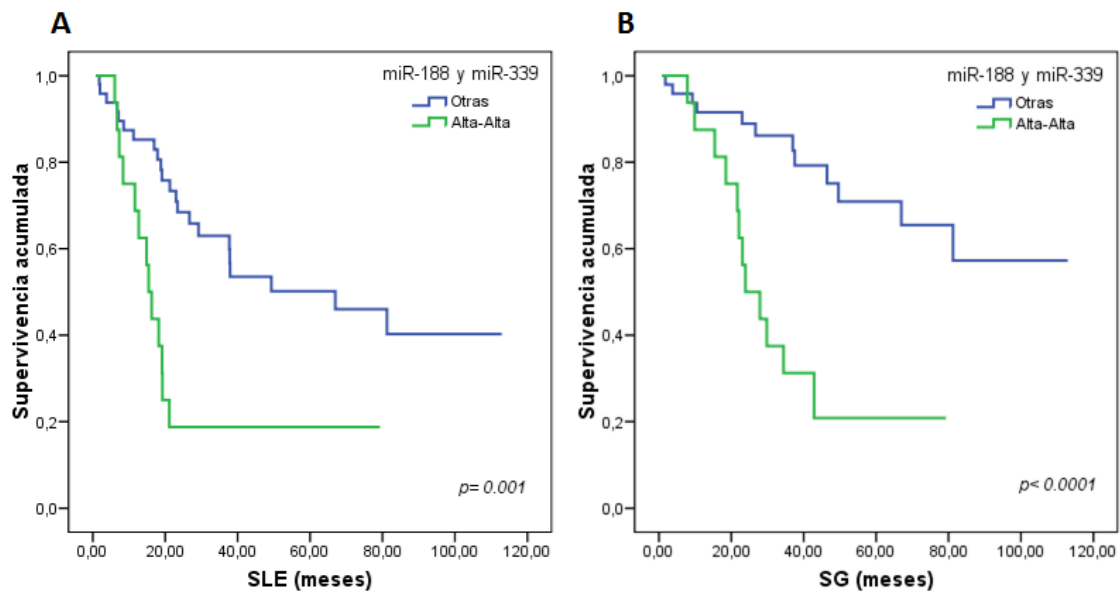
**Figura 40. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a la variable combinada (miR-21 y miR-188).** Los niveles de expresión de los miARNs se dicotomizaron con respecto a la mediana y después se creó la variable combinada. La línea verde representa los pacientes con niveles de expresión altos para ambos miARNs, mientras que la línea azul representa los pacientes con el resto de combinaciones de expresión. P-valores obtenidos por test log-rango.

### 3.2.5. Firmas pronósticas de miARNs en subgrupos histológicos

Al igual que hicimos con la cohorte completa de pacientes y teniendo en cuenta los resultados obtenidos en los análisis de supervivencia en el subgrupo de ADC, consideramos la posibilidad de combinar los dos miARNs que mostraron estar asociados con pronóstico tanto en SLE como en SG, miR-188 y miR-339. Para ello se creó una variable combinada que incluía a ambos miARNs (a partir de los valores de las variables dicotomizadas). Los pacientes se agruparon en dos subgrupos: i) pacientes con elevada expresión de ambos miARNs (miR-188<sup>alto</sup> y miR-339<sup>alto</sup>) y ii) pacientes con baja expresión de ambos miARNs o de alguno de ellos (grupo que denominamos “otros”).

Como era esperable, aquellos pacientes con elevada expresión de ambos miARNs (miR-188<sup>alto</sup> y miR-339<sup>alto</sup>) se asociaron con peores tiempos tanto de SLE como de SG, mejorando la discriminación entre pacientes con buen y mal pronóstico respecto al análisis de supervivencia mediante miARNs individuales. Tanto es así que el grupo de mejor pronóstico no alcanza la mediana de supervivencia para SG (23,9 meses vs. NA,  $p < 0,0001$ ). Las curvas de Kaplan-Meier muestran la diferencia tan acusada que existe

entre los dos grupos de pacientes tanto para SLE como para SG (Figura 41A-B). Como ya se mencionó anteriormente tanto miR-188 como miR-339 son miARNs poco descritos en cáncer en particular y, concretamente en cáncer de pulmón no existe hasta la fecha ningún estudio que los relacione con valor pronóstico, por lo que resulta interesante proponerlos como posibles biomarcadores en pacientes con ADC de pulmón en estadios resecables, ya que la firma que hemos definido es capaz de diferenciar claramente dos subgrupos de pacientes con pronósticos muy diferentes, siendo el subgrupo que tiene un peor curso clínico aquel cuyos pacientes presentan niveles de expresión elevados de ambos miARNs.



**Figura 41. Curvas de supervivencia Kaplan-Meier para SLE y SG de acuerdo a la variable combinada (miR-188 y miR-339) en el subgrupo ADC.** Los niveles de expresión de los miARNs se dicotomizaron con respecto a la mediana y después se creó la variable combinada. La línea verde representa los pacientes con niveles de expresión altos para ambos miARNs, mientras que la línea azul representa los pacientes con el resto de combinaciones de expresión. P-valores obtenidos por test Log-rango.

### 3.2.6. Análisis multivariante

Para comprobar si realmente el valor pronóstico de los miARNs analizados en este estudio tenían valor pronóstico independiente, se realizó un análisis multivariante que incluyó todas las variables clínicas que habían sido asociadas significativamente con el pronóstico ( $p < 0,05$ ) junto a las variables analíticas. En el modelo multivariante para la SG se incluyeron las siguientes variables: estado mutacional del gen *KRAS*, miR-21, miR-188, miR-125a y la firma de miARNs. Las variables incluidas en el modelo para SLE

fueron: afectación ganglionar, estado mutacional del gen *KRAS*, miR-21, miR-188 y la firma de miARNs. Los resultados obtenidos para este análisis multivariante se muestran en la Tabla 31 e indicaron que las mutaciones de *KRAS* se comportan como un biomarcador independiente para SLE (HR: 2,076 [1,215-3,831],  $p = 0,020$ ). Además, y como dato más relevante la firma de miARNs miR-21<sup>alto</sup> y miR-188<sup>alto</sup> también se identificó como un marcador pronóstico independiente tanto para SLE (HR: 2,170 [1,372-3,431];  $p = 0,001$ ) como para SG (HR: 3,256 [1,907-5,561];  $p < 0,0001$ ).

Estos hallazgos sugieren a esta firma como un nuevo marcador pronóstico en CPNM que podría ser útil para distinguir aquellos pacientes que podrían beneficiarse de una monitorización más exhaustiva.

**Tabla 31. Resultados del modelo de regresión de Cox multivariante que incluye todas las variables significativas.**

| Variables                    | SLE   |             |         | SG    |             |         |
|------------------------------|-------|-------------|---------|-------|-------------|---------|
|                              | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%      | p-valor |
| <b>Estado de <i>KRAS</i></b> |       |             |         |       |             |         |
| <i>Mutado vs. WT</i>         | 2,076 | 1,215-3,831 | 0,020   | --    | --          | --      |
| <b>Firma miARNs</b>          |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Otros</i>        | 2,170 | 1,372-3,431 | 0,001   | 3,256 | 1,907-5.561 | <0,0001 |

HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad; WT, del inglés nativo.

### 3.2.7. Análisis multivariante en subtipos histológicos

En el grupo de ADCs, también se realizó un análisis multivariante donde se incluyeron todas las variables clínicas y experimentales que habían sido asociados significativamente con el pronóstico ( $p < 0,05$ ) tanto para SLE como para SG. Las variables incluidas en el modelo para SLE fueron: afectación ganglionar, miR-339, miR-188, miR-21 y la firma de miARNs. En el modelo multivariante para la SG se incluyeron las siguientes variables: miR-19b-1, miR-339, miR-188 y la firma de miARNs. Los resultados obtenidos para este análisis multivariante indicaron que la afectación ganglionar fue identificado como un biomarcador independiente pero solo para SLE [HR: 2,556 [1,150-5,680];  $p = 0,021$ ] en este subgrupo histológico (Tabla 32). Por otra parte, el miR-19b-1 se identificó como un marcador independiente para este grupo de pacientes solo para la SG [HR: 2,499 [1,003-6,224];  $p = 0,049$ , Tabla 32). Como hemos dicho anteriormente se había descrito su relación con el pronóstico en pacientes con

CPNM, pero no su valor como biomarcador independiente, pero esta asociación no ha sido descrita hasta la fecha para el subgrupo de pacientes con ADC.

Por último y como era esperable, la firma de miARNs: miR-188alto y miR-339alto también se identificó como un marcador pronóstico independiente tanto en SLE [HR: 3,335 [1,620-6,869]; p= 0,001] como en SG (HR: 3,583 [1,532-8,382]; p= 0,003, Tabla 32), siendo la primera vez que se describe esta asociación en ADC. Por tanto esta firma independientemente de otras variables pronósticas es capaz de diferenciar dos grupos de pacientes dentro del subgrupo de ADC con claras diferencias en el pronóstico, donde el grupo de pacientes con elevados niveles de expresión de ambos miARNs presenta una peor supervivencia respecto al otro grupo de pacientes.

**Tabla 32. Resultados del modelo de regresión de Cox multivariante que incluye todas las variables significativas para el subgrupo ADC.**

| Variables                    | SLE   |             |         | SG    |             |         |
|------------------------------|-------|-------------|---------|-------|-------------|---------|
|                              | HR    | IC 95%      | p-valor | HR    | IC 95%      | p-valor |
| <b>Afectación ganglionar</b> |       |             |         |       |             |         |
| <i>Si vs. No</i>             | 2,556 | 1,150-5,680 | 0,021   | --    | --          | --      |
| <b>miR-19b-1</b>             |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Bajo</i>         | --    | --          | --      | 2,499 | 1,003-6,224 | 0,049   |
| <b>Firma miARNs</b>          |       |             |         |       |             |         |
| <i>Alto vs. Otros</i>        | 3,335 | 1,620-6.869 | 0,001   | 3,583 | 1,532-8.382 | 0,003   |

HR, hazard ratio; IC, intervalo de confianza; SG, supervivencia global; SLE, supervivencia libre de enfermedad.

#### 4. VALIDACIÓN *IN SILICO* DE LA FIRMA PRONÓSTICA DE CPNM

Por último, se llevó a cabo una validación *in silico* de los resultados obtenidos, usando los datos disponibles del TCGA (The Cancer Genome Atlas, <https://cancergenome.nih.gov/>) para pacientes con SCC y ADC, obtenidos por secuenciación masiva. Para dicho estudio se seleccionaron aquellos pacientes de etnia caucásica y con estadios resecables (I-IIIa) con la finalidad de tener una población lo más similar posible a la de nuestro estudio. Las características clinicopatológicas de la cohorte seleccionada del TCGA se muestran en la Tabla 33.

Tabla 33. Características clinicopatológicas del grupo de validación *in silico*.

| Características                     | N   | %       |
|-------------------------------------|-----|---------|
| Edad a la cirugía (mediana, rango): | 68  | [38-88] |
| <b>Género</b>                       |     |         |
| Hombre                              | 352 | 56.9    |
| Mujer                               | 266 | 43.1    |
| <b>Estadio</b>                      |     |         |
| I                                   | 350 | 56.6    |
| II                                  | 178 | 28.8    |
| IIIA                                | 90  | 14.6    |
| <b>Histología</b>                   |     |         |
| SCC                                 | 279 | 45.1    |
| ADC                                 | 339 | 54.9    |
| <b>Recaída</b>                      |     |         |
| No                                  | 373 | 60.4    |
| Si                                  | 33  | 5.3     |
| NE                                  | 212 | 34.3    |
| <b>Muerte</b>                       |     |         |
| No                                  | 462 | 74.8    |
| Si                                  | 156 | 25.2    |

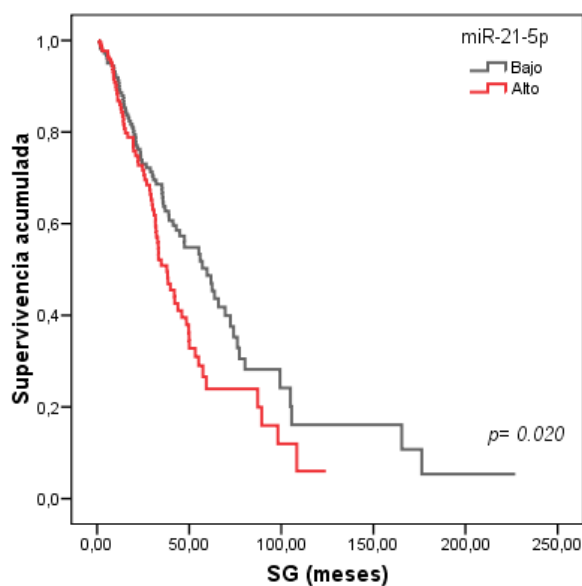
NE, no especificado.

Para evaluar si el miR-21 y el miR-188 estaban sobreexpresados en estas muestras se realizaron dos tipos de análisis estadísticos, el pareado (P1), dónde solo se usaron aquellos casos que tenían muestras pareadas tumor-normal, (N= 71) y el no pareado (P2), donde se compararon todas las muestras tumorales (N= 618) con todas las muestras normales (N= 71), en ambos casos se usó la prueba t. Para ello los valores de RPKM (número de lecturas por kilobase por millón) de cada miARN para cada paciente fueron sometidos a una transformación logarítmica. Ambos test confirmaron que tanto el miR-21 como el miR-188, estaban significativamente sobreexpresados en tumor ( $p < 0,0001$  en ambos casos).

En el análisis de supervivencia, usamos los valores de expresión dicotomizados por la mediana de esta cohorte, categorizándolos en altos ( $>$  mediana) y bajos ( $\leq$  mediana) para hacer el mismo tratamiento a los datos que hicimos en el presente estudio. Los pacientes con complicaciones postquirúrgicas se excluyeron de este análisis, y solo aquellos pacientes que tenían más de un mes de seguimiento fueron incluidos (N= 496). El grupo de pacientes con baja expresión del miR-21 presentó mejor SG (37,86 vs 59,66 meses,  $p = 0,020$ ; Figura 42). Sin embargo, no se pudo confirmar el valor pronóstico de miR-188 en este grupo de pacientes del TCGA. Este hecho puede ser explicado por: i) razones técnicas: análisis con muestras pareadas tumor/normal, NGS

vs RTqPCR y ii) razones biológicas: abundancia de miARNs. Los datos de expresión de los pacientes de nuestra cohorte se analizaron por RTqPCR mientras que los de la cohorte de validación del TCGA se analizaron por secuenciación masiva. La diferente sensibilidad entre las dos técnicas podría explicar en parte, los diferentes resultados. Por otra parte, la diferente forma de calcular la expresión relativa podría también influir en los resultados. En el grupo de validación, la expresión relativa de los miARNs se calculó como el número de veces que un miARN está más o menos expresado en tumor comparado con su tejido normal pareado para cada muestra (*Fold-change*) mientras que la expresión relativa del grupo de validación *in silico* del TCGA se calculó por RPKMs. A pesar de que en los últimos años han mejorado las técnicas para estudiar perfiles de miARNs, aún hay diferencias en el rendimiento y sesgos específicos de cada plataforma que pueden influir en la generación y análisis de los datos (Pritchard et al., 2012; Usó et al., 2014).

Finalmente, los niveles de expresión del miR-21 son altos tanto en muestras tumorales como en normales, debido a la expresión constitutiva de este miARN, aunque está frecuentemente sobreexpresado en tumores sólidos. De esta manera, el rango entre valores altos y bajos de RPKM es ancho, así cuando se realiza la dicotomización de los valores, pacientes con valores por encima y por debajo de la mediana se definen claramente y el análisis de supervivencia muestra de manera patente dos grupos de pacientes con un pronóstico diferente. Por el contrario, los niveles de expresión del miR-188 son muy bajos tanto en las muestras tumorales como en tejido normal. En consecuencia, los rangos entre los valores normalizados son estrechos, de esta manera cuando se realiza la dicotomización, los pacientes con valores por encima y por debajo de la mediana no se definen con tanta claridad y por tanto las diferencias encontradas en los análisis de supervivencia no fueron significativas. Esto podría explicar por qué el miR-188 no tiene valor pronóstico en la cohorte del TCGA.



**Figura 42. Curvas de Kaplan-Meier para SG para miR-21 en el grupo de validación *in silico* del TCGA.** Los niveles de expresión del miARN se dicotomizaron con respecto a la mediana. La línea gris representa los pacientes niveles de expresión bajos, mientras que la línea roja representa los pacientes con niveles altos. P-valor obtenido por test Log-rango.

## 5. INTEGRACIÓN DE RESULTADOS

El descubrimiento de los miARNs ha marcado un antes y un después en el entendimiento de la regulación génica, ya que son reguladores clave postranscripcionales de la expresión génica, y por este motivo están implicados en procesos esenciales de la célula como, el desarrollo, la diferenciación, la proliferación, y la apoptosis entre otros. La desregulación de estos pequeños ARNs es un hecho probado en los procesos neoplásicos en general y en el cáncer de pulmón en particular.

Pese a los avances realizados en el campo de la oncología, el cáncer de pulmón es aún el tumor que más mortalidad alberga y que a diferencia de lo que ocurre en otros tumores sólidos, presenta unas cifras elevadas de recidiva, incluso en pacientes en estadios tempranos. Este hecho hace necesaria la búsqueda de nuevos biomarcadores pronósticos que permitan seleccionar a aquellos pacientes, que pese a encontrarse en estadios iniciales y haberse sometido a una resección quirúrgica completa, presentarán un peor curso clínico de su enfermedad con recidivas precoces y/o mayor riesgo de muerte. De esta manera, la identificación de grupos de pacientes con un mal pronóstico podría ayudar a abordar la enfermedad con nuevas estrategias de

tratamiento y mejorar la supervivencia de los mismos.

En este trabajo se estudió el perfil de miARNs en una cohorte de prueba de paciente con CPNM en estadios resecables, para seleccionar aquellos miARNs desregulados y validarlos posteriormente en una cohorte más amplia. Después se analizó la asociación de estos miARNs con las variables clínico-patológicas, y por último se evaluó su utilidad como biomarcadores pronósticos en esta patología.

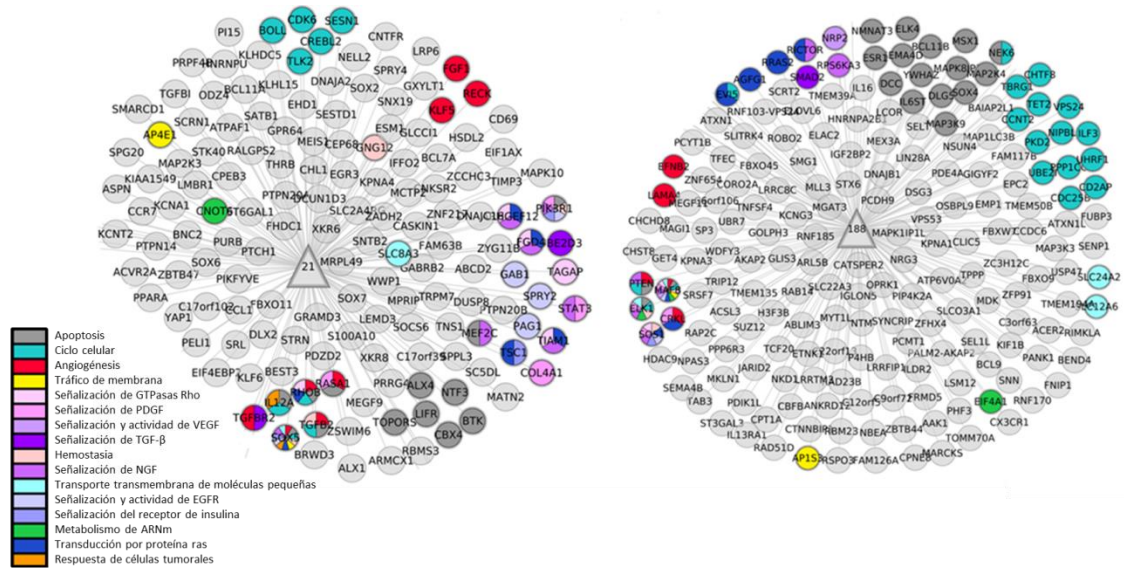
El estudio del miARNoma fue llevado a cabo mediante secuenciación masiva, en muestras frescas congeladas pareadas (tumor-normal) de pacientes con CPNM en estadios resecables. Nuestros resultados mostraron que había 39 miARNs diferencialmente expresados entre muestras tumorales y normales, donde 28 estaban sobreexpresados y 11 infraexpresados en tumor.

Posteriormente, 22 de estos miARNs fueron validados mediante RTqPCR en base a su número de lecturas obtenidas en la secuenciación, siendo el valor medio de lecturas >150 para ser validado. Los resultados fueron concordantes con los obtenidos por secuenciación, menos para el miR-125a, que no se validó por RTqPCR. Con estos resultados podemos afirmar que la secuenciación masiva es una técnica óptima para este tipo de estudio, ya que nos permite saber con exactitud el número de copias que tiene cada muestra de un miARN determinado, además de tener datos de todo el miARNoma, no solo de un panel de miARNs.

Por otra parte, los análisis de supervivencia pusieron de manifiesto la relevancia de dos miARNs, el miR-21 y el miR-188, en el pronóstico de los pacientes con CPNM resecable. Los hallazgos de este estudio sugieren que la sobreexpresión de miR-21 lleva a la inhibición de varios supresores de tumores involucrados en crecimiento celular y apoptosis como *PTEN*, *TP53* (proteína tumoral p53), *BCL2* (linfoma 2 de célula B) y *PDCD4* (muerte celular programada 4), al igual que el miR-188, que aun siendo un miARN poco descrito en cáncer, su sobreexpresión podría inhibir varios supresores de tumores relacionados con ciclo celular y apoptosis como *PPPAC2* (subunidad catalítica alfa de la proteína fosfatasa 2) y *MDC1* (mediador de la proteína 1 del punto de control de daño del ADN) (Bennin et al., 2002; Nakanishi et al., 2007). Esta inhibición en genes supresores de tumores fundamentales para el correcto funcionamiento de la maquinaria celular podría llevar a una mayor desregulación en los procesos esenciales

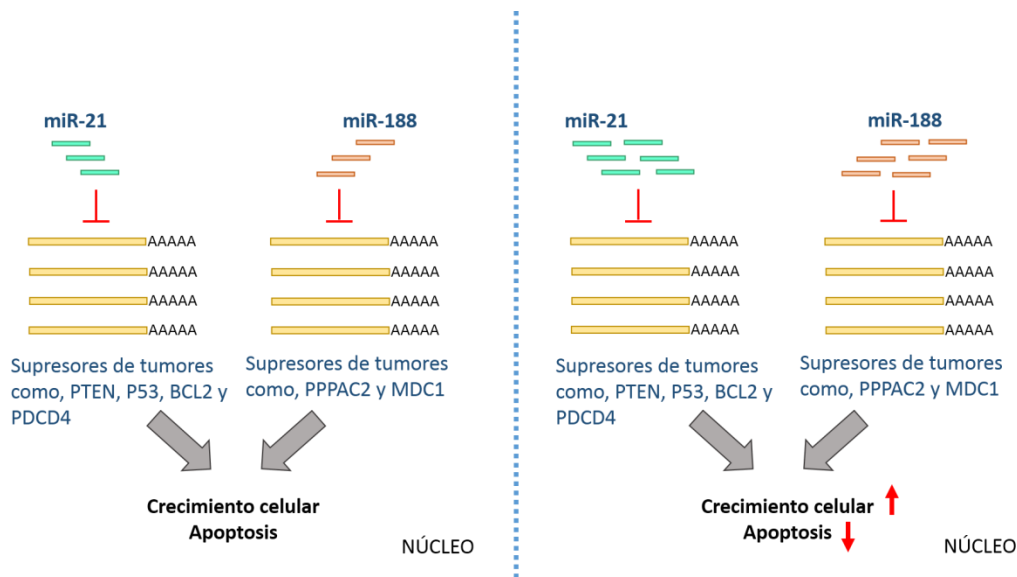


de la célula, tal y como se muestra en la Figura 43, que podría desembocar en un crecimiento más rápido del tumor y en última instancia en la formación de tumores más agresivos y por consiguiente con un peor pronóstico. Sin embargo, es cierto que esta hipótesis sobre el funcionamiento de ambos miARNs necesitaría ser estudiada con más detalle mediante análisis funcionales de pérdida y ganancia de función de los miARNs.



**Figura 43. Genes diana de miR-21 y miR-188.** Se obtuvo mediante análisis de enriquecimiento de genes para los dos miARNs. Los diferentes colores indican los procesos biológicos en los que estos genes están implicados.

Con el objetivo de lograr una mejor estratificación de los pacientes con CPNM en estadios iniciales, creamos una firma en la que unimos los efectos de los dos miARNs (Figura 44), que permitió de manera significativa diferenciar un grupo de pacientes con miR-21<sup>alto</sup>-miR-188<sup>alto</sup> que presentaban un peor pronóstico con una mayor significación estadística que el análisis de los marcadores de forma individual, siendo además un factor pronóstico independiente. La validación usando una cohorte *in silico* permitió corroborar el valor pronóstico de miR-21, pero no de la firma miR-21/miR-188, por lo que cohortes adicionales que contengan muestras pareadas tumor/normal deberían ser analizadas.



**Figura 44. Representación esquemática del posible papel de miR-21 y miR-188 en CPNM.** A la derecha se muestra la situación que determinaría el peor pronóstico para los pacientes en estadios resecables, donde los niveles de expresión de ambos miARNs se encuentran elevados. Las líneas pequeñas son una representación cuantitativa para representar los niveles de expresión.

Como se ha mencionado anteriormente, el sistema de estadificación actual basado en las características tumorales falla en la selección de pacientes con mayor riesgo de recurrencia o muerte tras la cirugía, sobre todo en los estadios iniciales de la enfermedad. La utilidad de nuestra firma de miARNs radica en su capacidad de caracterizar mejor a los pacientes en estadios tempranos. Además, al dividirlos en los dos grupos con pronóstico significativamente diferente, se podrían identificar aquellos candidatos a recibir tratamiento después de la cirugía, independientemente del estadio. Otro aspecto a favor del empleo de esta firma pronóstica como herramienta para la práctica clínica, es que en muchos aspectos reúne los criterios de un buen biomarcador, ya que el procedimiento analítico requiere poca muestra, se puede establecer como un método rutinario y automatizado de análisis que consume poco tiempo, es barato, altamente reproducible y no subjetivo.



## **V. CONCLUSIONES**



1. La secuenciación masiva multiplexada es una técnica robusta y válida para el análisis del miARNoma en CPNM, que ha permitido detectar y cuantificar los miARNs presentes en cada muestra tanto en tejido tumoral como en tejido pulmonar normal.
2. El uso de herramientas bioinformáticas permitió un análisis de los datos de secuenciación robustos, encontrándose un grupo de miARNs desregulados en las muestras tumorales cuando se compararon con el tejido normal adyacente (muestras pareadas).
3. Mediante RTqPCR, una técnica de uso común en los laboratorios de biología molecular y usando una cohorte independiente de pacientes, se pudieron validar los resultados obtenidos en el grupo de prueba.
4. Los análisis de correlación revelaron asociaciones entre los miARNs estudiados y características clínico-patológicas como estadio (miR-31), histología (miR-196b, -135b, -224, -188), estado mutacional de *KRAS* (miR-196b), afectación ganglionar (miR-21), tamaño tumoral (miR-29, -590, -19b) o hábito tabáquico (miR-135b, -126, -125a).
5. Altos niveles de miR-21 y miR-188 se asociaron significativamente con una peor SLE y con una SG más reducida, estando estos miARNs relacionados con la regulación de procesos tales como apoptosis, ciclo celular o angiogénesis, entre otros.
6. La firma de miARNs compuesta por miR-21 y miR-188 (miR-21<sup>alto</sup>-miR-188<sup>alto</sup>) definió un grupo de pacientes con peor curso clínico de la enfermedad y con valor como biomarcador de pronóstico independiente.
7. El análisis de validación *in silico*, demostró el valor pronóstico de miR-21, pero no el de la firma, aunque se encontró una mayor expresión del miR-188 en las muestras tumorales, hecho que indicaría la implicación de este miARN en el proceso de carcinogénesis del CPNM.



## **VI. BIBLIOGRAFÍA**





- Adamopoulos, P.G.,Kontos, C.K.,Rapti, S.-M., Papadopoulos, I.N. and Scorilas, A. (2015). miR-224 overexpression is a strong and independent prognosticator of short-term relapse and poor overall survival in colorectal adenocarcinoma. *International journal of oncology*, 46(2), pp.849–859.
- Ambros, V. et al. (2003). A uniform system for microRNA annotation. *RNA.*, 9(3), pp.277–279.
- Ambros, V. (2003). MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell*, 113(6), pp.673–676.
- Ameres, S.L.,Martinez, J. and Schroeder, R. (2007). Molecular basis for target RNA recognition and cleavage by human RISC. *Cell*, 130(1), pp.101–112.
- An, F.,Olaru, A. V,Mezey, E.,Xie, Q.,Li, L.,Piontek, K.B. and Selaru, F.M. (2015). MicroRNA-224 Induces G1/S Checkpoint Release in Liver Cancer. *Journal of clinical medicine*, 4(9), pp.1713–1728.
- Armstrong, D.A., Green, B.B., Seigne, J.D., Schned, A.R. and Marsit, C.J. (2015). MicroRNA molecular profiling from matched tumor and bio-fluids in bladder cancer. *Molecular cancer*, 14, p.194.
- Ashburner, M. et al. (2000). Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nature genetics*, 25(1), pp.25–29.
- Avgeris, M., Mavridis, K., Tokas, T., Stravodimos, K., Fragoulis, E.G. and Scorilas, A. (2015). Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment. *Carcinogenesis*, 36(5), pp.528–537.
- Azizian, A. et al. (2016). Prognostic Value of MicroRNAs in Preoperative Treated Rectal Cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(4), p.568.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P. and Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & development*, 22(20), pp.2773–2785.
- Baraniskin, A. et al. (2012). MiR-30a-5p suppresses tumor growth in colon carcinoma by targeting DTL. *Carcinogenesis*, 33(4), pp.732–739.
- Bartel, D.P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2), pp.281–297.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136(2), pp.215–233.
- Baskerville, S. and Bartel, D.P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(3), pp.241–247.
- Basyuk, E., Suavet, F., Doglio, A., Bordonne, R. and Bertrand, E. (2003). Human let-7 stem-loop precursors harbor features of RNase III cleavage products. *Nucleic acids research*, 31(22), pp.6593–6597.
- Bediaga, N.G. et al. (2013). A microRNA-based prediction algorithm for diagnosis of non-small lung cell carcinoma in minimal biopsy material. *British journal of cancer*,

109(9), pp.2404–2411.

Benes, V. and Castoldi, M. (2010). Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods (San Diego, Calif.)*, 50(4), pp.244–249.

Benjamini, Y. and Yekutieli, D. (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *The Annals of Statistics*, 29(4), pp.1165–1188.

Bennin, D.A., Don, A.S.A., Brake, T., McKenzie, J.L., Rosenbaum, H., Ortiz, L., DePaoli-Roach, A.A. and Horne, M.C. (2002). Cyclin G2 associates with protein phosphatase 2A catalytic and regulatory B' subunits in active complexes and induces nuclear aberrations and a G1/S phase cell cycle arrest. *The Journal of biological chemistry*, 277(30), pp.27449–27467.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409(6818), pp.363–366.

Bilello, K.S., Murin, S. and Matthay, R.A. (2002). Epidemiology, etiology, and prevention of lung cancer. *Clin.Chest Med.*, 23(1), pp.1–25.

Boeri, M. et al. (2011). MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 108(9), pp.3713–3718.

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K. and Gorlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(2), pp.185–191.

Borghaei, H. et al. (2015). Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England journal of medicine*, 373(17), pp.1627–39.

Bosetti, C., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Levi, F., Chatenoud, L., Negri, E. and La Vecchia, C. (2013). Cancer mortality in Europe, 2005–2009, and an overview of trends since 1980. *Annals of Oncology*, 24(10), pp.2657–2671.

Brahmer, J.R. et al. (2012). Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer. *The New England journal of medicine*, 366(26), pp.2455–65.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B. and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS biology*, 3(3), p.e85.

Budd, W.T., Seashols-Williams, S.J., Clark, G.C., Weaver, D., Calvert, V., Petricoin, E., Dragoescu, E.A., O'Hanlon, K. and Zehner, Z.E. (2015). Dual Action of miR-125b As a Tumor Suppressor and OncomiR-22 Promotes Prostate Cancer Tumorigenesis. *PLoS one*, 10(11), p.e0142373.

Bufalino, A. et al. (2015). Low miR-143/miR-145 Cluster Levels Induce Activin A Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas, Which Contributes to Poor Prognosis. *PLoS one*, 10(8), p.e0136599.

Buitrago, D.H., Patnaik, S.K., Kadota, K., Kannisto, E., Jones, D.R. and Adusumilli, P.S. (2015). Small RNA sequencing for profiling microRNAs in long-term preserved formalin-fixed and paraffin-embedded non-small cell lung cancer tumor specimens. *PLoS one*,

10(3), p.e0121521.

Cai, X., Hagedorn, C.H. and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*, 10(12), pp.1957–1966.

Caiment, F., Gaj, S., Claessen, S. and Kleinjans, J. (2015). High-throughput data integration of RNA-miRNA-circRNA reveals novel insights into mechanisms of benzo[a]pyrene-induced carcinogenicity. *Nucleic acids research*, 43(5), pp.2525–2534.

Calin, G.A. et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(24), pp.15524–15529.

Calin, G.A. et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 101(9), pp.2999–3004.

Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews. Cancer*, 6(11), pp.857–866.

Campayo, M. et al. (2013). Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavourable prognosis in resected nonsmall cell lung cancer. *The European respiratory journal*, 41(5), pp.1172–1178.

Camps, C. et al. (2011). The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer*, 72(3), pp.365–369.

Cancer Genome Atlas Research Network (2012). Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature*, 489(7417), pp.519–525.

Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 511(7511), pp.543–550.

Capodanno, A. et al. (2013). Let-7g and miR-21 expression in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathological and molecular features. *International journal of oncology*, 43(3), pp.765–774.

Casanova-Salas, I. et al. (2014). Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy. *The Journal of urology*, 192(1), pp.252–259.

Chan, B.A. and Hughes, B.G.M. (2015). Targeted therapy for non-small cell lung cancer: current standards and the promise of the future. *Translational lung cancer research*, 4(1), pp.36–54.

Chang, J.T.-H., Wang, F., Chapin, W. and Huang, R.S. (2016). Identification of MicroRNAs as Breast Cancer Prognosis Markers through the Cancer Genome Atlas. *PloS one*, 11(12), p.e0168284.

Chang, T.-C., Yu, D., Lee, Y.-S., Wentzel, E.A., Arking, D.E., West, K.M., Dang, C. V, Thomas-Tikhonenko, A. and Mendell, J.T. (2008). Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nature genetics*, 40(1), pp.43–50.

- Chen, G. et al. (2013). miR-146a inhibits cell growth, cell migration and induces apoptosis in non-small cell lung cancer cells. *PloS one*, 8(3), p.e60317.
- Chen, S.-W., Wang, T.-B., Tian, Y.-H. and Zheng, Y.-G. (2015). Down-regulation of microRNA-126 and microRNA-133b acts as novel predictor biomarkers in progression and metastasis of non small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), pp.14983–14988.
- Chen, X. et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.*, 18(10), pp.997–1006.
- Chen, X., Dong, C., Law, P.T.Y., Chan, M.T. V, Su, Z., Wang, S., Wu, W.K.K. and Xu, H. (2015). MicroRNA-145 targets TRIM2 and exerts tumor-suppressing functions in epithelial ovarian cancer. *Gynecologic oncology*, 139(3), pp.513–519.
- Chen, X., Shi, K., Wang, Y., Song, M., Zhou, W., Tu, H. and Lin, Z. (2015). Clinical value of integrated-signature miRNAs in colorectal cancer: miRNA expression profiling analysis and experimental validation. *Oncotarget*, 6(35), pp.37544–37556.
- Chen, Z., Liu, H., Jin, W., Ding, Z., Zheng, S. and Yu, Y. (2016). Tissue microRNA-21 expression predicted recurrence and poor survival in patients with colorectal cancer - a meta-analysis. *OncoTargets and therapy*, 9, pp.2615–2624.
- Chen, Z., Wu, Y., Meng, Q. and Xia, Z. (2016). Elevated microRNA-25 inhibits cell apoptosis in lung cancer by targeting RGS3. *In vitro cellular & developmental biology. Animal*, 52(1), pp.62–67.
- Chen, Z., Zeng, H., Guo, Y., Liu, P., Pan, H., Deng, A. and Hu, J. (2010). miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 29, p.151.
- Cheng, M.-W., Wang, L.-L. and Hu, G.-Y. (2015). Expression of microRNA-218 and its clinicopathological and prognostic significance in human glioma cases. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*, 16(5), pp.1839–1843.
- Cho, W.C.S., Chow, A.S.C. and Au, J.S.K. (2009). Restoration of tumour suppressor hsa-miR-145 inhibits cancer cell growth in lung adenocarcinoma patients with epidermal growth factor receptor mutation. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 45(12), pp.2197–2206.
- Choi, Y.L. et al. (2010). EML4-ALK mutations in lung cancer that confer resistance to ALK inhibitors. *The New England journal of medicine*, 363(18), pp.1734–1739.
- Chou, C.-H. et al. (2016). miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic acids research*, 44(D1), pp.D239-47.
- Chu, Y., Ouyang, Y., Wang, F., Zheng, A., Bai, L., Han, L., Chen, Y. and Wang, H. (2014). MicroRNA-590 promotes cervical cancer cell growth and invasion by targeting CHL1. *Journal of cellular biochemistry*, 115(5), pp.847–853.
- Chung, W.-J., Agius, P., Westholm, J.O., Chen, M., Okamura, K., Robine, N., Leslie, C.S. and Lai, E.C. (2011). Computational and experimental identification of mirtrons in *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans*. *Genome research*, 21(2), pp.286–300.
- Cinegaglia, N.C. et al. (2016). Integrative transcriptome analysis identifies deregulated

- microRNA-transcription factor networks in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 7(20), pp.28920–28934.
- Corcoran, D.L., Pandit, K. V, Gordon, B., Bhattacharjee, A., Kaminski, N. and Benos, P. V (2009). Features of mammalian microRNA promoters emerge from polymerase II chromatin immunoprecipitation data. *PLoS one*, 4(4), p.e5279.
- Crawford, M., Brawner, E., Batte, K., Yu, L., Hunter, M.G., Otterson, G.A., Nuovo, G., Marsh, C.B. and Nana-Sinkam, S.P. (2008). MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochemical and biophysical research communications*, 373(4), pp.607–612.
- Creighton, C.J. et al. (2010). Molecular profiling uncovers a p53-associated role for microRNA-31 in inhibiting the proliferation of serous ovarian carcinomas and other cancers. *Cancer research*, 70(5), pp.1906–1915.
- Croce, C.M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature reviews. Genetics*, 10(10), pp.704–714.
- Croce, C.M. (2008). Oncogenes and cancer. *The New England journal of medicine*, 358(5), pp.502–511.
- Cuaron, J., Dunphy, M. and Rimner, A. (2012). Role of FDG-PET scans in staging, response assessment, and follow-up care for non-small cell lung cancer. *Frontiers in oncology*, 2, p.208.
- Cui, R., Kim, T., et al. (2015). MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7. *Oncotarget*, 6(26), pp.21802–21815.
- Cui, R., Meng, W., et al. (2015). MicroRNA-224 promotes tumor progression in nonsmall cell lung cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(31), pp.E4288-97.
- Davis-Dusenbery, B.N. and Hata, A. (2010a). Mechanisms of control of microRNA biogenesis. *Journal of biochemistry*, 148(4), pp.381–392.
- Davis-Dusenbery, B.N. and Hata, A. (2010b). MicroRNA in Cancer: The Involvement of Aberrant MicroRNA Biogenesis Regulatory Pathways. *Genes & cancer*, 1(11), pp.1100–1114.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F. and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432(7014), pp.231–235.
- Dews, M. et al. (2006). Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nature genetics*, 38(9), pp.1060–1065.
- Ding, W., Tan, H., Zhao, C., Li, X., Li, Z., Jiang, C., Zhang, Y. and Wang, L. (2016). MiR-145 suppresses cell proliferation and motility by inhibiting ROCK1 in hepatocellular carcinoma. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(5), pp.6255–6260.
- Doll, R., Peto, R., Boreham, J. and Sutherland, I. (2004). Mortality in relation to smoking: 50 years' observations on male British doctors. *BMJ (Clinical research ed.)*, 328(7455), p.1519.

- Donnem, T. et al. (2012). MicroRNA signatures in tumor tissue related to angiogenesis in non-small cell lung cancer. *PLoS one*, 7(1), p.e29671.
- Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(1), pp.11–22.
- Drilon, A., Rekhtman, N., Ladanyi, M. and Paik, P. (2012). Squamous-cell carcinomas of the lung: emerging biology, controversies, and the promise of targeted therapy. *The Lancet. Oncology*, 13(10), pp.e418-26.
- Duan, X., Hu, J., Wang, Y., Gao, J., Peng, D. and Xia, L. (2014). MicroRNA-145: a promising biomarker for hepatocellular carcinoma (HCC). *Gene*, 541(1), pp.67–68.
- Dwivedi, Y., Roy, B., Lugli, G., Rizavi, H., Zhang, H. and Smalheiser, N.R. (2015). Chronic corticosterone-mediated dysregulation of microRNA network in prefrontal cortex of rats: relevance to depression pathophysiology. *Translational psychiatry*, 5, p.e682.
- Ebbert, J.O., Yang, P., Vachon, C.M., Vierkant, R.A., Cerhan, J.R., Folsom, A.R. and Sellers, T.A. (2003). Lung cancer risk reduction after smoking cessation: observations from a prospective cohort of women. *J.Clin.Oncol.*, 21(5), pp.921–926.
- Edmonds, M.D. et al. (2016). MicroRNA-31 initiates lung tumorigenesis and promotes mutant KRAS-driven lung cancer. *The Journal of clinical investigation*, 126(1), pp.349–364.
- Egeland, N.G., Lunde, S., Jonsdottir, K., Lende, T.H., Cronin-Fenton, D., Gilje, B., Janssen, E.A.M. and Soiland, H. (2015). The Role of MicroRNAs as Predictors of Response to Tamoxifen Treatment in Breast Cancer Patients. *International journal of molecular sciences*, 16(10), pp.24243–24275.
- Ender, C., Krek, A., Friedlander, M.R., Beitzinger, M., Weinmann, L., Chen, W., Pfeffer, S., Rajewsky, N. and Meister, G. (2008). A human snoRNA with microRNA-like functions. *Molecular cell*, 32(4), pp.519–528.
- Esquela-Kerscher, A. and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 6(4), pp.259–269.
- Fabian, M.R., Sundermeier, T.R. and Sonenberg, N. (2010). Understanding how miRNAs post-transcriptionally regulate gene expression. *Progress in molecular and subcellular biology*, 50, pp.1–20.
- Fan, W., Huang, J., Xiao, H. and Liang, Z. (2016). MicroRNA-22 is downregulated in clear cell renal cell carcinoma, and inhibits cell growth, migration and invasion by targeting PTEN. *Molecular medicine reports*, 13(6), pp.4800–4806.
- Fan, Y., Yin, S., Hao, Y., Yang, J., Zhang, H., Sun, C., Ma, M., Chang, Q. and Xi, J.J. (2014). miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *RNA (New York, N.Y.)*, 20(6), pp.765–772.
- Fang, F., Chang, R., Yu, L., Lei, X., Xiao, S., Yang, H. and Yang, L.-Y. (2015). MicroRNA-188-5p suppresses tumor cell proliferation and metastasis by directly targeting FGF5 in hepatocellular carcinoma. *Journal of hepatology*, 63(4), pp.874–885.
- Farazi, T.A. et al. (2011). MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer research*, 71(13), pp.4443–4453.

- Felip, E. et al. (2010). Preoperative chemotherapy plus surgery versus surgery plus adjuvant chemotherapy versus surgery alone in early-stage non-small-cell lung cancer. *Journal of clinical oncology: official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 28(19), pp.3138–3145.
- Feng, S., Pan, W., Jin, Y. and Zheng, J. (2014). MiR-25 promotes ovarian cancer proliferation and motility by targeting LATS2. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(12), pp.12339–12344.
- Ferlay, J., Soerjomataram I, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman D, D. and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int.J.Cancer*, 136(5), pp.E359-86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25220842> [Accessed September 25, 2014].
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D. and Bray, F. (2013). Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(6), pp.1374–1403.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N. and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nature reviews. Genetics*, 9(2), pp.102–114.
- Folkman, J. (2003). Fundamental concepts of the angiogenic process. *Curr.Mol.Med.*, 3(7), pp.643–651.
- Foss, K.M., Sima, C., Ugolini, D., Neri, M., Allen, K.E. and Weiss, G.J. (2011). miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J.Thorac.Oncol.*, 6(3), pp.482–488.
- Franchina, T., Amodeo, V., Bronte, G., Savio, G., Ricciardi, G.R.R., Picciotto, M., Russo, A., Giordano, A. and Adamo, V. (2014). Circulating miR-22, miR-24 and miR-34a as novel predictive biomarkers to pemetrexed-based chemotherapy in advanced non-small cell lung cancer. *Journal of cellular physiology*, 229(1), pp.97–99.
- Fraumeni, J.F.J. (1982). Epidemiologic approaches to cancer etiology. *Annual review of public health*, 3, pp.85–100.
- Freedman, N.D., Leitzmann, M.F., Hollenbeck, A.R., Schatzkin, A. and Abnet, C.C. (2008). Cigarette smoking and subsequent risk of lung cancer in men and women: analysis of a prospective cohort study. *Lancet Oncol.*, 9(7), pp.649–656.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome research*, 19(1), pp.92–105.
- Fu, J. et al. (2014). miR-30a suppresses breast cancer cell proliferation and migration by targeting Eya2. *Biochemical and biophysical research communications*, 445(2), pp.314–319.
- Fu, X. et al. (2011). Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *European journal of clinical investigation*, 41(11), pp.1245–1253.



- Gallach, S. et al. (2013). KRAS mutations in resectable NSCLC patients. Prognostic implications. *Journal of thoracic oncology*, 8(2), p.s489.
- Gallardo, E. et al. (2009). miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis*, 30(11), pp.1903–1909.
- Gao, F., Wang, T., Zhang, Z., Wang, R., Guo, Y. and Liu, J. (2015). Regulation of activating protein-4-associated metastases of non-small cell lung cancer cells by miR-144. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*.
- Gao, W., Liu, L., Xu, J., Shao, Q., Liu, Y., Zeng, H. and Shu, Y. (2014). A systematic analysis of predicted MiR-31-targets identifies a diagnostic and prognostic signature for lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 68(4), pp.419–427.
- Gao, W., Yu, Y., Cao, H., Shen, H., Li, X., Pan, S. and Shu, Y. (2010). Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 64(6), pp.399–408.
- Garcia-Garcia, F., Panadero, J., Dopazo, J. and Montaner, D. (2016). Integrated gene set analysis for microRNA studies. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(18), pp.2809–2816.
- Garofalo, M. et al. (2009). miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer cell*, 16(6), pp.498–509.
- Garzon, R., Calin, G.A. and Croce, C.M. (2009). MicroRNAs in Cancer. *Annual review of medicine*, 60, pp.167–179.
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol.Med.*, 12(12), pp.580–587.
- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nature reviews. Genetics*, 10(2), pp.94–108.
- Goldstraw, P. et al. (2015). The IASLC Lung Cancer Staging Project: Proposals for Revision of the TNM Stage Groupings in the Forthcoming (Eighth) Edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *JTHO*, 11, pp.39–51.
- Goldstraw, P., Ball, D., Jett, J.R., Le Chevalier, T., Lim, E., Nicholson, A.G. and Shepherd, F.A. (2011). Non-small-cell lung cancer. *Lancet (London, England)*, 378(9804), pp.1727–1740.
- Gong, J., Cui, Z., Li, L., Ma, Q., Wang, Q., Gao, Y. and Sun, H. (2015). MicroRNA-25 promotes gastric cancer proliferation, invasion, and migration by directly targeting F-box and WD-40 Domain Protein 7, FBXW7. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(10), pp.7831–7840.
- Gorlova, O.Y., Zhang, Y., Schabath, M.B., Lei, L., Zhang, Q., Amos, C.I. and Spitz, M.R. (2006). Never smokers and lung cancer risk: a case-control study of epidemiological factors. *Int.J.Cancer*, 118(7), pp.1798–1804.
- Graziano, S.L. et al. (2010). Prognostic significance of mucin and p53 expression in

- stage IB non-small cell lung cancer: a laboratory companion study to CALGB 9633. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 5(6), pp.810–817.
- Greenberg, E. et al. (2011). Regulation of cancer aggressive features in melanoma cells by microRNAs. *PloS one*, 6(4), p.e18936.
- Gregory, R.I., Yan, K.-P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N. and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432(7014), pp.235–240.
- Griffiths-Jones, S. (2004). The microRNA Registry. *Nucleic acids research*, 32(Database issue), pp.D109-11.
- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A. and Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, 34(Database issue), pp.D140-4.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., Van Dongen, S. and Enright, A.J. (2008). miRBase: Tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(SUPPL. 1), pp.154–158.
- de Groot, P. and Munden, R.F. (2012). Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiologic Clinics of North America*, 50(5), pp.863–876.
- Guan, P., Yin, Z., Li, X., Wu, W. and Zhou, B. (2012). Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 31, p.54.
- Guo, H., Li, W., Zheng, T. and Liu, Z. (2014). MiR-195 targets HDGF to inhibit proliferation and invasion of NSCLC cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(9), pp.8861–8866.
- Guo, J., Miao, Y., Xiao, B., Huan, R., Jiang, Z., Meng, D. and Wang, Y. (2009). Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 24(4), pp.652–657.
- Guo, X., Wu, Y. and Hartley, R.S. (2009). MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA biology*, 6(5), pp.575–583.
- van Haften, G. and Agami, R. (2010). Tumorigenicity of the miR-17-92 cluster distilled. *Genes & development*, 24(1), pp.1–4.
- Hahn, W.C. and Weinberg, R.A. (2002). Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 2(5), pp.331–341.
- Hamamoto, J. et al. (2013). Identification of microRNAs differentially expressed between lung squamous cell carcinoma and lung adenocarcinoma. *Molecular medicine reports*, 8(2), pp.456–462.
- Han, G., Fan, M. and Zhang, X. (2015). microRNA-218 inhibits prostate cancer cell growth and promotes apoptosis by repressing TPD52 expression. *Biochemical and biophysical research communications*, 456(3), pp.804–809.
- Han, J. et al. (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125(5), pp.887–901.

- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H. and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & development*, 18(24), pp.3016–3027.
- Han, Y. et al. (2015). Dysregulation of miRNA-21 and their potential as biomarkers for the diagnosis of cervical cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(6), pp.7131–7139.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), pp.646–74.
- Hanahan, D. and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), pp.57–70.
- Hanniford, D. et al. (2015). Identification of metastasis-suppressive microRNAs in primary melanoma. *Journal of the National Cancer Institute*, 107(3).
- Hayashita, Y. et al. (2005). A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer research*, 65(21), pp.9628–9632.
- Hayflick, L. (1997). Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry. Biokhimiia*, 62(11), pp.1180–1190.
- He, L. et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447(7148), pp.1130–1134.
- He, L. et al. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), pp.828–833.
- He, X., Zhang, Z., Li, M., Li, S., Ren, L., Zhu, H., Xiao, B. and Shi, R. (2015). Expression and role of oncogenic miRNA-224 in esophageal squamous cell carcinoma. *BMC cancer*, 15, p.575.
- Hu, H., Xu, Z., Li, C., Xu, C., Lei, Z., Zhang, H.-T. and Zhao, J. (2016). MiR-145 and miR-203 represses TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion by inhibiting SMAD3 in non-small cell lung cancer cells. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 97, pp.87–94.
- Hu, L., Ai, J., Long, H., Liu, W., Wang, X., Zuo, Y., Li, Y., Wu, Q. and Deng, Y. (2016). Integrative microRNA and gene profiling data analysis reveals novel biomarkers and mechanisms for lung cancer. *Oncotarget*, 7(8), pp.8441–8454.
- Hu, Z. et al. (2010). Serum MicroRNA Signatures Identified in a Genome-Wide Serum MicroRNA Expression Profiling Predict Survival of Non-Small-Cell Lung Cancer. *J.Clin.Oncol*, pp.1721–6.
- Hu, Z., Cui, Y., Zhou, Y., Zhou, K., Qiao, X., Li, C. and Wang, S. (2016). MicroRNA-29a plays a suppressive role in non-small cell lung cancer cells via targeting LASP1. *OncoTargets and therapy*, 9, pp.6999–7009.
- Huang, H.-L., Zheng, W.-L., Zhao, R., Zhang, B. and Ma, W.-L. (2010). FBXO31 is down-regulated and may function as a tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. *Oncology reports*, 24(3), pp.715–720.
- Huang, J., Wu, J., Li, Y., Li, X., Yang, T., Yang, Q. and Jiang, Y. (2014). Deregulation of

- serum microRNA expression is associated with cigarette smoking and lung cancer. *BioMed research international*, 2014, p.364316.
- Huang, M.-X. (2016). Down-expression of circulating micro ribonucleic acid (miRNA)-148/152 family in plasma samples of non-small cell lung cancer patients. *Journal of cancer research and therapeutics*, 12(2), pp.671–675.
- Hubbard, R., Venn, A., Lewis, S. and Britton, J. (2000). Lung cancer and cryptogenic fibrosing alveolitis. A population-based cohort study. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 161(1), pp.5–8.
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T. and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)*, 293(5531), pp.834–838.
- Hutvagner, G. and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5589), pp.2056–2060.
- IARC (2012). IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. A review of human carcinogens: chemical agents and related occupations. , Vol. 100F, pp.225–248.
- Jantus-Lewintre, E., Uso, M., Sanmartin, E. and Camps, C. (2012). Update on biomarkers for the detection of lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy.*, 3, pp.21–29.
- Jemal, A. et al. (2008). Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2005, featuring trends in lung cancer, tobacco use, and tobacco control. *J.Natl.Cancer Inst.*, 100(23), pp.1672–1694.
- Jepsen, R.K., Novotny, G.W., Klarskov, L.L., Christensen, I.J., Hogdall, E. and Riis, L.B. (2016). Investigating intra-tumor heterogeneity and expression gradients of miR-21, miR-92a and miR-200c and their potential of predicting lymph node metastases in early colorectal cancer. *Experimental and molecular pathology*, 101(2), pp.187–196.
- Jinek, M. and Doudna, J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature*, 457(7228), pp.405–412.
- Jingushi, K. et al. (2015). miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGFbeta/Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. *Molecular cancer research : MCR*, 13(3), pp.565–574.
- Jinlong, S., Lin, F., Yonghui, L., Li, Y. and Weidong, W. (2015). Identification of let-7a-2-3p or/and miR-188-5p as prognostic biomarkers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *PLoS one*, 10(2), p.e0118099.
- Johnson, S.M. et al. (2005). RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120(5), pp.635–647.
- Joshi-Tope, G. et al. (2005). Reactome: a knowledgebase of biological pathways. *Nucleic acids research*, 33(Database issue), pp.D428-32.
- Jusufovic, E., Rijavec, M., Keser, D., Korosec, P., Sodja, E., Iljazovic, E., Radojevic, Z. and Kosnik, M. (2012). let-7b and miR-126 are down-regulated in tumor tissue and correlate with microvessel density and survival outcomes in non--small--cell lung cancer. *PLoS one*, 7(9), p.e45577.

- Kanehisa, M. and Goto, S. (2000). KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes. *Nucleic acids research*, 28(1), pp.27–30.
- Karatas, O.F., Yuceturk, B., Suer, I., Yilmaz, M., Cansiz, H., Solak, M., Ittmann, M. and Ozen, M. (2016). Role of miR-145 in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Head & neck*, 38(2), pp.260–266.
- Karnoub, A.E. and Weinberg, R.A. (2008). Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(7), pp.517–531.
- Katayama, Y. et al. (2012). Identification of pathogenesis-related microRNAs in hepatocellular carcinoma by expression profiling. *Oncology letters*, 4(4), pp.817–823.
- Katchy, A. and Williams, C. (2016). Expression Profiles of Estrogen-Regulated MicroRNAs in Breast Cancer Cells. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 1366, pp.373–393.
- Katz, B. et al. (2014). Comprehensive study of gene and microRNA expression related to epithelial-mesenchymal transition in prostate cancer. *PLoS one*, 9(11), p.e113700.
- Kawamata, T. and Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in biochemical sciences*, 35(7), pp.368–376.
- Keller, A., Leidinger, P., Borries, A., Wendschlag, A., Wucherpennig, F., Scheffler, M., Huwer, H., Lenhof, H.-P. and Meese, E. (2009). miRNAs in lung cancer - studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC cancer*, 9, p.353.
- Kiernan, E.A., Smith, S.M.C., Mitchell, G.S. and Watters, J.J. (2016). Mechanisms of microglial activation in models of inflammation and hypoxia: Implications for chronic intermittent hypoxia. *The Journal of physiology*, 594(6), pp.1563–1577.
- Kim, H.S. et al. (2015). MicroRNA-31 functions as a tumor suppressor by regulating cell cycle and epithelial-mesenchymal transition regulatory proteins in liver cancer. *Oncotarget*, 6(10), pp.8089–8102.
- Kim, Y.-K. and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO journal*, 26(3), pp.775–783.
- Kogo, R., Mimori, K., Tanaka, F., Komune, S. and Mori, M. (2011). FBXO31 determines poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *International journal of oncology*, 39(1), pp.155–159.
- Koppers-Lalic, D. et al. (2016). Noninvasive prostate cancer detection by measuring miRNA variants (isomiRs) in urine extracellular vesicles. *Oncotarget*, 7(16), pp.22566–22578.
- Kosaka, T., Yatabe, Y., Endoh, H., Kuwano, H., Takahashi, T. and Mitsudomi, T. (2004). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene in lung cancer: biological and clinical implications. *Cancer Res.*, 64(24), pp.8919–8923.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2014). MiRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), pp.D68-73.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S. (2011). miRBase: integrating microRNA annotation

- and deep-sequencing data. *Nucleic acids research*, 39(Database issue), pp.D152-7.
- Krishnan, K. et al. (2013). MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA (New York, N.Y.)*, 19(2), pp.230–242.
- Kumarswamy, R., Mudduluru, G., Ceppi, P., Muppala, S., Kozlowski, M., Niklinski, J., Papotti, M. and Allgayer, H. (2012). MicroRNA-30a inhibits epithelial-to-mesenchymal transition by targeting Snai1 and is downregulated in non-small cell lung cancer. *International Journal of Cancer*, 130(9), pp.2044–2053.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), pp.853–858.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Current biology : CB*, 12(9), pp.735–739.
- Langer, C.J., Besse, B., Gualberto, A., Brambilla, E. and Soria, J.C. (2010). The evolving role of histology in the management of advanced non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.*, 28(36), pp.5311–5320.
- Latchana, N., Ganju, A., Howard, J.H. and Carson, W.E. 3rd (2016). MicroRNA dysregulation in melanoma. *Surgical oncology*, 25(3), pp.184–189.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G. and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)*, 294(5543), pp.858–862.
- Laurila, E.M. and Kallioniemi, A. (2013). The diverse role of miR-31 in regulating cancer associated phenotypes. *Genes, chromosomes & cancer*, 52(12), pp.1103–1113.
- Lee, E.J. et al. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International journal of cancer*, 120(5), pp.1046–1054.
- Lee, R.C. and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294(5543), pp.862–864.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L. and Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), pp.843–854.
- Lee, T.S., Jeon, H.W., Kim, Y.B., Kim, Y.A., Kim, M.A. and Kang, S.B. (2013). Aberrant microRNA expression in endometrial carcinoma using formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *PloS one*, 8(12), p.e81421.
- Lee, Y. et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), pp.415–419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S. and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO journal*, 21(17), pp.4663–4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H. and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO journal*, 23(20), pp.4051–4060.
- Di Leva, G., Calin, G.A. and Croce, C.M. (2006). MicroRNAs: fundamental facts and

involvement in human diseases. *Birth defects research. Part C, Embryo today : reviews*, 78(2), pp.180–189.

Lewis, B.P., Burge, C.B. and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), pp.15–20.

Li, B. et al. (2012). Plasma microRNAs, miR-223, miR-21 and miR-218, as novel potential biomarkers for gastric cancer detection. *PloS one*, 7(7), p.e41629.

Li, B.-S., Zuo, Q.-F., et al. (2015). MicroRNA-25 promotes gastric cancer migration, invasion and proliferation by directly targeting transducer of ERBB2, 1 and correlates with poor survival. *Oncogene*, 34(20), pp.2556–2565.

Li, B.-S., Liu, H. and Yang, W.-L. (2015). Reduced miRNA-218 expression in pancreatic cancer patients as a predictor of poor prognosis. *Genetics and molecular research : GMR*, 14(4), pp.16372–16378.

Li, F.Q., Xu, B., Wu, Y.J., Yang, Z.L. and Qian, J.J. (2015). Differential microRNA expression in signet-ring cell carcinoma compared with tubular adenocarcinoma of human gastric cancer. *Genetics and molecular research : GMR*, 14(1), pp.739–747.

Li, J., Li, P., Chen, T., et al. (2015). Expression of microRNA-96 and its potential functions by targeting FOXO3 in non-small cell lung cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(2), pp.685–692.

Li, J., Yang, S., Yan, W., et al. (2015). MicroRNA-19 triggers epithelial-mesenchymal transition of lung cancer cells accompanied by growth inhibition. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 95(9), pp.1056–1070.

Li, L., Li, B., Chen, D., Liu, L., Huang, C., Lu, Z., Lun, L. and Wan, X. (2015). miR-139 and miR-200c regulate pancreatic cancer endothelial cell migration and angiogenesis. *Oncology reports*, 34(1), pp.51–58.

Li, M.-Y. and Hu, X.-X. (2015). Meta-analysis of microRNA expression profiling studies in human cervical cancer. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 32(6), p.510.

Li, T. et al. (2016). MicroRNA-224 sustains Wnt/beta-catenin signaling and promotes aggressive phenotype of colorectal cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 35, p.21.

Li, T., Kung, H.-J., Mack, P.C. and Gandara, D.R. (2013). Genotyping and genomic profiling of non-small-cell lung cancer: implications for current and future therapies. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 31(8), pp.1039–1049.

Li, W., Duan, R., Kooy, F., Sherman, S.L., Zhou, W. and Jin, P. (2009). Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *Journal of medical genetics*, 46(5), pp.358–360.

Li, X., Shi, Y., Yin, Z., Xue, X. and Zhou, B. (2014). An eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in lung adenocarcinoma. *Journal of translational medicine*, 12, p.159.

Li, X., Yang, C., Wang, X., Zhang, J., Zhang, R. and Liu, R. (2014). The expression of miR-

25 is increased in colorectal cancer and is associated with patient prognosis. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 31(1), p.781.

Li, Y., Tan, W., Neo, T.W.L., Aung, M.O., Wasser, S., Lim, S.G. and Tan, T.M.C. (2009). Role of the miR-106b-25 microRNA cluster in hepatocellular carcinoma. *Cancer science*, 100(7), pp.1234–1242.

Li, Y., Zhao, W., Bao, P., Li, C., Ma, X.Q., Li, Y. and Chen, L.A. (2014). miR-339-5p inhibits cell migration and invasion in vitro and may be associated with the tumor-node-metastasis staging and lymph node metastasis of non-small cell lung cancer. *Oncology letters*, 8(2), pp.719–725.

Li, Z.-H., Zhang, H., Yang, Z.-G., Wen, G.-Q., Cui, Y.-B. and Shao, G.-G. (2013). Prognostic significance of serum microRNA-210 levels in nonsmall-cell lung cancer. *The Journal of international medical research*, 41(5), pp.1437–1444.

Li, Z. and Rana, T.M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nature reviews. Drug discovery*, 13(8), pp.622–638.

Liang, G., Li, J., Sun, B., Li, S., Lu, L., Wang, Y., Chen, B. and Xiao, Z. (2014). Deep sequencing reveals complex mechanisms of microRNA deregulation in colorectal cancer. *International journal of oncology*, 45(2), pp.603–610.

Liang, H., Jiang, Z., Xie, G. and Lu, Y. (2015). Serum microRNA-145 as a novel biomarker in human ovarian cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(7), pp.5305–5313.

Liao, W.-T. et al. (2013). microRNA-224 promotes cell proliferation and tumor growth in human colorectal cancer by repressing PHLPP1 and PHLPP2. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(17), pp.4662–4672.

Lin, C.-W. et al. (2013). MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nature communications*, 4, p.1877.

Lin, X., Xu, X.Y., Chen, Q.S. and Huang, C. (2015). Clinical significance of microRNA-34a in esophageal squamous cell carcinoma. *Genetics and molecular research : GMR*, 14(4), pp.17684–17691.

Ling, B., Wang, G.-X., Long, G., Qiu, J.-H. and Hu, Z.-L. (2012). Tumor suppressor miR-22 suppresses lung cancer cell progression through post-transcriptional regulation of ErbB3. *Journal of cancer research and clinical oncology*, 138(8), pp.1355–1361.

Liu, B., Qu, J., Xu, F., Guo, Y., Wang, Y., Yu, H. and Qian, B. (2015). MiR-195 suppresses non-small cell lung cancer by targeting CHEK1. *Oncotarget*, 6(11), pp.9445–9456.

Liu, B., Tian, Y., Li, F., Zhao, Z., Jiang, X., Zhai, C., Han, X. and Zhang, L. (2016). Tumor-suppressing roles of miR-214 and miR-218 in breast cancer. *Oncology reports*, 35(6), pp.3178–3184.

Liu, C.-J., Tsai, M.-M., Hung, P.-S., Kao, S.-Y., Liu, T.-Y., Wu, K.-J., Chiou, S.-H., Lin, S.-C. and Chang, K.-W. (2010). miR-31 ablates expression of the HIF regulatory factor FIH to activate the HIF pathway in head and neck carcinoma. *Cancer research*, 70(4), pp.1635–1644.

Liu, J., Xue, H., Zhang, J., Suo, T., Xiang, Y., Zhang, W., Ma, J., Cai, D. and Gu, X. (2015).



MicroRNA-144 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting MET expression. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 34, p.35.

Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L. and Law, M. (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *Journal of biomedicine & biotechnology*, 2012, p.251364.

Liu, M. et al. (2011). TNF-alpha is a novel target of miR-19a. *International journal of oncology*, 38(4), pp.1013–1022.

Liu, Q., Liao, F., Wu, H., Cai, T., Yang, L., Wang, Z.-F. and Zou, R. (2014). Upregulation of miR-132 expression in glioma and its clinical significance. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(12), pp.12299–12304.

Liu, R., Yang, M., Meng, Y., Liao, J., Sheng, J., Pu, Y., Yin, L. and Kim, S.J. (2013). Tumor-suppressive function of miR-139-5p in esophageal squamous cell carcinoma. *PloS one*, 8(10), p.e77068.

Liu, X. et al. (2010). MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *The Journal of clinical investigation*, 120(4), pp.1298–1309.

Liu, X., Yu, H., Cai, H. and Wang, Y. (2014). The expression and clinical significance of miR-132 in gastric cancer patients. *Diagnostic pathology*, 9, p.57.

Liu, Y. et al. (2017). miR-19a promotes colorectal cancer proliferation and migration by targeting TIA1. *Molecular cancer*, 16(1), p.53.

Liu, Y., Wang, F. and Xu, P. (2017). miR-590 accelerates lung adenocarcinoma migration and invasion through directly suppressing functional target OLFM4. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 86, pp.466–474.

Liu, Z. et al. (2014). RUNX3 regulates vimentin expression via miR-30a during epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 18(4), pp.610–623.

Liu, Z., Tu, K. and Liu, Q. (2014). Effects of microRNA-30a on migration, invasion and prognosis of hepatocellular carcinoma. *FEBS letters*, 588(17), pp.3089–3097.

Liu, Z., Xu, Y., Long, J., Guo, K., Ge, C. and Du, R. (2015). microRNA-218 suppresses the proliferation, invasion and promotes apoptosis of pancreatic cancer cells by targeting HMGB1. *Chinese journal of cancer research = Chung-kuo yen cheng yen chiu*, 27(3), pp.247–257.

Long, L.-M., Zhan, J.-K., Wang, H.-Q., Li, S., Chen, Y.-Y. and Liu, Y.-S. (2017). The Clinical Significance of miR-34a in Pancreatic Ductal Carcinoma and Associated Molecular and Cellular Mechanisms. *Pathobiology: journal of immunopathology, molecular and cellular biology*, 84(1), pp.38–48.

Lortet-Tieulent, J., Soerjomataram, I., Ferlay, J., Rutherford, M., Weiderpass, E. and Bray, F. (2014). International trends in lung cancer incidence by histological subtype: Adenocarcinoma stabilizing in men but still increasing in women. *Lung Cancer*, 84(1), pp.13–22.

Lu, J. et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*,

435(7043), pp.834–838.

Lu, S., Wang, S., Geng, S., Ma, S., Liang, Z. and Jiao, B. (2013). Upregulation of microRNA-224 confers a poor prognosis in glioma patients. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 15(7), pp.569–574.

Lujambio, A. et al. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36), pp.13556–13561.

Lujambio, A. and Esteller, M. (2009). How epigenetics can explain human metastasis: a new role for microRNAs. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 8(3), pp.377–382.

Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E. and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science (New York, N.Y.)*, 303(5654), pp.95–98.

Lynch, T.J., Lilenbaum, R. and Bonomi, P. (2004). A phase II trial of cetuximab as therapy for recurrent non-small cell lung cancer (NSCLC). *Proc.Am.Soc.Clin.Onco.*, 23, p.634a-

Ma, J. et al. (2014). Characterization of microRNA transcriptome in lung cancer by next-generation deep sequencing. *Molecular oncology*, 8(7), pp.1208–1219.

Ma, L., Huang, Y., Zhu, W., Zhou, S., Zhou, J., Zeng, F., Liu, X., Zhang, Y. and Yu, J. (2011). An integrated analysis of miRNA and mRNA expressions in non-small cell lung cancers. *PloS one*, 6(10), p.e26502.

Ma, Z.-L. et al. (2015). MicroRNA-34a inhibits the proliferation and promotes the apoptosis of non-small cell lung cancer H1299 cell line by targeting TGFbetaR2. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(4), pp.2481–2490.

Maillot, G. et al. (2009). Widespread estrogen-dependent repression of micrnas involved in breast tumor cell growth. *Cancer research*, 69(21), pp.8332–8340.

Malhotra, J., Malvezzi, M., Negri, E., La Vecchia, C. and Boffetta, P. (2016). Risk factors for lung cancer worldwide. *The European respiratory journal*, 48(3), pp.889–902.

Malvezzi, M., Bertuccio, P., Levi, F., La Vecchia, C. and Negri, E. (2014). European cancer mortality predictions for the year 2014. *Annals of Oncology*, 25(8), pp.1650–1656.

Mamdani, M. et al. (2015). Integrating mRNA and miRNA Weighted Gene Co-Expression Networks with eQTLs in the Nucleus Accumbens of Subjects with Alcohol Dependence. *PloS one*, 10(9), p.e0137671.

Mancikova, V. et al. (2015). MicroRNA deep-sequencing reveals master regulators of follicular and papillary thyroid tumors. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 28(6), pp.748–757.

Markou, A., Sourvinou, I., Vorkas, P.A., Yousef, G.M. and Lianidou, E. (2013). Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 81(3), pp.388–396.

Marrone, A.K., Tryndyak, V., Beland, F.A. and Pogribny, I.P. (2016). MicroRNA

- Responses to the Genotoxic Carcinogens Aflatoxin B1 and Benzo[a]pyrene in Human HepaRG Cells. *Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology*, 149(2), pp.496–502.
- Matakidou, A., Eisen, T. and Houlston, R.S. (2005). Systematic review of the relationship between family history and lung cancer risk. *British journal of cancer*, 93(7), pp.825–833.
- Melo, S.A. and Esteller, M. (2011). Dysregulation of microRNAs in cancer: playing with fire. *FEBS letters*, 585(13), pp.2087–2099.
- Meltzer, P.S. (2005). Cancer genomics: small RNAs with big impacts. *Nature*, 435(7043), pp.745–746.
- Mendell, J.T. (2008). miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell*, 133(2), pp.217–222.
- Meng, W. et al. (2013). MicroRNA-31 predicts the presence of lymph node metastases and survival in patients with lung adenocarcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(19), pp.5423–5433.
- Milenkovic, D., Jude, B. and Morand, C. (2013). miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free radical biology & medicine*, 64, pp.40–51.
- Minna, E. et al. (2016). miR-451a is underexpressed and targets AKT/mTOR pathway in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*, 7(11), pp.12731–12747.
- Molina, J.R., Yang, P., Cassivi, S.D., Schild, S.E. and Adjei, A.A. (2008). Non-small cell lung cancer: epidemiology, risk factors, treatment, and survivorship. *Mayo Clin.Proc.*, 83(5), pp.584–594.
- Morgensztern, D. et al. (2015). Molecularly targeted therapies in non-small-cell lung cancer annual update 2014. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(1 Suppl 1), pp.S1-63.
- Morgensztern, D., Ng, S.H., Gao, F. and Govindan, R. (2010). Trends in stage distribution for patients with non-small cell lung cancer: a National Cancer Database survey. *J.Thorac.Oncol.*, 5(1), pp.29–33.
- Morlando, M., Ballarino, M., Gromak, N., Pagano, F., Bozzoni, I. and Proudfoot, N.J. (2008). Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nature structural & molecular biology*, 15(9), pp.902–909.
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M. and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & development*, 16(6), pp.720–728.
- Myrdal, G., Gustafsson, G., Lambe, M., Horte, L.G. and Stahle, E. (2001). Outcome after lung cancer surgery. Factors predicting early mortality and major morbidity. *European journal of cardio-thoracic surgery : official journal of the European Association for Cardio-thoracic Surgery*, 20(4), pp.694–699.
- Nadal, E. et al. (2015). A Novel Serum 4-microRNA Signature for Lung Cancer Detection. *Scientific reports*, 5, p.12464.

- Nakanishi, M., Ozaki, T., Yamamoto, H., Hanamoto, T., Kikuchi, H., Furuya, K., Asaka, M., Delia, D. and Nakagawara, A. (2007). NFBD1/MDC1 associates with p53 and regulates its function at the crossroad between cell survival and death in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, 282(31), pp.22993–23004.
- Nam, E.J., Yoon, H., Kim, S.W., Kim, H., Kim, Y.T., Kim, J.H., Kim, J.W. and Kim, S. (2008). MicroRNA expression profiles in serous ovarian carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(9), pp.2690–2695.
- Nana-Sinkam, S.P., Fabbri, M. and Croce, C.M. (2010). MicroRNAs in cancer: personalizing diagnosis and therapy. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1210, pp.25–33.
- Nasser, M.W. et al. (2008). Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *The Journal of biological chemistry*, 283(48), pp.33394–33405.
- Navarro, A., Marrades, R.M., Vinolas, N., Quera, A., Agusti, C., Huerta, A., Ramirez, J., Torres, A. and Monzo, M. (2009). MicroRNAs expressed during lung cancer development are expressed in human pseudoglandular lung embryogenesis. *Oncology*, 76(3), pp.162–169.
- Nishida, N. et al. (2012). Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 18(11), pp.3054–3070.
- Nishikawa, R. et al. (2014). Tumor-suppressive microRNA-218 inhibits cancer cell migration and invasion via targeting of LASP1 in prostate cancer. *Cancer science*, 105(7), pp.802–811.
- Nymark, P., Guled, M., Borze, I., Faisal, A., Lahti, L., Salmenkivi, K., Kettunen, E., Anttila, S. and Knuutila, S. (2011). Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 50(8), pp.585–597.
- O'Day, E. and Lal, A. (2010). MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 12(2), p.201.
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C. V and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435(7043), pp.839–843.
- Okabe, T., Okamoto, I., Tamura, K., Terashima, M., Yoshida, T., Satoh, T., Takada, M., Fukuoka, M. and Nakagawa, K. (2007). Differential constitutive activation of the epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer cells bearing EGFR gene mutation and amplification. *Cancer research*, 67(5), pp.2046–2053.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M. and Lai, E.C. (2007). The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130(1), pp.89–100.
- Olive, V., Jiang, I. and He, L. (2010). mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 42(8), pp.1348–1354.

- Osada, H. and Takahashi, T. (2011). let-7 and miR-17-92: small-sized major players in lung cancer development. *Cancer science*, 102(1), pp.9–17.
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y. and Seto, M. (2004). Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer research*, 64(9), pp.3087–3095.
- Paez, J. G., et al. (2004). EGFR Mutations in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response to Gefitinib Therapy. *Science*, 304(5676), pp.1497–1500.
- Pak, M.G., Lee, C.-H., Lee, W.-J., Shin, D.-H. and Roh, M.-S. (2015). Unique microRNAs in lung adenocarcinoma groups according to major TKI sensitive EGFR mutation status. *Diagnostic pathology*, 10, p.99.
- Pasquinelli, A.E. et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408(6808), pp.86–89.
- Peng, J., Xie, Z., Cheng, L., Zhang, Y., Chen, J., Yu, H., Li, Z. and Kang, H. (2015). Paired design study by real-time PCR: miR-378\* and miR-145 are potent early diagnostic biomarkers of human colorectal cancer. *BMC cancer*, 15, p.158.
- Peters, L. and Meister, G. (2007). Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Molecular cell*, 26(5), pp.611–623.
- Peters, S., Taron, M., Bubendorf, L., Blackhall, F. and Stahel, R. (2013). Treatment and detection of ALK-rearranged NSCLC. *Lung Cancer*, 81(2), pp.145–154. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lungcan.2013.03.017>.
- Peto, R., Darby, S., Deo, H., Silcocks, P., Whitley, E. and Doll, R. (2000). Smoking, smoking cessation, and lung cancer in the UK since 1950: combination of national statistics with two case-control studies. *BMJ*, 321(7257), pp.323–329.
- Pfaffl, M.W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.*, 29(9), p.e45.
- Pritchard, C.C., Cheng, H.H. and Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature reviews. Genetics*, 13(5), pp.358–369.
- Puchades-carrasco, L. et al. (2016). Serum metabolomic profiling facilitates the non-invasive identification of metabolic biomarkers associated with the onset and progression of non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(11), pp.12904–12916.
- Qi, J. and Mu, D. (2012). MicroRNAs and lung cancers: from pathogenesis to clinical implications. *Frontiers of medicine*, 6(2), pp.134–155.
- Rani, S., Gately, K., Crown, J., O’Byrne, K. and O’Driscoll, L. (2013). Global analysis of serum microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. *Cancer biology & therapy*, 14(12), pp.1104–1112.
- Razzak, R. et al. (2016). MicroRNA expression profiling of sputum for the detection of early and locally advanced non-small-cell lung cancer: a prospective case-control study. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 23(2), pp.e86-94.
- Reck, M. et al. (2016). Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer. *New England Journal of Medicine*, 375(19), pp.1823–1833.

- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R. and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403(6772), pp.901–906.
- Ren, F., Zhang, X., Liang, H., Luo, D., Rong, M., Dang, Y. and Chen, G. (2015). Prognostic significance of MiR-34a in solid tumors: a systemic review and meta-analysis with 4030 patients. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(10), pp.17377–17391.
- Rinnerthaler, G. et al. (2016). miR-16-5p Is a Stably-Expressed Housekeeping MicroRNA in Breast Cancer Tissues from Primary Tumors and from Metastatic Sites. *International journal of molecular sciences*, 17(2).
- Robinson, C.G. et al. (2013). Patterns of failure after stereotactic body radiation therapy or lobar resection for clinical stage I non-small-cell lung cancer. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 8(2), pp.192–201.
- Robles, A.I. et al. (2015). An Integrated Prognostic Classifier for Stage I Lung Adenocarcinoma Based on mRNA, microRNA, and DNA Methylation Biomarkers. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(7), pp.1037–1048.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L. and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome research*, 14(10A), pp.1902–1910.
- Rolfo, C. et al. (2014). Impact of microRNAs in resistance to chemotherapy and novel targeted agents in non-small cell lung cancer. *Current pharmaceutical biotechnology*, 15(5), pp.475–485.
- Rosell, R. et al. (2009). Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *The New England journal of medicine*, 361(10), pp.958–967.
- Ruan, K., Fang, X. and Ouyang, G. (2009). MicroRNAs: novel regulators in the hallmarks of human cancer. *Cancer letters*, 285(2), pp.116–126.
- Ruby, J.G., Jan, C.H. and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448(7149), pp.83–86.
- Rupaimoole, R. et al. (2014). Hypoxia-mediated downregulation of miRNA biogenesis promotes tumour progression. *Nature communications*, 5, p.5202.
- Saad, M.A. et al. (2015). Alcohol-dysregulated miR-30a and miR-934 in head and neck squamous cell carcinoma. *Molecular cancer*, 14, p.181.
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S. and Enright, A.J. (2007). Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(45), pp.17719–17724.
- Saito, M. et al. (2011). The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(7), pp.1875–1882.
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A. and Jones,

- P.A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*, 9(6), pp.435–443.
- Sakurai, H., Asamura, H., Watanabe, S., Suzuki, K. and Tsuchiya, R. (2004). Clinicopathologic features of peripheral squamous cell carcinoma of the lung. *The Annals of thoracic surgery*, 78(1), pp.222–227.
- Sand, M., Skrygan, M., Georgas, D., Sand, D., Hahn, S.A., Gambichler, T., Altmeyer, P. and Bechara, F.G. (2012). Microarray analysis of microRNA expression in cutaneous squamous cell carcinoma. *Journal of dermatological science*, 68(3), pp.119–126.
- Sanmartín, E. et al. (2014). A Gene Signature Combining the Tissue Expression of Three Angiogenic Factors is a Prognostic Marker in Early-stage Non-small Cell Lung Cancer. *Annals of surgical oncology*, 21(2), pp.612–20.
- Santra, M.K., Wajapeyee, N. and Green, M.R. (2009). F-box protein FBXO31 mediates cyclin D1 degradation to induce G1 arrest after DNA damage. *Nature*, 459(7247), pp.722–725.
- Sartor, M.A., Leikauf, G.D. and Medvedovic, M. (2009). LRpath: a logistic regression approach for identifying enriched biological groups in gene expression data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 25(2), pp.211–217.
- Sasco, A.J., Secretan, M.B. and Straif, K. (2004). Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung Cancer*, 45 Suppl 2, pp.S3–S9.
- Sawyers, C.L. (2013). AACR Cancer Progress Report 2013. *Clin Cancer Res.*, 19(Supplement 1), pp.1–98.
- Scagliotti, G. V et al. (2008). Phase III study comparing cisplatin plus gemcitabine with cisplatin plus pemetrexed in chemotherapy-naïve patients with advanced-stage non-small-cell lung cancer. *J.Clin.Oncol.*, 26(21), pp.3543–3551.
- Scagliotti, G. V, Selvaggi, G., Novello, S. and Hirsch, F.R. (2004). The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clin.Cancer Res.*, 10(12 Pt 2), p.4227s–4232s.
- Schaefer, A. et al. (2010). Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *International journal of cancer*, 126(5), pp.1166–1176.
- Schmid, K., Oehl, N., Wrba, F., Pirker, R., Pirker, C. and Filipits, M. (2009). EGFR/KRAS/BRAF mutations in primary lung adenocarcinomas and corresponding locoregional lymph node metastases. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(14), pp.4554–4560.
- Seike, M. et al. (2009). MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), pp.12085–12090.
- Shah, M.S. et al. (2016). Comparative effects of diet and carcinogen on microRNA expression in the stem cell niche of the mouse colonic crypt. *Biochimica et biophysica acta*, 1862(1), pp.121–134.
- Shay, J.W. and Bacchetti, S. (1997). A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur.J.Cancer*, 33(5), pp.787–91.

- Shen, H., Shen, J., Wang, L., Shi, Z., Wang, M., Jiang, B.-H. and Shu, Y. (2015). Low miR-145 expression level is associated with poor pathological differentiation and poor prognosis in non-small cell lung cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 69, pp.301–305.
- Shen, J. et al. (2011). Plasma microRNAs as potential biomarkers for non-small-cell lung cancer. *Lab Invest*, 91(4), pp.579–587.
- Shen, S., Wang, L., Jia, Y., Hao, Y., Zhang, L. and Wang, H. (2013). Upregulation of microRNA-224 is associated with aggressive progression and poor prognosis in human cervical cancer. *Diagnostic pathology*, 8, p.69.
- Shi, B., Gao, H., Zhang, T. and Cui, Q. (2016). Analysis of plasma microRNA expression profiles revealed different cancer susceptibility in healthy young adult smokers and middle-aged smokers. *Oncotarget*, 7(16), pp.21676–21685.
- Shi, K.-Q. et al. (2015). Hepatocellular carcinoma associated microRNA expression signature: integrated bioinformatics analysis, experimental validation and clinical significance. *Oncotarget*, 6(28), pp.25093–25108.
- Shi, S. et al. (2014). miR-1247 is correlated with prognosis of pancreatic cancer and inhibits cell proliferation by targeting neuropilins. *Current molecular medicine*, 14(3), pp.316–327.
- Shi, Y., Liu, C., Liu, X., Tang, D.G. and Wang, J. (2014). The microRNA miR-34a inhibits non-small cell lung cancer (NSCLC) growth and the CD44<sup>hi</sup> stem-like NSCLC cells. *PloS one*, 9(3), p.e90022.
- Shin, V.Y., Ng, E.K.O., Chan, V.W., Kwong, A. and Chu, K.-M. (2015). A three-miRNA signature as promising non-invasive diagnostic marker for gastric cancer. *Molecular cancer*, 14, p.202.
- Sin, T.K., Wang, F., Meng, F., Wong, S.C.C., Cho, W.C.S., Siu, P.M., Chan, L.W.C. and Yung, B.Y.M. (2016). Implications of MicroRNAs in the Treatment of Gefitinib-Resistant Non-Small Cell Lung Cancer. *International journal of molecular sciences*, 17(2), p.237.
- Slattery, M.L., Herrick, J.S., Mullany, L.E., Valeri, N., Stevens, J., Caan, B.J., Samowitz, W. and Wolff, R.K. (2015). An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *International journal of cancer*, 137(2), pp.428–438.
- Soda, M. et al. (2007). Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature*, 448(7153), pp.561–566.
- Sohn, W., Kim, J., Kang, S.H., Yang, S.R., Cho, J.-Y., Cho, H.C., Shim, S.G. and Paik, Y.-H. (2015). Serum exosomal microRNAs as novel biomarkers for hepatocellular carcinoma. *Experimental & molecular medicine*, 47, p.e184.
- Solomides, C.C., Evans, B.J., Navenot, J.-M., Vadigepalli, R., Peiper, S.C. and Wang, Z. (2012). MicroRNA profiling in lung cancer reveals new molecular markers for diagnosis. *Acta cytologica*, 56(6), pp.645–654.
- Song, L., Li, D., Gu, Y., Wen, Z.-M., Jie, J., Zhao, D. and Peng, L.-P. (2016). MicroRNA-126 Targeting PIK3R2 Inhibits NSCLC A549 Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Regulation of PTEN/PI3K/AKT Pathway. *Clinical lung cancer*, 17(5), pp.e65–e75.



- Soria, J.-C. et al. (2013). Systematic review and meta-analysis of randomised, phase II/III trials adding bevacizumab to platinum-based chemotherapy as first-line treatment in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 24(1), pp.20–30.
- Stenvold, H., Donnem, T., Andersen, S., Al-Saad, S., Busund, L.-T. and Bremnes, R.M. (2014). Stage and tissue-specific prognostic impact of miR-182 in NSCLC. *BMC cancer*, 14, p.138.
- Su, Z., Zhao, J., Rong, Z., Geng, W., Wu, Y. and Qin, C. (2014). Upregulation of microRNA-25 associates with prognosis in hepatocellular carcinoma. *Diagnostic pathology*, 9, p.47.
- Sui, C., Xu, F., Shen, W., Geng, L., Xie, F., Dai, B., Lu, J., Zhang, M. and Yang, J. (2015). Overexpression of miR-218 inhibits hepatocellular carcinoma cell growth through RET. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(3), pp.1511–1518.
- Sun, C. et al. (2015). Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget*, 6(37), pp.39756–39792.
- Sun, G. et al. (2016). Signature miRNAs in colorectal cancers were revealed using a bias reduction small RNA deep sequencing protocol. *Oncotarget*, 7(4), pp.3857–3872.
- Sun, P. et al. (2016). MicroRNA-195 targets VEGFR2 and has a tumor suppressive role in ACHN cells via PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK signaling pathways. *International journal of oncology*, 49(3), pp.1155–1163.
- Sun, Y. et al. (2013). Expression of miR-150 and miR-3940-5p is reduced in non-small cell lung carcinoma and correlates with clinicopathological features. *Oncology reports*, 29(2), pp.704–712.
- Sun, Y., Bai, Y., Zhang, F., Wang, Y., Guo, Y. and Guo, L. (2010). miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. *Biochemical and biophysical research communications*, 391(3), pp.1483–1489.
- Sun, Z., Zhang, A., Jiang, T., Du, Z., Che, C. and Wang, F. (2015). MiR-145 suppressed human retinoblastoma cell proliferation and invasion by targeting ADAM19. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(11), pp.14521–14527.
- Suzuki, K., Kadota, K., Sima, C.S., Nitadori, J., Rusch, V.W., Travis, W.D., Sadelain, M. and Adusumilli, P.S. (2013). Clinical Impact of Immune Microenvironment in Stage I Lung Adenocarcinoma: Tumor Interleukin-12 Receptor  $\beta$ 2 (IL-12R $\beta$ 2), IL-7R, and Stromal FoxP3/CD3 Ratio Are Independent Predictors of Recurrence. *Journal of Clinical Oncology*, 31(4), pp.490–498.
- Svoboda, M., Sana, J., Fabian, P., Kocakova, I., Gombosova, J., Nekvindova, J., Radova, L., Vyzula, R. and Slaby, O. (2012). MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiation oncology (London, England)*, 7, p.195.
- Sylvestre, Y., De Guire, V., Querido, E., Mukhopadhyay, U.K., Bourdeau, V., Major, F., Ferbeyre, G. and Chartrand, P. (2007). An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *The Journal of biological chemistry*, 282(4), pp.2135–2143.

- Tagawa, H., Karube, K., Tsuzuki, S., Ohshima, K. and Seto, M. (2007). Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer science*, 98(9), pp.1482–1490.
- Takamizawa, J. et al. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res.*, 64(11), pp.3753–3756.
- Tam, I.Y.S. et al. (2006). Distinct epidermal growth factor receptor and KRAS mutation patterns in non-small cell lung cancer patients with different tobacco exposure and clinicopathologic features. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 12(5), pp.1647–1653.
- Tan, X. et al. (2011). A 5-microRNA signature for lung squamous cell carcinoma diagnosis and hsa-miR-31 for prognosis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 17(21), pp.6802–6811.
- Tang, R., Liang, L., Luo, D., Feng, Z., Huang, Q., He, R., Gan, T., Yang, L. and Chen, G. (2015). Downregulation of MiR-30a is Associated with Poor Prognosis in Lung Cancer. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 21, pp.2514–2520.
- Tejero, R. et al. (2014). MiR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma. *PloS one*, 9(7), p.e101899.
- Therasse, P. et al. (2000). New Guidelines to Evaluate the Response to Treatment in Solid Tumors. *Journal of the National Cancer Institute*, 92(3), pp.205–216.
- Tian, F., Li, R., Chen, Z., Shen, Y., Lu, J., Xie, X. and Ge, Q. (2016). Differentially Expressed miRNAs in Tumor, Adjacent, and Normal Tissues of Lung Adenocarcinoma. *BioMed research international*, 2016, p.1428271.
- Tibaldi, C., D’Incecco, A. and Lagana, A. (2015). MicroRNAs and Targeted Therapies in Non-small Cell Lung Cancer: Minireview. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*, 15(6), pp.694–700.
- Tong, A.W. and Nemunaitis, J. (2008). Modulation of miRNA activity in human cancer: a new paradigm for cancer gene therapy? *Cancer gene therapy*, 15(6), pp.341–355.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J. and Jemal, A. (2015). Global Cancer Statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.*, 65(2), pp.87–108.
- Travis, W.D. et al. (2011). International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *J.Thorac.Oncol.*, 6(2), pp.244–285.
- Travis, W.D. (2002). Pathology of lung cancer. *Clin.Chest Med.*, 23(1), pp.65–81.
- Travis, W.D. et al. (2015). The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances Since the 2004 Classification. *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 10(9), pp.1243–1260.
- Tyczynski, J.E., Bray, F. and Parkin, D.M. (2003). Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention, and early detection. *Lancet Oncol.*, 4(1), pp.45–55.

- Ul Hussain, M. (2012). Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action. *Cell and tissue research*, 349(2), pp.405–413.
- Ulivi, P., Foschi, G., Mengozzi, M., Scarpi, E., Silvestrini, R., Amadori, D. and Zoli, W. (2013). Peripheral blood miR-328 expression as a potential biomarker for the early diagnosis of NSCLC. *International journal of molecular sciences*, 14(5), pp.10332–10342.
- Usmani, A., Shoro, A.A., Memon, Z., Hussain, M. and Rehman, R. (2015). Diagnostic, prognostic and predictive value of MicroRNA-21 in breast cancer patients, their daughters and healthy individuals. *American journal of cancer research*, 5(8), pp.2484–2490.
- Usó, M., Jantus-Lewintre, E., Calabuig-Farinas, S., Blasco, A., Garcia Del Olmo, E., Guijarro, R., Martorell, M., Camps, C. and Sirera, R. (2017). Analysis of the prognostic role of an immune checkpoint score in resected non-small cell lung cancer patients. *Oncoimmunology*, 6(1), p.e1260214.
- Usó, M., Jantus-Lewintre, E., Sirera, R., Bremnes, R.M. and Camps, C. (2014). miRNA detection methods and clinical implications in lung cancer. *Future.Oncol*, 10(14), pp.2279–2292.
- Vieira, A.R., Abar, L., Vingeliene, S., Chan, D.S.M., Aune, D., Navarro-Rosenblatt, D., Stevens, C., Greenwood, D. and Norat, T. (2016). Fruits, vegetables and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*, 27(1), pp.81–96.
- Visone, R. et al. (2007). Specific microRNAs are downregulated in human thyroid anaplastic carcinomas. *Oncogene*, 26(54), pp.7590–7595.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz Jr., L.A. and Kinzler, K.W. (2013). Cancer genome landscapes. *Science*, 339(6127), pp.1546–1558.
- Volinia, S. et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 103(7), pp.2257–2261.
- Vosa, U. et al. (2011). Identification of miR-374a as a prognostic marker for survival in patients with early-stage nonsmall cell lung cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 50(10), pp.812–822.
- Vosa, U., Vooder, T., Kolde, R., Vilo, J., Metspalu, A. and Annilo, T. (2013). Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *International journal of cancer*, 132(12), pp.2884–2893.
- Wallis, C.J.D., Gordanpour, A., Bendavid, J.S., Sugar, L., Nam, R.K. and Seth, A. (2015). MiR-182 Is Associated with Growth, Migration and Invasion in Prostate Cancer via Suppression of FOXO1. *Journal of Cancer*, 6(12), pp.1295–1305.
- Wang, C. et al. (2015). A Five-miRNA Panel Identified From a Multicentric Case-control Study Serves as a Novel Diagnostic Tool for Ethnically Diverse Non-small-cell Lung Cancer Patients. *EBioMedicine*, 2(10), pp.1377–1385.
- Wang, G., Mao, W., Zheng, S. and Ye, J. (2009). Epidermal growth factor receptor-regulated miR-125a-5p--a metastatic inhibitor of lung cancer. *The FEBS journal*, 276(19), pp.5571–5578.

- Wang, G., Shen, N., Cheng, L., Lin, J. and Li, K. (2015). Downregulation of miR-22 acts as an unfavorable prognostic biomarker in osteosarcoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(10), pp.7891–7895.
- Wang, G., Zhu, S., Gu, Y., Chen, Q., Liu, X. and Fu, H. (2015). MicroRNA-145 and MicroRNA-133a Inhibited Proliferation, Migration, and Invasion, While Promoted Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells Via Targeting FSCN1. *Digestive diseases and sciences*, 60(10), pp.3044–3052.
- Wang, J., Li, Z., Ge, Q., Wu, W., Zhu, Q., Luo, J. and Chen, L. (2015). Characterization of microRNA transcriptome in tumor, adjacent, and normal tissues of lung squamous cell carcinoma. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery*, 149(5), p.1404–14.e4.
- Wang, L. and Liu, H. (2016). microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(3), pp.4105–4113.
- Wang, R., Wang, Z.-X., Yang, J.-S., Pan, X., De, W. and Chen, L.-B. (2011). MicroRNA-451 functions as a tumor suppressor in human non-small cell lung cancer by targeting ras-related protein 14 (RAB14). *Oncogene*, 30(23), pp.2644–2658.
- Wang, S., Yang, M.-H., Wang, X.-Y., Lin, J. and Ding, Y.-Q. (2014). Increased expression of miRNA-182 in colorectal carcinoma: an independent and tissue-specific prognostic factor. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(6), pp.3498–3503.
- Wang, T., Chen, T., Niu, H., Li, C., Xu, C., Li, Y., Huang, R., Zhao, J. and Wu, S. (2015). MicroRNA-218 inhibits the proliferation and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma cells by targeting BMI1. *International journal of molecular medicine*, 36(1), pp.93–102.
- Wang, X., Meng, X., Li, H., Liu, W., Shen, S. and Gao, Z. (2014). MicroRNA-25 expression level is an independent prognostic factor in epithelial ovarian cancer. *Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico*, 16(11), pp.954–958.
- Wang, Y. et al. (2016). Role of deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer progression using fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Oncology letters*, 11(1), pp.801–808.
- Wang, Y., Shi, J., Wu, Y., Xu, W., Wang, Q., Zhang, J., Jiang, M. and Gu, G. (2012). Use of Luminex xMAP bead-based suspension array for detecting microRNA in NSCLC tissues and its clinical application. *Tumori*, 98(6), pp.792–799.
- Wang, Z.-X., Bian, H.-B., Wang, J.-R., Cheng, Z.-X., Wang, K.-M. and De, W. (2011). Prognostic significance of serum miRNA-21 expression in human non-small cell lung cancer. *Journal of surgical oncology*, 104(7), pp.847–851.
- Warburg, O. (1956). On respiratory impairment in cancer cells. *Science*, 124(3215), pp.269–270.
- Wei, H., Zhang, J., Tan, K., Sun, R., Yin, L. and Pu, Y. (2015). Benzene-Induced Aberrant

- miRNA Expression Profile in Hematopoietic Progenitor Cells in C57BL/6 Mice. *International journal of molecular sciences*, 16(11), pp.27058–27071.
- Wei, J., Gao, W., Zhu, C.-J., Liu, Y.-Q., Mei, Z., Cheng, T. and Shu, Y.-Q. (2011). Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chinese journal of cancer*, 30(6), pp.407–414.
- Wei, Y., Du, Y., Chen, X., Li, P., Wang, Y., Zang, W., Zhao, L., Li, Z. and Zhao, G. (2014). Expression patterns of microRNA-218 and its potential functions by targeting CIP2A and BMI1 genes in melanoma. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(8), pp.8007–8015.
- Wen, S.-W., Zhang, Y.-F., Li, Y., Liu, Z.-X., Lv, H.-L., Li, Z.-H., Xu, Y.-Z., Zhu, Y.-G. and Tian, Z.-Q. (2015). Characterization and effects of miR-21 expression in esophageal cancer. *Genetics and molecular research : GMR*, 14(3), pp.8810–8818.
- Wen, X.P., Ma, H.L., Zhao, L.Y., Zhang, W. and Dang, C.X. (2015). MiR-30a suppresses non-small cell lung cancer progression through AKT signaling pathway by targeting IGF1R. *Cellular and molecular biology (Noisy-le-Grand, France)*, 61(2), pp.78–85.
- Wentz-Hunter, K.K. and Potashkin, J.A. (2011). The Role of miRNAs as Key Regulators in the Neoplastic Microenvironment. *Molecular biology international*, 2011, p.839872.
- Wightman, B., Ha, I. and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75(5), pp.855–862.
- Wild, P., Bourgkard, E. and Paris, C. (2009). Lung cancer and exposure to metals: the epidemiological evidence. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 472, pp.139–167.
- Wszolek, M.F., Rieger-Christ, K.M., Kenney, P.A., Gould, J.J., Silva Neto, B., Lavoie, A.K., Logvinenko, T., Libertino, J.A. and Summerhayes, I.C. (2011). A MicroRNA expression profile defining the invasive bladder tumor phenotype. *Urologic oncology*, 29(6), p.794–801.e1.
- Wu, C., Cao, Y., He, Z., He, J., Hu, C., Duan, H. and Jiang, J. (2014). Serum levels of miR-19b and miR-146a as prognostic biomarkers for non-small cell lung cancer. *The Tohoku journal of experimental medicine*, 232(2), pp.85–95.
- Wu, L., Pu, X., Wang, Q., Cao, J., Xu, F., Xu, L.I. and Li, K. (2016). miR-96 induces cisplatin chemoresistance in non-small cell lung cancer cells by downregulating SAMD9. *Oncology letters*, 11(2), pp.945–952.
- Wu, T. et al. (2015). miR-25 targets the modulator of apoptosis 1 gene in lung cancer. *Carcinogenesis*, 36(8), pp.925–935.
- Wynder, E.L. (1997). Tobacco as a cause of lung cancer: some reflections. *American journal of epidemiology*, 146(9), pp.687–694.
- Xia, Y., Zhu, Y., Zhou, X. and Chen, Y. (2014). Low expression of let-7 predicts poor prognosis in patients with multiple cancers: a meta-analysis. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35(6), pp.5143–5148.

- Xiang, J., Hang J.-B., Che, J.-M. and Li, H.-C. (2015). MiR-25 is up-regulated in non-small cell lung cancer and promotes cell proliferation and motility by targeting FBXW7. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(8), pp.9147–9153.
- Xiang, Y., Zhang, Y., Tang, Y. and Li, Q. (2017). MALAT1 Modulates TGF-beta1-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition through Downregulation of miR-145. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, 42(1), pp.357–372.
- Xiang, Z.-L., Zhao, X.-M., Zhang, L., Yang, P., Fan, J., Tang, Z.-Y. and Zeng, Z.-C. (2016). MicroRNA-34a expression levels in serum and intratumoral tissue can predict bone metastasis in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*, 7(52), pp.87246–87256.
- Xiao, X., Tang, C., Xiao, S., Fu, C. and Yu, P. (2013). Enhancement of proliferation and invasion by MicroRNA-590-5p via targeting PBRM1 in clear cell renal carcinoma cells. *Oncology research*, 20(11), pp.537–544.
- Xu, C., Zheng, Y., Lian, D., Ye, S., Yang, J. and Zeng, Z. (2015). Analysis of microRNA expression profile identifies novel biomarkers for non-small cell lung cancer. *Tumori*, 101(1), pp.104–110.
- Xu, W., Hang, M., Yuan, C.-Y., Wu, F.-L., Chen, S.-B. and Xue, K. (2015). MicroRNA-139-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor in human non-small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(4), pp.3864–3870.
- Xue, Y., Ni, T., Jiang, Y. and Li, Y. (2017). LncRNA GAS5 Inhibits Tumorigenesis and Enhances Radiosensitivity By Suppressing miR-135b Expression in Non-Small Cell Lung Cancer. *Oncology research*.
- Yamada, A. et al. (2015). Serum miR-21, miR-29a, and miR-125b Are Promising Biomarkers for the Early Detection of Colorectal Neoplasia. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 21(18), pp.4234–4242.
- Yan, L.-X., Huang, X.-F., Shao, Q., Huang, M.-Y., Deng, L., Wu, Q.-L., Zeng, Y.-X. and Shao, J.-Y. (2008). MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA (New York, N.Y.)*, 14(11), pp.2348–2360.
- Yanaihara, N. et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9(3), pp.189–198.
- Yang, C., Sun, C., Liang, X., Xie, S., Huang, J. and Li, D. (2016). Integrative analysis of microRNA and mRNA expression profiles in non-small-cell lung cancer. *Cancer gene therapy*, 23(4), pp.90–97.
- Yang, C.H., Li, K., Pfeffer, S.R. and Pfeffer, L.M. (2015). The Type I IFN-Induced miRNA, miR-21. *Pharmaceuticals (Basel, Switzerland)*, 8(4), pp.836–847.
- Yang, J.-Y. et al. (2010). Activation of FOXO3a is sufficient to reverse mitogen-activated protein/extracellular signal-regulated kinase inhibitor chemoresistance in human cancer. *Cancer research*, 70(11), pp.4709–4718.
- Yang, J., Han, S., Huang, W., Chen, T., Liu, Y., Pan, S. and Li, S. (2014). A meta-analysis

- of microRNA expression in liver cancer. *PLoS one*, 9(12), p.e114533.
- Yang, M., Liu, R., Li, X., Liao, J., Pu, Y., Pan, E., Wang, Y. and Yin, L. (2015). Epigenetic Repression of miR-218 Promotes Esophageal Carcinogenesis by Targeting ROBO1. *International journal of molecular sciences*, 16(11), pp.27781–27795.
- Yang, M., Shen, H., Qiu, C., Ni, Y., Wang, L., Dong, W., Liao, Y. and Du, J. (2013). High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*, 49(3), pp.604–615.
- Yang, T., Chen, T., Li, Y., Gao, L., Zhang, S., Wang, T. and Chen, M. (2015). Downregulation of miR-25 modulates non-small cell lung cancer cells by targeting CDC42. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(3), pp.1903–1911.
- Ye, Z. et al. (2015). Low miR-145 silenced by DNA methylation promotes NSCLC cell proliferation, migration and invasion by targeting mucin 1. *Cancer biology & therapy*, 16(7), pp.1071–1079.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G. and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & development*, 17(24), pp.3011–3016.
- Yongchun, Z., Linwei, T., Xicai, W., Lianhua, Y., Guangqiang, Z., Ming, Y., Guanjian, L., Yujie, L. and Yunchao, H. (2014). MicroRNA-195 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting MYB. *Cancer letters*, 347(1), pp.65–74.
- Youliden, D.R., Cramb, S.M. and Baade, P.D. (2008). The International Epidemiology of Lung Cancer: geographical distribution and secular trends. *J.Thorac.Oncol.*, 3(8), pp.819–831.
- Yu, H., Gao, G., Jiang, L., Guo, L., Lin, M., Jiao, X., Jia, W. and Huang, J. (2013). Decreased expression of miR-218 is associated with poor prognosis in patients with colorectal cancer. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(12), pp.2904–2911.
- Yu, L., Zhang, J., Guo, X., Li, Z. and Zhang, P. (2014). MicroRNA-224 upregulation and AKT activation synergistically predict poor prognosis in patients with hepatocellular carcinoma. *Cancer epidemiology*, 38(4), pp.408–413.
- Yu, S.-L. et al. (2016). Homeobox A9 directly targeted by miR-196b regulates aggressiveness through nuclear Factor-kappa B activity in non-small cell lung cancer cells. *Molecular carcinogenesis*, 55(12), pp.1915–1926.
- Yu, W., Wang, Z., Shen, L.I. and Wei, Q. (2016). Circulating microRNA-21 as a potential diagnostic marker for colorectal cancer: A meta-analysis. *Molecular and clinical oncology*, 4(2), pp.237–244.
- Yuan, Y. et al. (2016). Overexpression of miR-30a in lung adenocarcinoma A549 cell line inhibits migration and invasion via targeting EYA2. *Acta biochimica et biophysica Sinica*, 48(3), pp.220–228.
- Yue, S. et al. (2015). miR-139-5p suppresses cancer cell migration and invasion through

- targeting ZEB1 and ZEB2 in GBM. *Tumour biology: the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 36(9), pp.6741–6749.
- Zaman, M.S. et al. (2010). The functional significance of microRNA-145 in prostate cancer. *British journal of cancer*, 103(2), pp.256–264.
- Zandberga, E., Kozirovskis, V., Abols, A., Andrejeva, D., Purkalne, G. and Line, A. (2013). Cell-free microRNAs as diagnostic, prognostic, and predictive biomarkers for lung cancer. *Genes, chromosomes & cancer*, 52(4), pp.356–369.
- Zang, H., Wang, W. and Fan, S. (2017). The role of microRNAs in resistance to targeted treatments of non-small cell lung cancer. *Cancer chemotherapy and pharmacology*, 79(2), pp.227–231.
- Zeng, X.-J., Wu, Y.-H., Luo, M., Cong, P.-G. and Yu, H. (2017). Inhibition of pulmonary carcinoma proliferation or metastasis of miR-218 via down-regulating CDCP1 expression. *European review for medical and pharmacological sciences*, 21(7), pp.1502–1508.
- Zeng, Y. and Cullen, B.R. (2005). Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *The Journal of biological chemistry*, 280(30), pp.27595–27603.
- Zhan, B., Lu, D., Luo, P. and Wang, B. (2016). Prognostic Value of Expression of MicroRNAs in Non-Small Cell Lung Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Clinical laboratory*, 62(11), pp.2203–2211.
- Zhang, B., Pan, X., Cobb, G.P. and Anderson, T.A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, 302(1), pp.1–12.
- Zhang, G.-J., Zhou, H., Xiao, H.-X., Li, Y. and Zhou, T. (2013). Up-regulation of miR-224 promotes cancer cell proliferation and invasion and predicts relapse of colorectal cancer. *Cancer cell international*, 13(1), p.104.
- Zhang, H., Zuo, Z., Lu, X., Wang, L., Wang, H. and Zhu, Z. (2012). MiR-25 regulates apoptosis by targeting Bim in human ovarian cancer. *Oncology reports*, 27(2), pp.594–598.
- Zhang, J. et al. (2011). International Cancer Genome Consortium Data Portal--a one-stop shop for cancer genomics data. *Database: the journal of biological databases and curation*, 2011, p.bar026.
- Zhang, J., Gong, X., Tian, K., Chen, D., Sun, J., Wang, G. and Guo, M. (2015). miR-25 promotes glioma cell proliferation by targeting CDKN1C. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 71, pp.7–14.
- Zhang, N., Wang, X., Huo, Q., Sun, M., Cai, C., Liu, Z., Hu, G. and Yang, Q. (2014). MicroRNA-30a suppresses breast tumor growth and metastasis by targeting metadherin. *Oncogene*, 33(24), pp.3119–3128.
- Zhang, Q. et al. (2015). Role of microRNA 30a targeting insulin receptor substrate 2 in colorectal tumorigenesis. *Molecular and cellular biology*, 35(6), pp.988–1000.
- Zhang, Q.-H., Sun, H.-M., Zheng, R.-Z., Li, Y.-C., Zhang, Q., Cheng, P., Tang, Z.-H. and Huang, F. (2013). Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. *Gene*, 527(1), pp.26–32.



- Zhang, R., Wang, W., Li, F., Zhang, H. and Liu, J. (2014). MicroRNA-106b~25 expressions in tumor tissues and plasma of patients with gastric cancers. *Medical oncology (Northwood, London, England)*, 31(10), p.243.
- Zhang, T., Wang, Q., Zhao, D., Cui, Y., Cao, B., Guo, L. and Lu, S.H. (2011). The oncogenetic role of microRNA-31 as a potential biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma. *Clinical science (London, England : 1979)*, 121(10), pp.437–447.
- Zhang, Y. et al. (2012). Protective role of estrogen-induced miRNA-29 expression in carbon tetrachloride-induced mouse liver injury. *The Journal of biological chemistry*, 287(18), pp.14851–14862.
- Zhang, Y., Takahashi, S., Tasaka, A., Yoshima, T., Ochi, H. and Chayama, K. (2013). Involvement of microRNA-224 in cell proliferation, migration, invasion, and anti-apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Journal of gastroenterology and hepatology*, 28(3), pp.565–575.
- Zhang, Y., Yang, X., Wu, H., Zhou, W. and Liu, Z. (2015). MicroRNA-145 inhibits migration and invasion via inhibition of fascin 1 protein expression in non-small-cell lung cancer cells. *Molecular medicine reports*, 12(4), pp.6193–6198.
- Zhao, F., Lv, J., Gan, H., Li, Y., Wang, R., Zhang, H., Wu, Q. and Chen, Y. (2015). MiRNA profile of osteosarcoma with CD117 and stro-1 expression: miR-1247 functions as an onco-miRNA by targeting MAP3K9. *International journal of clinical and experimental pathology*, 8(2), pp.1451–1458.
- Zhao, W., Zhao, J.-J., Zhang, L., Xu, Q.-F., Zhao, Y.-M., Shi, X.-Y. and Xu, A.-G. (2015). Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *International journal of clinical and experimental medicine*, 8(9), pp.14759–14763.
- Zhao, Z., Liu, J., Wang, C., Wang, Y., Jiang, Y. and Guo, M. (2014). MicroRNA-25 regulates small cell lung cancer cell development and cell cycle through cyclin E2. *International journal of clinical and experimental pathology*, 7(11), pp.7726–7734.
- Zheng, M., Sun, X., Li, Y. and Zuo, W. (2016). MicroRNA-145 inhibits growth and migration of breast cancer cells through targeting oncoprotein ROCK1. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(6), pp.8189–8196.
- Zhou, H., Tang, K., Xiao, H., Zeng, J., Guan, W., Guo, X., Xu, H. and Ye, Z. (2015). A panel of eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in bladder cancer. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 34, p.53.
- Zhou, L., He, J. and Zhang, Y. (2013). MicroRNA-22 expression in hepatocellular carcinoma and its correlation with ezrin protein. *The Journal of international medical research*, 41(4), pp.1009–1016.
- Zhou, X. et al. (2015). Diagnostic value of a plasma microRNA signature in gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Scientific reports*, 5, p.11251.
- Zhou, X., Wang, X., Huang, Z., Wang, J., Zhu, W., Shu, Y. and Liu, P. (2014). Prognostic value of miR-21 in various cancers: an updating meta-analysis. *PloS one*, 9(7), p.e102413.

- Zhu, C. et al. (2014). A five-microRNA panel in plasma was identified as potential biomarker for early detection of gastric cancer. *British journal of cancer*, 110(9), pp.2291–2299.
- Zhu, J., Zeng, Y., Xu, C., Qin, H., Lei, Z., Shen, D., Liu, Z. and Huang, J.-A. (2015). Expression profile analysis of microRNAs and downregulated miR-486-5p and miR-30a-5p in non-small cell lung cancer. *Oncology reports*, 34(4), pp.1779–1786.
- Zhu, K., Ding, H., Wang, W., Liao, Z., Fu, Z., Hong, Y., Zhou, Y., Zhang, C.-Y. and Chen, X. (2016). Tumor-suppressive miR-218-5p inhibits cancer cell proliferation and migration via EGFR in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 7(19), pp.28075–28085.
- Zhu, W.-Y. et al. (2014). Differential expression of miR-125a-5p and let-7e predicts the progression and prognosis of non-small cell lung cancer. *Cancer investigation*, 32(8), pp.394–401.
- Zhu, W. and Xu, B. (2014). MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PloS one*, 9(8), p.e103373.
- Zhu, W., Zhou, K., Zha, Y., Chen, D., He, J., Ma, H., Liu, X., Le, H. and Zhang, Y. (2016). Diagnostic Value of Serum miR-182, miR-183, miR-210, and miR-126 Levels in Patients with Early-Stage Non-Small Cell Lung Cancer. *PloS one*, 11(4), p.e0153046.
- Zhu, Z., Xu, Y., Du, J., Tan, J. and Jiao, H. (2014). Expression of microRNA-218 in human pancreatic ductal adenocarcinoma and its correlation with tumor progression and patient survival. *Journal of surgical oncology*, 109(2), pp.89–94.



## **VII. ANEXOS**



# 1. APROBACIÓN POR EL COMITÉ ÉTICO Y LA COMISIÓN DE INVESTIGACIÓN DE LA INSTITUCIÓN



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comisión de Investigación

## APROBACIÓN PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Esta Comisión tras evaluar en su reunión de 25 de Marzo de 2014 el Proyecto de Investigación:

|         |   |                 |                                 |
|---------|---|-----------------|---------------------------------|
| Título: | Análisis de miRNAs en cancer de pulmón no microcítico |                 |                                 |
| I.P.:   | Sandra Gallach  | Servicio/Unidad | FHGUV (Lab Oncología Molecular) |

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que cumple con los requisitos exigidos por esta Comisión para su realización, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

|            |                               | Presente | Ausente | Disculpa |
|------------|-------------------------------|----------|---------|----------|
| Presidente | Dr. Ricardo Guijarro Jorge    | X        |         |          |
|            | Dr. Julio Cortijo Gimeno      | X        |         |          |
|            | Dra. Goizane Marcaida Benito  | X        |         |          |
|            | Dr. Carlos Sánchez Juan       | X        |         |          |
|            | D. Federico Palomar Llatas    | X        |         |          |
|            | Dr. Emilio López Alcina       | X        |         |          |
| Vocales    | Dr. Alfonso Berrocal Jaime    |          | x       |          |
|            | Dr. Julio Álvarez Pitti       | x        |         |          |
|            | Dr. Miguel Armengot Carceller |          |         | X        |
|            | Dña. Ángela Garrido Bartolomé | x        |         |          |
|            | Dr. Miguel Sanfeliu Giner     |          |         | x        |
|            | Dr. Manuel Navarro Villena    |          |         | x        |
|            | Dra. Amparo Esteban Rebol     |          |         | x        |
| Secretario | D. Carlos Gil Santiago        | x        |         |          |

Lo que comunico a efectos oportunos Viernes 4 de abril de 2014

Fdo. Dr. Ricardo Guijarro Jorge  
Presidente de la Comisión de Investigación:



CI-CHGUV



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

## APROBACIÓN PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN

### - ANEXO 11 -

Este CEIC tras evaluar en su reunión de 25 de junio de 2009 el Proyecto de Investigación:

|         |  |                 |           |
|---------|--|-----------------|-----------|
| Título: | "Micro ARNs con expresión diferencial en cáncer de pulmón no microcítico: Control sobre la angiogénesis" |                 |           |
| I.P.:   | Dr. Carlos Camps   | Servicio/Unidad | Oncología |

Acuerda respecto a esta documentación:

- Que el Proyecto de Investigación y Hoja de Información al Paciente y Consentimiento Informado que se presenta para la convocatoria de proyectos de investigación fundamental orientada a la transmisión de conocimiento a la empresa (TRACE) reúnen las condiciones exigidas por este CEIC, por tanto se decide su APROBACIÓN.

Los miembros que evaluaron esta documentación:

|                         |                                   | Presente |
|-------------------------|-----------------------------------|----------|
| Presidente              | Dr. Severiano Marin               | X        |
| Vocales                 | D. Ernesto Bataller               | X        |
|                         | D. Alejandro Moner                |          |
|                         | D. Juan David Gomez               |          |
|                         | Dr. D. José Manuel Iranzo         |          |
|                         | Dr. D. Miguel Armengot            | X        |
|                         | Dr. D. Julio Cortijo              |          |
|                         | Dra. Dña. Elena Rubio             | X        |
|                         | Dr. D. Gustavo Juan               | X        |
|                         | Dra. Pilar Blasco                 | X        |
|                         | Dña. M <sup>a</sup> Teresa Jareño |          |
|                         | Dra. M <sup>a</sup> José Safont   | X        |
|                         | Dr. José Luis Fayos               | X        |
|                         | Dr. Agustín Herrera               |          |
|                         | Dra. Ana Blasco                   |          |
|                         | Dr. Antonio Martorell             | X        |
|                         | Dr. Aurelio Quesada               |          |
|                         | Dr. Guillermo Sáez                | X        |
|                         | Dr. Fco. Javier Cervera           |          |
| Dr. José Vte. Roig Vila |                                   |          |



Consorcio Hospital General Universitario de Valencia

Comité Ético de Investigación Clínica

|            |                       |   |
|------------|-----------------------|---|
|            | Dr. Rafael Poveda     | X |
|            | Dra. Amparo Yachachi  | X |
|            | Dr. Alberto Berenguer | X |
|            | Dra. Amparo Perez     | X |
|            | Dña. Encarna Domingo  | X |
| Secretario | Dra. Ana Minguez      | X |

Lo que comunico a efectos oportunos:

|   |
|---|
| Fdo. Dr. Severiano Marín (Presidente<br>CEIC) |
|---|



➤ ACLARACIONES:

La tesis análisis de miRNAs en cáncer de pulmón no microcítico fue un subproyecto dentro del proyecto TRA09\_132.



## 2. FINANCIACIÓN

Esta tesis fue financiada por las siguientes instituciones:

- Red temática de Investigación Cooperativa en Cáncer

Proyectos RD06/0020/1024 y RD12/0036/0025

- Ministerio de Ciencia e Innovación

TRA09\_0132 (TRACE 2009)

- Beca Roche-Oncohematología

- CIBEROnC (CIBER Oncología)

CB16/12/00350

## 3. COMUNICACIONES A CONGRESOS NACIONALES E INTERNACIONALES

- Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Silvia Calabuig-Fariñas, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Miguel Martorell, Carlos Camps. **Prognostic role of miRNAs in resectable non-small cell lung cancer.** AACR 106<sup>th</sup> Annual Meeting 2015, Philadelphia, EEUU. April 18-22, 2015.

Publicación: Cancer Research. Vol 75, Supplement, Abstr 4010. Aug 2015.

- Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Silvia Calabuig, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Eva Garcia del Olmo, Miguel Martorell, Carlos Camps. **Prognostic signature of miRNAs in resectable non-small cell lung cancer.** 15th ASEICA International Congress. Sevilla, Spain. 21- 23 October 2015. Publicado en Abstracts' book B51

- Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Silvia Calabuig, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Enrique Pastor, Miguel Martorell, Carlos Camps. Poster. **Valor pronóstico de miRNAs en Adenocarcinoma de pulmón reseado.** XV Congreso SEOM. Madrid. 28-30 Octubre 2015. Ganador del premio al mejor Póster. Publicado en el libro de comunicaciones P177.

➤ Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Silvia Calabuig, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Miguel Martorell, Carlos Camps. **Prognostic value of miRNAs in resected lung adenocarcinomas**. Poster. 51<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, Illinois, USA. May 29-June 2, 2015.

Publicación: J. Clin. Oncol. Vol 33, Issue 15s (Supplement), 2015: abstract 7532. Proceedings

➤ Sandra Gallach Garcia, Silvia Calabuig-Fariñas, Eloisa Jantus-Lewintre, David Montaner, Eva Escorihuela, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Carlos Camps. **Upregulated miRNA 21 in KRAS mutated patients is related to prognosis in resectable NON-SMALL CELL LUNG CANCER**. European Lung Cancer Conference (ELCC). Geneva, Switzerland. 15-18 April 2015.

Publicación: Journal of Thoracic Oncology. Vol 26, Supplement , S779, Abstr 44P. Apr 2015.

➤ Aminta Isabel Martínez Maradiaga, Eva García Del Olmo, Cora Andrea Sampedro Salinas, Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Enrique Pastor Martínez, Antonio Arnau Obrer, Carlos Camps, Ricardo Guijarro Jorge. **Perfil de MiRNA en CPNM reseccable sometido a multiplex NGS. Implicaciones pronosticas**. Póster. 48º Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). 5 al 8 de Junio, Gran Canaria, 2015.

➤ S. Gallach, S. Calabuig-Fariñas, E. Jantus-Lewintre, D. Montaner, E. Escorihuela, J. Castellano, S. Figueroa, A. Blasco, C. Hernando, R. Guijarro, C. Camps. **MiRNAs related to KRAS mutational status in resectable non-small cell lung cancer**. Poster. 26<sup>th</sup> EORTC – NCI – AACR Symposium on Molecular Targets and Cancer Therapeutics. Barcelona, Spain, 18 – 21 November 2014.

Publicación: European Journal of Cancer. Vol, 50. Sup, 6, Nov 2014. Proceedings Book. 545 POSTER (Board P117)

➤ Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Silvia Calabuig, David Montaner, Rafael Sirera, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Enrique Pastor, Miguel Martorell, Carlos Camps. **MiRNA profiling in resectable NSCLC by multiplex NGS. Prognostic implications**.

Poster. IV encuentro científico de Jóvenes Investigadores de la RTICC. 23 de Septiembre, Salamanca, 2014. Publicación: Libro del congreso, P-11

➤ Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, Silvia Calabuig, David Montaner, Marta Usó, Elena Sanmartín, Rafael Sirera, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Miguel Martorell, Carlos Camps. **MiRNA profiling by NGS in resectable non-small cell lung cancer. Prognostic implications.** Poster. 50<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, Illinois, USA. May 30-June 3, 2014.

Publicación: J. Clin. Oncol. Vol 32, 15s (Supplement), 2014: abstract 7559. Proceedings

➤ Sandra Gallach García, Eloisa Jantus-Lewintre, Ana Blasco, Eva Escorihuela, Santiago Figueroa, Cristina Hernando, Rut Lucas, Rafael Sirera, Ricardo Guijarro, Carlos Camps. **KRAS mutations in resectable NSCLC patients. Prognostic implications.** **Poster.** IASLC: 15<sup>th</sup> World Conference on Lung Cancer. Sydney, Australia. 27<sup>th</sup>-31<sup>st</sup> October 2013.

Publicación: Journal of Thoracic Oncology. Vol, 8, supplement 2, S489, Abstr P1.06-030. Nov 2013.

➤ Sandra Gallach García, Eloisa Jantus-Lewintre, Marta Usó, David Montaner, Nieves Martínez Chanza, Cristina Hernando, Alfonso Berrocal, Ana Blasco, Carlos Camps. **Perfil de miRNAs en CPNM reseccable mediante secuenciación de alto rendimiento. Análisis de expresión diferencial.** Poster expuesto. XIV Congreso Nacional SEOM. Salamanca, España. 23-25 Octubre 2013. Libro de Resúmenes de Comunicaciones SEOM 2013, PD-8, p115-116.

➤ Sandra Gallach, Eloisa Jantus-Lewintre, David Montaner, Marta Usó, Elena Sanmartín, Rafael Sirera, Ana Blasco, Ricardo Guijarro, Miguel Martorell, Carlos Camps. **Multiplexed NGS for miRNA profiling in resectable non-small cell lung cancer.** Comunicación oral. 14<sup>th</sup> ASEICA INTERNATIONAL CONGRESS. Spanish Society for Cancer Research. Madrid, Spain. 23<sup>rd</sup>-25<sup>th</sup> September 2013.

Publicación: Clin and Transl Oncol. Vol.15. Extra 1. p 87. Sep 2013

➤ Jesus Martínez Baños, Eva Garcia del Olmo, Aminta Isabel Martínez Maradiaga, Antonio Arnau Obrer, Santiago Figueroa almázar, Enrique Pastor Martínez, Eloísa Jantus Lewintre, Rafael Sirera, Carlos Camps Herrero, Sandra Gallach, Ricardo Guijarro Jorge. **Estudio del microRNAoma del Cáncer de Pulmón no Microcítico en estadios iniciales mediante técnica de secuenciación masiva**. Poster. 46 Congreso Nacional de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica (SEPAR). Barcelona, España. 14-17 Junio 2013.

➤ Gallach S, Jantus-Lewintre E, Usó M, Figueroa S, Montaner D, Martínez Chanza N, Hernando C, Camps C. **High throughput sequencing for miRNAome characterization in early stages NSCLC: Differential expression analysis**. Póster. P-26 del libro de comunicaciones. 3º Encuentro de Jóvenes investigadores de la RTICC 2012. Barcelona, 19 y 20 Noviembre 2012.

➤ Gallach, Sandra; Jantus-Lewintre, Eloisa; Montaner, David; Uso, Marta; Sanmartin, Elena; Sirera, Rafael; Blasco, Ana; Guijarro, Ricardo; Martorell, Miguel; Camps, Carlos. **MiRNA profiling in resectable NSCLC by multiplex next-generation sequencing**. Póster. 2012 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO), Chicago, Illinois, USA. July 1-5, 2012.

Publicación: J. Clin. Oncol. Vol 30, (Supplement), 2012: abstract 7060. Proceedings.

#### 4. PUBLICACIONES

➤ Gallach S, Jantus-Lewintre E, Calabuig-Fariñas S, Montaner D, Alonso S, Sirera R, Blasco A, Usó M, Guijarro R, Martorell M, Camps C. **MicroRNA profiling associated with non-small cell lung cancer: next generation sequencing detection, experimental validation, and prognostic value**. Oncotarget. 2017 Jun 22. doi: 10.18632/oncotarget.18603. IF: 5.168.

➤ Sandra Gallach, Silvia Calabuig-Fariñas, Eloisa Jantus-Lewintre, and Carlos Camps. **MicroRNAs: Promising New Antiangiogenic Targets in Cancer**. Biomed Res Int. Volume 2014, Article ID 878450. IF: 2.706.

# MicroRNA profiling associated with non-small cell lung cancer: next generation sequencing detection, experimental validation, and prognostic value

Sandra Gallach<sup>1,2</sup>, Eloisa Jantus-Lewintre<sup>1,2,3</sup>, Silvia Calabuig-Fariñas<sup>1,2,4</sup>, David Montaner<sup>5</sup>, Sergio Alonso<sup>6</sup>, Rafael Sirera<sup>2,3</sup>, Ana Blasco<sup>2,7</sup>, Marta Usó<sup>1</sup>, Ricardo Guijarro<sup>8,9</sup>, Miguel Martorell<sup>4,10</sup> and Carlos Camps<sup>1,2,7,11</sup>

<sup>1</sup> Molecular Oncology Laboratory, Fundación Investigación, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red de Cáncer

<sup>3</sup> Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, Valencia, Spain

<sup>4</sup> Department of Pathology, Universitat de València, Valencia, Spain

<sup>5</sup> Department of Computational Genomics, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia, Spain

<sup>6</sup> Program of Predictive and Personalized Medicine of Cancer, Institut de Reserca Germans Trias i Pujol (PMPPC-IGTP), Badalona, Spain

<sup>7</sup> Department of Medical Oncology, Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain

<sup>8</sup> Department of Surgery, Universitat de València, Valencia, Spain

<sup>9</sup> Department of Thoracic Surgery, Hospital General Universitario de Valencia Valencia, Spain

<sup>10</sup> Department of Pathology, Hospital General Universitario de Valencia Valencia, Spain

<sup>11</sup> Department of Medicine, Universitat de València, Valencia, Spain

**Correspondence to:** Eloisa Jantus-Lewintre, **email:** jantus\_elo@gva.es

Carlos Camps Herrero, **email:** camps\_car@gva.es

**Keywords:** microRNAs, NSCLC, NGS, profiling, prognosis

**Received:** May 09, 2017

**Accepted:** June 09, 2017

**Published:** June 22, 2017

Copyright: Sandra Gallach et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC-BY), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

## ABSTRACT

**Background :** The average five-year survival index for non-small cell lung cancer (NSCLC) patients is approximately 15%. Emerging evidence indicates that microRNAs constitute a new class of gene regulators in humans that may play an important role in tumorigenesis. Hence, there is growing interest in studying their role as possible new biomarkers whose expression is aberrant in cancer. Therefore, in this study we identified deregulated miRNAs by next generation sequencing (NGS) and analyzed their prognostic value.

**Methods :** Sequencing by oligo ligation detection technology was used to identify dysregulated miRNAs in a training cohort comprising paired tumor/normal tissue samples ( $N = 32$ ). We validated 22 randomly selected differentially-expressed miRNAs by quantitative real time PCR in tumor and adjacent normal tissue samples ( $N = 178$ ). Kaplan-Meier survival analysis and Cox regression were used in multivariate analysis to identify independent prognostic biomarkers.

**Results :** NGS analysis revealed that 39 miRNAs were dysregulated in NSCLC: 28 were upregulated and 11 were downregulated. Twenty-two miRNAs were validated in an independent cohort. Interestingly, the group of patients with high expression of both miRNAs (miR-21<sup>high</sup> and miR-188<sup>high</sup>) showed shorter relapse-free survival (RFS) and overall survival (OS) times. Multivariate analysis showed that this miRNA combination is an independent prognostic marker for RFS and OS ( $p = 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively).

**Conclusions:** NGS technology can specifically identify dysregulated miRNA profiles

**in resectable NSCLC samples. MiR-21 or miR-188 overexpression correlated with a negative prognosis, and their combined signature may represent a new independent prognostic biomarker for RFS and OS.**

## INTRODUCTION

Lung cancer is the leading cause of death from cancer worldwide, with an incidence of more than a million of cases annually [1]. Even though outcomes for patients at all lung cancer stages have improved in recent years, its survival rate remains very poor [2, 3]. Surgery is the only potentially curative treatment for early-stage non-small cell lung cancer (NSCLC) patients. However, there are also many cases that remain uncured following surgery. In fact, 30% to 55% of patients with NSCLC relapse and die from their disease despite curative resection [4, 5]. Hence, there is an urgent need for new biomarkers for this disease which can be used in clinical practice, and accordingly, more studies are also required to identify and validate these new prognostic and diagnostic biomarkers in lung cancer [6-8].

MicroRNAs (miRNAs) are a class of small highly-conserved, non-coding RNAs that were discovered in the early 1990s, and are approximately 18-25 nucleotides long [9-12]. These molecules are important post-transcriptional gene expression regulators related to fundamental processes such as cellular proliferation, differentiation, development, and apoptosis [13]. Altered miRNA levels have been described in several pathologies, including cancer [14-17], and several different studies have suggested that miRNAs could be useful as diagnostic and prognostic biomarkers in lung cancer [18-20]. Additionally, microRNAs have also involved in resistance to chemotherapy and novel targeted agents in non-small cell lung cancer [21]. Furthermore, emerging technologies such as next generation sequencing (NGS) have shown great potential as a platform for small RNA analysis and its use is now being extended to find novel cancer biomarkers.

Therefore, in the context of the above, the aim of this study was to analyze the miRNAome using NGS to characterize dysregulated miRNAs in a large cohort of resectable NSCLC patients, in order to establish expression profiles associated with prognosis in this disease, thus allowing patients with highest risk of relapse to be distinguished.

## RESULTS

The main clinicopathological characteristics of the training ( $N = 32$  patients) and validation ( $N = 178$  patients) sets including age, gender, stage of disease, and histology are summarized in Table 1. The median follow-up was 81.2 [0.5-110] and 81.2 [1-113] months for training and validation sets, respectively.

## Differential microRNA expression by NGS

Annotation analyses of small RNA biotypes revealed that 88.62% of the small RNAs found were miRNAs. Furthermore, when miRNA annotation was analysed, 940 mature miRNAs had expression in one sample at least. Differential expression analysis was performed to this universe of 940 miRNAs. Analysis of principal components revealed to have two differentiated sample groups in our training cohort corresponding to tumoral and normal samples.

39 miRNAs were dysregulated in tumor compared to normal samples: 28 were upregulated and 11 downregulated (Table 2). However, differentially-expressed miRNAs were not found when we compared these data with clinicopathological variables. Supervised hierarchical clustering analysis of these differentially-expressed miRNAs revealed two groups of accurately-defined samples (normal and tumor tissues) according to their miRNA expression profile (Figure 1).

## Functional analyses

*In silico* functional studies, based on computational analyses from 39 miRNA found dysregulated in this study, showed several biological processes (bp) of GO terms significantly related to lung, such as, respiratory system development, lung development, respiratory tube development, which seems to indicate that these differentially expressed miRNAs could be tissue specific. Furthermore, response to growth factor stimulus and cellular response to growth factor stimulus GO terms were found enriched in this analysis. This fact is in concordance with the increase in cellular growth during carcinogenesis (Table 3). In addition, functional analyses were performed with the prognostic value miRNAs (miR-21 and miR-188), where target gene enrichments were carry out. Analyses showed an elevated number of target genes for both miRNAs related to essential pathways in carcinogenesis process (Supplemental Figure 1).

## MicroRNA expression validation

From the 39 differentially-expressed miRNAs, seven presented an average of fewer than 30 counts and so were excluded from the validation analysis. Twenty-two miRNAs were randomly selected for validation in an independent cohort of patients ( $N = 178$ ). The Wilcoxon signed-rank test, confirmed that there were statistically

significant differences in the expression of these miRNAs between tumor and normal adjacent lung tissue with the exception of miR-125a (Table 2A-2B).

### Prognostic value of microRNAs

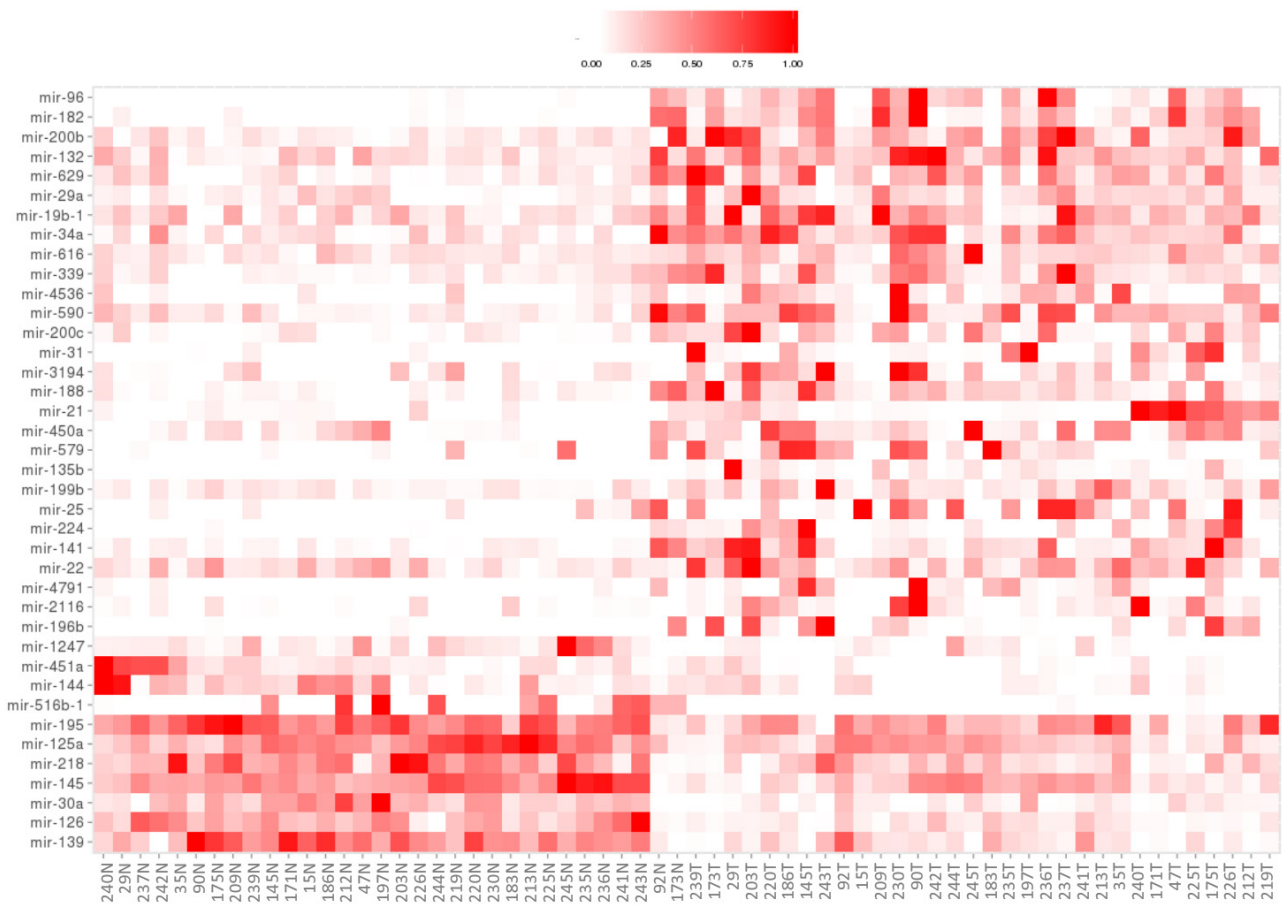
Of the 22 miRNAs analyzed, only miR-21-5p and miR-188-5p had any prognostic value: higher expression of these miRNAs was significantly correlated with shorter RFS (24.03 vs. 56.83 months,  $p = 0.042$  and 23.67 vs. 66.97 months,  $p = 0.009$ , respectively) and OS (42.60 vs. 82.60 months,  $p = 0.043$  and 42.90 vs. 81.23 months,  $p = 0.002$ , respectively) (Table 4, Figure 2A-2B). According to these results, and in order to better assess the prognosis of patients, we also considered the combination of these two microRNAs. Interestingly, patients with high expression of both miRNAs (miR-21<sup>high</sup> and miR-188<sup>high</sup>) had shorter RFS and OS times ( $p = 0.006$  and  $p = 0.0006$ , respectively) (Table 4, Figure 2C).

### Multivariate Cox regression analysis

To determine which analyzed variables had an independent impact on the lung cancer prognosis in our cohort, we performed multivariate analysis. The Clinical and experimental variables included were all those that were statistically significant in the univariate analysis. *KRAS* status was an independent prognostic variable for RFS according to the Cox regression model ( $p = 0.020$ ) and the signature (miR-21<sup>high</sup> and miR-188<sup>high</sup>) was an independent poor prognostic biomarker for RFS ( $p = 0.001$ ) and OS ( $p < 0.0001$ ) (Table 4).

### Prognostic signature validation

Data from TCGA for Squamous lung Cancer (LUSC) and lung adenocarcinoma (LUAD) patients was used for *in silico* validation of the miRNA signature.



**Figure 1: Supervised hierarchical clustering analysis of differentially-expressed miRNAs.** The level of miRNA expression is color-coded by intensity: white squares represents lower miRNA expression and red squares higher expression in tumor tissue compared with adjacent normal tissue

**Table 1: Clinicopathological characteristics of the patients**

|                                 | Training set |      | Validation set |      | In silico set |      |
|---------------------------------|--------------|------|----------------|------|---------------|------|
|                                 | N= 32        | %    | N=178          | %    | N=618         | %    |
| Age at surgery (median, range): | 64 [47-82]   |      | 65 [26-85]     |      | 68 [38-88]    |      |
| Gender                          |              |      |                |      |               |      |
| Male                            | 26           | 81.2 | 154            | 85.5 | 352           | 56.9 |
| Female                          | 6            | 18.8 | 24             | 13.5 | 266           | 43.1 |
| Stagea                          |              |      |                |      |               |      |
| I                               | 17           | 53.1 | 105            | 59   | 350           | 56.6 |
| II                              | 6            | 18.8 | 35             | 19.7 | 179           | 28.8 |
| IIIA                            | 9            | 28.1 | 38             | 21.3 | 90            | 14.6 |
| Histology                       |              |      |                |      |               |      |
| SCC                             | 13           | 40.6 | 84             | 47.2 | 279           | 45.1 |
| ADC                             | 19           | 59.4 | 74             | 41.6 | 339           | 54.9 |
| Others                          |              |      | 20             | 11.2 |               |      |
| Performance Status              |              |      |                |      |               |      |
| 0                               | 22           | 68.8 | 118            | 66.3 | NS            | NS   |
| 1-2                             | 10           | 31.2 | 60             | 33.7 |               |      |
| Differentiation grade           |              |      |                |      |               |      |
| Poor                            | 10           | 31.2 | 43             | 24.2 | NS            | NS   |
| Moderate                        | 12           | 37.5 | 77             | 43.2 |               |      |
| Well                            | 7            | 21.9 | 31             | 17.4 |               |      |
| NS                              | 3            | 9.4  | 27             | 15.2 |               |      |
| Smoking Status                  |              |      |                |      |               |      |
| Current                         | 16           | 50   | 86             | 48.3 | NS            | NS   |
| Former                          | 8            | 25   | 72             | 40.5 |               |      |
| Never                           | 8            | 25   | 20             | 11.2 |               |      |
| Relapse                         |              |      |                |      |               |      |
| No                              | 20           | 62.5 | 98             | 55.1 | 373           | 60.4 |
| Yes                             | 12           | 37.5 | 80             | 44.9 | 33            | 5.3  |
| NS                              |              |      |                |      | 212           | 34.3 |
| Dead                            |              |      |                |      |               |      |
| No                              | 19           | 59.4 | 102            | 57.3 | 462           | 74.8 |
| Yes                             | 13           | 40.6 | 76             | 42.7 | 156           | 25.2 |

ADC, adenocarcinoma; SCC, squamous cell carcinoma; NS, non-specified.  
a according to the American Joint Committee on Cancer staging manual (TNM 6)

Clinicopathological characteristics of these patients are summarized in Table 1. The analyses confirmed that both miR-21 and miR-188 were significantly overexpressed in tumor tissues ( $p < 0.0001$ ). Patients with post-surgical complications were excluded from the survival analysis, and only those patients who had at least 1 month of follow up were included ( $N = 496$ ). Analysis revealed a poor prognosis for OS in patients with high levels of miR-21 (37.86 vs 59.66 months,  $p = 0.020$ ) (Figure 2D); however miR-188 did not show prognostic value in the group of TCGA patients. RFS analysis was not carried out as the data for disease status was not specified in many of the patients.

## DISCUSSION

MicroRNAs have been shown to play an important role in the tumorigenesis and development of NSCLC. However, few studies characterize the profiles of miRNAs in paired tumor and adjacent normal tissue samples at the same time. In our study, the microRNAome was assessed in a large cohort (training set = 32 and validation set = 178, respectively) of resectable NSCLC patients, who long-term follow-ups were available, thus strengthening the analysis. Additionally, this study presents the useful application of deep next generation sequencing technology for profiling miRNAs in resectable lung tumor specimens. Some similar studies have been performed using different microarray platforms [22, 23], ours being one of the first to



**Table 2: MicroRNAs dysregulated in tumor samples compared to normal samples and Wilcoxon test results for validated microRNAs. A) MicroRNAs upregulated and B) MicroRNAs downregulated.**

| <b>A) MicroRNAs upregulated</b>   |             |           |                |               |                |
|-----------------------------------|-------------|-----------|----------------|---------------|----------------|
| <b>Name</b>                       | <b>NGS</b>  |           |                |               | <b>RTqPCR</b>  |
|                                   | <b>stat</b> | <b>FC</b> | <b>p-value</b> | <b>p-adj§</b> | <b>p-value</b> |
| miR-96                            | 4.750       | 5,85      | 0              | 0             |                |
| miR-182*                          | 3.921       | 3,70      | 0              | 0.009         | <0.001         |
| miR-200b                          | 3.882       | 2,56      | 0              | 0.010         |                |
| miR-132                           | 3.830       | 2,08      | 0              | 0.011         |                |
| miR-629                           | 3.671       | 2,31      | 0              | 0.019         |                |
| miR-29a*                          | 3.624       | 2,30      | 0              | 0.020         | <0.001         |
| miR-19b-1*                        | 3.615       | 2,10      | 0              | 0.020         | <0.001         |
| miR-34a*                          | 3.499       | 2,20      | 0              | 0.026         | <0.001         |
| miR-616                           | 3.465       | 1,83      | 0.001          | 0.026         |                |
| miR-339*                          | 3.394       | 2,26      | 0.001          | 0.029         | <0.001         |
| miR-4536                          | 3.389       | 4,00      | 0.001          | 0.029         |                |
| miR-590*                          | 3.376       | 2,12      | 0.001          | 0.029         | <0.001         |
| miR-200c                          | 3.375       | 2,93      | 0.001          | 0.029         |                |
| miR-31*                           | 3.366       | 8,99      | 0.001          | 0.029         | <0.001         |
| miR-3194                          | 3.360       | 3,45      | 0.001          | 0.029         |                |
| miR-188*                          | 3.340       | 2,54      | 0.001          | 0.030         | <0.001         |
| miR-21*                           | 3.301       | 4,85      | 0.001          | 0.034         | <0.001         |
| miR-450a                          | 3.243       | 2,42      | 0.001          | 0.039         |                |
| miR-579                           | 3.235       | 4,37      | 0.001          | 0.039         |                |
| miR-135b*                         | 3.206       | 6,63      | 0.001          | 0.042         | <0.001         |
| miR-199b*                         | 3.180       | 2,05      | 0.001          | 0.043         | <0.001         |
| miR-25                            | 3.164       | 4,34      | 0.002          | 0.043         |                |
| miR-224                           | 3.160       | 5,59      | 0.002          | 0.043         | <0.001         |
| miR-141                           | 3.158       | 2,72      | 0.002          | 0.043         |                |
| miR-22                            | 3.153       | 1,84      | 0.002          | 0.043         |                |
| miR-4791                          | 3.115       | 7,24      | 0.002          | 0.046         |                |
| miR-2116                          | 3.108       | 4,11      | 0.002          | 0.046         |                |
| miR-196b*                         | 3.055       | 7,03      | 0.002          | 0.050         | <0.001         |
| <b>B) MicroRNAs downregulated</b> |             |           |                |               |                |
| <b>Name</b>                       | <b>NGS</b>  |           |                |               | <b>RTqPCR</b>  |
|                                   | <b>stat</b> | <b>FC</b> | <b>p-value</b> | <b>p-adj§</b> | <b>p-value</b> |
| miR-1247                          | -3.144      | -2,89     | 0.002          | 0.043         |                |
| miR-451a*                         | -3.466      | -3,43     | 0.001          | 0.026         | <0.001         |
| miR-144*                          | -3.494      | -2,84     | 0              | 0.026         | <0.001         |
| miR-516b-1                        | -3.535      | -43,319   | 0              | 0.025         |                |
| miR-195*                          | -3.927      | -1,57     | 0              | 0.009         | 0.039          |
| miR-125a*                         | -4.392      | -1,78     | 0              | 0.002         | 0.679          |
| miR-218*                          | -4.467      | -2,06     | 0              | 0.001         | <0.001         |
| miR-145*                          | -4.778      | -1,89     | 0              | 0             | 0.001          |
| miR-30a*                          | -5.141      | -2,81     | 0              | 0             | <0.001         |
| miR-126*                          | -5.795      | -2,75     | 0              | 0             | <0.001         |
| miR-139*                          | -6.477      | -2,93     | 0              | 0             | <0.001         |

FC, fold change

§ p-adj calculated with FDR method

\*miRNAs validated by RTqPCR

**Table 3: Gene-Ontology terms dysregulated by differentially expressed miRNA.** N, number of genes; lor, Log Odds Ratio; pval, p-value; padj, p-value adjusted by multiple test method; pat, pathway; GO, Gene ontology term (biological process)

|            | N   | lor      | pval     | padj     | pat | GO  |
|------------|-----|----------|----------|----------|-----|---|
| GO:0007517 | 306 | 0,258453 | 9,59E-06 | 0,031571 | 1   | muscle organ development                            |
| GO:0060541 | 151 | 0,34596  | 2,75E-05 | 0,031571 | 1   | respiratory system development                      |
| GO:0070848 | 498 | 0,191793 | 3,24E-05 | 0,031571 | 1   | response to growth factor stimulus                  |
| GO:0071363 | 489 | 0,1885   | 5,12E-05 | 0,031571 | 1   | cellular response to growth factor stimulus         |
| GO:0030324 | 131 | 0,358327 | 5,18E-05 | 0,031571 | 1   | lung development                                    |
| GO:0008543 | 150 | 0,336667 | 5,42E-05 | 0,031571 | 1   | fibroblast growth factor receptor signaling pathway |
| GO:0061061 | 406 | 0,204676 | 5,69E-05 | 0,031571 | 1   | muscle structure development                        |
| GO:0030323 | 134 | 0,348344 | 6,87E-05 | 0,033321 | 1   | respiratory tube development                        |
| GO:0050767 | 336 | 0,215493 | 0,000109 | 0,040653 | 1   | regulation of neurogenesis                          |
| GO:0048015 | 148 | 0,320334 | 0,000126 | 0,040653 | 1   | phosphatidylinositol-mediated signaling             |
| GO:0048017 | 148 | 0,320334 | 0,000126 | 0,040653 | 1   | inositol lipid-mediated signaling                   |
| GO:0044087 | 296 | 0,226529 | 0,000128 | 0,040653 | 1   | regulation of cellular component biogenesis         |
| GO:1901698 | 468 | 0,180575 | 0,000137 | 0,040653 | 1   | response to nitrogen compound                       |
| GO:0010243 | 441 | 0,184938 | 0,000147 | 0,040653 | 1   | response to organonitrogen compound                 |
| GO:0035295 | 381 | 0,197236 | 0,000164 | 0,042486 | 1   | tube development                                    |
| GO:0030510 | 56  | 0,502461 | 0,000201 | 0,045892 | 1   | regulation of BMP signaling pathway                 |
| GO:0033238 | 42  | -0,55751 | 0,000193 | 0,045892 | -1  | regulation of cellular amine metabolic process      |

analyze dysregulated miRNAs in fresh frozen tumor and adjacent normal samples of a large cohort of characterized NSCLC patients using SOLiD technology.

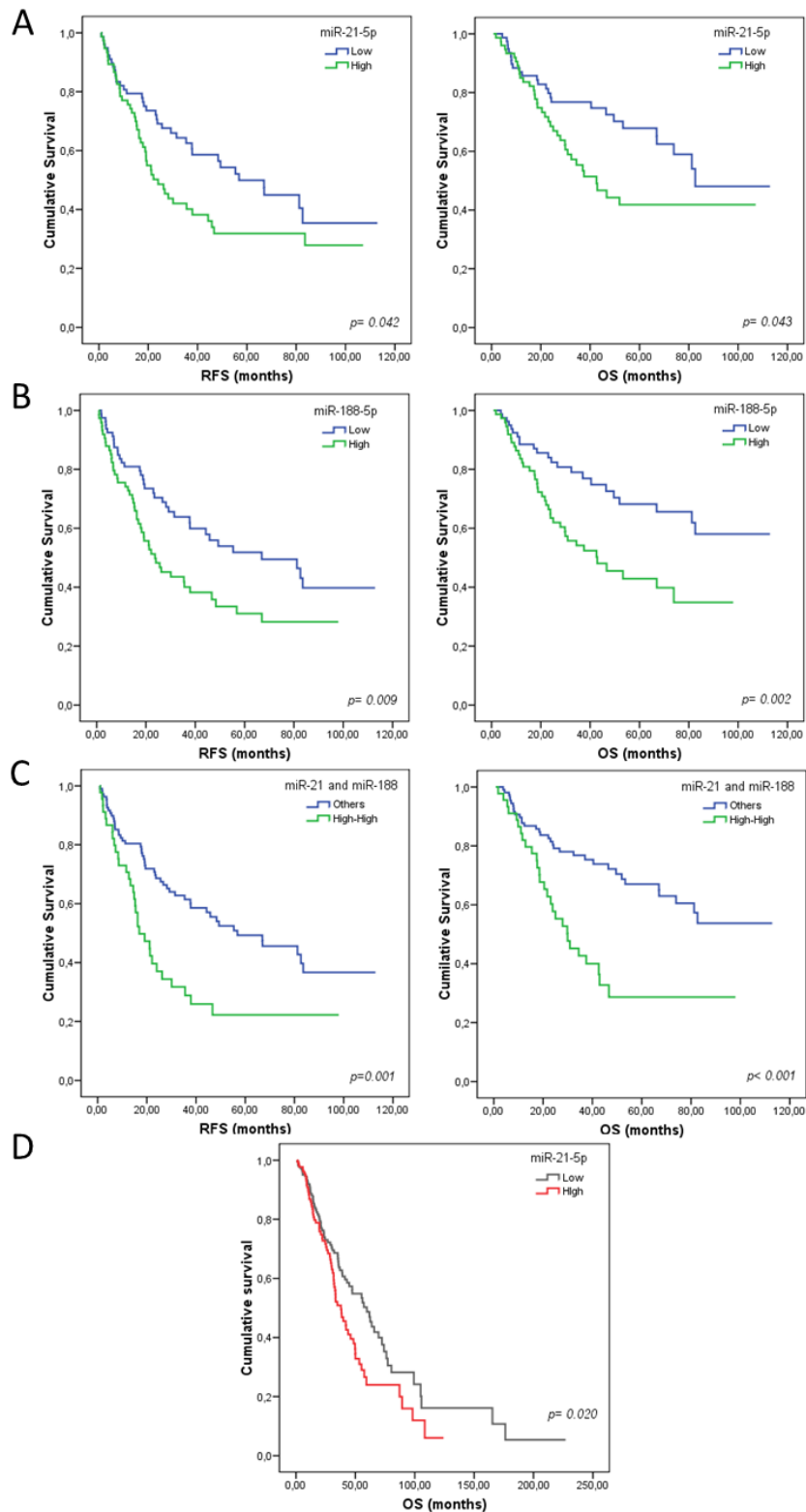
NGS technology allows the whole microRNAome of each sample to be analyzed with high sensitivity, a wide dynamic range, high accuracy, and extraordinary technical reproducibility [24, 25]. In the cancer research context, NGS technology is especially useful compared to other methodologies because it allows the detection of miRNAs not yet described [24, 26, 27]. However, there are some limitations in using NGS, including its high cost and the large amounts of data it produces. Nonetheless, the development of new platforms using barcodes, are now becoming available. This allow several samples to be multiplexed into a single run [28], and is contributing to a continuing cost reduction and new bioinformatics tools for analyzing and interpreting these complex data sets [27, 29].

Of the 39 dysregulated miRNAs in the training set, 22 miRNAs were validated using RTqPCR, which is considered one of the gold standard techniques for gene expression analyses due to its sensitivity and robustness requiring minimal amounts of RNA [30-32]. Functional analyses of these dysregulated miRNAs shown an enrichment of several biological processes related to lung specifically, such as, respiratory system development, lung development, respiratory tube development, which seem to indicate that these differentially expressed miRNAs could be tissue specific. Interestingly, other biological processes, related to cellular response to growth factor

stimulus were found enriched in this analysis as well. This fact is in concordance with an increased growth cell in carcinogenesis process.

Regarding the analyzed miRNAs, the overexpression of miR-182, miR-31, miR135b, miR-199b, miR-224 and miR-196b and miR-34a have been detected in both the training and validation set. Extensive profiling studies have connected dysregulated levels of miR-182 with several cancer types, including NSCLC [33]. Furthermore, miR-182 may function as an oncogenic miRNA to enhance cancer cell proliferation, survival, aggressiveness, tumorigenesis, and drug resistance [34-36]. Some targets of miR-182 are involved in repaired DNA [37] and others are tumor suppressor genes such as *PTEN* and *TP53* (miRTarBase data). A meta-analysis in various cancers has shown the overexpression of miR-31 [38], which was overexpressed in early stages, and expression was high in tumor progression and reached higher levels in advanced stages. MiR-31 has been shown to act as an oncogenic miRNA by targeting specific tumor suppressors, including the large tumor suppressor 2 (*LATS2*) and PP2A regulatory subunit B alpha isoform (*PPP2R2A*) [39]. An analysis of the predicted targets of miR-31 found a relationship between this miRNAs and the initiation, progression and treatment response of lung cancer through the cell cycle, the cytochrome P450 pathway, metabolic pathways, apoptosis, the chemokine signaling pathway, and the MAPK signaling pathway [40].

A few studies have described miR-135b and its relationship in NSCLC, but only Lin et al. have found



**Figure 2: Kaplan-Meier curves for overall survival (OS) and relapse-free survival (RFS) according to miRNA expression for patients with resected non-small cell lung cancer (NSCLC).** Figures A and B show OS and RFS for miR-21-5p and miR-188-5p, respectively in the validation set. Figure C shows the significant correlation between the combined variable, high expression of both miRNAs (miR-21high and miR-188high), with shorter OS and RFS times in validation set. Figure D shows OS and RFS for miR-21 in the *in silico* set. Continuous variables were dichotomized as high ( $\geq$  median) and low ( $<$  median), using the median relative expression of each gene as a cutoff. Statistics were calculated using the log-rank test, and the significance was set at  $p < 0.05$ .

**Table 4: Univariate (log-rank test) and multivariate (Cox regression model) analyses for RFS and OS**

| Variable   | Univariate      |                       |                 |                       | Multivariate |             |          |       |             |          |
|--|-----------------|-----------------------|-----------------|-----------------------|--------------|-------------|----------|-------|-------------|----------|
|  | RFS             |                       | OS              |                       | RFS          |             |          | OS    |             |          |
|  | Median (months) | <i>p</i> <sup>§</sup> | Median (months) | <i>p</i> <sup>§</sup> | HR           | 95% CI      | <i>p</i> | HR    | 95% CI      | <i>p</i> |
| <b>miR-21-5p</b> (high vs. low)  | 24.03 vs. 56.83 | 0.042                 | 42.60 vs. 82.60 | 0.043                 | --           | --          | --       | --    | --          | --       |
| <b>miR-188-5p</b> (high vs. low)   | 23.67 vs. 66.97 | 0.009                 | 42.90 vs. NR    | 0.002                 | --           | --          | --       | --    | --          | --       |
| <b>Combined miRNAs</b> (miR-21 <sup>high</sup> vs. miR-188 <sup>high</sup> vs. other combinations) | 16.97 vs. 56.83 | 0.001 (0.006)*        | 29.90 vs. NR    | < 0.0001 (< 0.0006)*  | 2.170        | 1.372-3.431 | 0.001    | 3.256 | 1.907-5.561 | <0.0001  |
| <b>KRAS Status</b> (mutated vs. WT)  | 16.97 vs. 46.67 | 0.034                 | 27.90 vs. NR    | 0.038                 | 2.076        | 1.215-3.831 | 0.020    |       |             |          |
| <b>Lymph node involvement</b> (yes vs. no)   | 26.23 vs. 48.33 | 0.029                 | --              | --                    | --           | --          | --       | --    | --          | --       |

§ *p*-value was calculated using the log-rank test. \* *p*-values with Bonferroni corrections are shown in parentheses. CI, confidence interval; HR, hazard ratio; NR, not-reached; OS, overall survival; RFS, relapse-free survival.

upregulated miR-135b in invasive NSCLC cells [41]. Other studies in different cancer types have found an overexpression in miR-135b [42, 43]. MiR-135b expression enhances cancer cell invasive and migratory abilities *in vitro* and promotes cancer metastasis *in vivo* by targeting multiple key components on the Hippo pathway, including *LATS2*, *BTRCP* and *NDR2*, as well as *LZTS1* [41]. Regarding miR-224, some studies in the same type [44] and different types of cancer support our results [45, 46]. MiR-224 functions as an oncogene in NSCLC by directly targeting *TNFAIP1* and *SMAD4*. Caspase 3 (*CASP3*) and caspase 7 (*CASP7*) are targets of miR-224 in NSCLC, and miR-224 partly promotes lung cancer cells proliferation and migration by directly targeting *CASP7* and downregulating its expression; miR-224 attenuates *TNF-α* induced apoptosis by directly targeting *CASP3*, which results in a reduced cleaved *parp1* expression in lung cancer cells and suggests a oncogenic role for miR-224 in lung cancer pathogenesis [47]. Two studies in lung cancer tissues and lung adenocarcinomas support our data about miR-196b [48, 49]. The same results have been found in different cancer types [50]. *HOXA9* has been suggested to act as a target of miR-196b by playing a central role in controlling the aggressive behavior of lung cancer cells [49]. Unexpectedly, miR-34a was found upregulated in the training and validation set. MiR-34a has been reported to be down-regulated in NSCLC [51] other cancer types and to work as tumor suppressor miRNA. Considering all these results, more studies need to be performed in more extended cohorts of patients to be able to better understand the function of miR-34a in NSCLC.

The down-regulation of miR-451a, miR-144, miR-195, miR-218, miR-145, miR-30a, miR-126 and miR-139 has been found in both the training and validation set. Two

meta-analyses in NSCLC have demonstrated the reduced expression of these eight miRNAs in tumor [52, 53]. *AKT* and oncogene *MYC* have been described as targets, and a role of miR-451a in the carcinogenesis process has been shown [54]. The met proto-oncogene (*MET*), which is often amplified in human cancers and functions as an important regulator of cell growth and tumor invasion, has been identified as a direct target of miR-144 [55]. MiR-195 overexpression inhibits ACHN cell viability, migration, and invasion, and also induces cell apoptosis by targeting *VEGFR2* via the PI3K/AKT and Raf/MEK/ERK signaling pathways, which indicates that miR-195 plays a tumor suppressive role [56]. Studies *in vitro* have shown an anti-cancer function of miR-218, and the down-expression of miR-218 increases myocyte enhancer factor 2D (*MEF2D*) levels by promoting lung cancer growth [57], and by inhibiting NSCLC proliferation and metastasis *via* by downregulating *CDCP1* [58]. The down-regulation of miR-218 increases epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in lung cancer by targeting Slug/ZEB2 signaling [59]. *In vitro* analyses have shown a tumor suppressor role of miR-145, where miR-145 inhibits *TGF-β*-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion through the repression of *SMAD3* and *TGFBR2* in NSCLC cells [60, 61]. Besides, miR-145 inhibits the migration and invasion of lung cancer cells *via* fascin homolog 1 (*FSCN1*) downregulation [62] and cell growth is inhibited by miR-145, while *MYC* has been shown to be a direct target for miR-145 [63]. MiR-30a overexpression in lung tumor culture cells inhibits migration and cell invasion, and partially attributes to lower *EYA2* expression [64] and influences NSCLC progression through the PI3K/AKT signaling pathway by targeting *IGFIR* [65]. MiR-126 is known to play a critical role in the angiogenesis process

[17, 66]. Furthermore *in vitro* analyses have shown that miR-126 overexpression in the NSCLC line cell inhibits cell growth through different gene targets, including *CRK*, *EGFL7* and *PIK3R2* [67-69]. Deregulated miR-139 expression has been reported in some human tumor types. Analyses *in vitro* and *in vivo* have demonstrated miR-139-5p suppressed tumor growth and directly targeted *MET*, which could be a possible mechanism by which miR-139-5p regulates growth and the metastatic potential [70].

Other miRNAs such as miR-29a, miR-199-5p, miR-339-5p, miR-590-5p and miR-19b-1 are overexpressed in both the training and validation set, but have barely been described in cancer in general and in NSCLC in particular. Only one study in lung adenocarcinoma has identified miR-29a overexpression in a paired-sample analysis (tumor and normal from the same patients) [71]. Regarding miR-199-5p, only one study in lung cancer and miRNA changes related to asbestos has reported the same results [72]. MiR-339-5p overexpression has been reported in a study performed in the peripheral blood of 100 individuals which included 86 patients with predominantly early-stage NSCLC and 24 healthy donors [73]. MiR-590-5p overexpression has not been reported in NSCLC, but studies support our findings in other cancer types [74, 75]. Although miR-19b-1 is not widely described in the literature, miR-19b overexpression was validated in our validation cohort. To support this finding, miR-19b-1 upregulation has been observed in HeLa human cancer cells and in mice lung tumors [76], but no similar study to ours is currently available which detects deregulation in this miRNA. For this reason, more studies are needed to better understand the relationship between these miRNAs and the carcinogenesis process of NSCLC.

In agreement with our findings, miR-21 has been reported to be overexpressed in several solid malignancies [77-79], including lung cancer [80, 81] where several studies in paired tumor and adjacent normal tissue samples in NSCLC showed similar results [18, 71, 82]. Interestingly, different meta-analysis studies performed in many tumor types [83, 84] and which only considered NSCLC [52, 53] confirm this finding. Therefore, *in silico* analyses have shown that miR-21 has large number of genes targets and many of them are directly involved in essential pathways dysregulated in the tumorigenesis process.

The analysis of the prognostic value of dysregulated miRNAs show that higher relative expression of miR-21 and miR-188 is associated with worse outcome in our cohort of resectable NSCLC. These data agreed with the *in silico* study performed on data obtained from the TCGA cohort, confirming the overexpression of both miRNAs in tumor samples compared to normal lung tissues. In the TCGA set, patients with higher expression of miR-21 exhibited shorter OS (37.86 vs 59.66 months,  $p = 0.020$ ). In line with these results, some studies have reported that high levels of miR-21 in either tumor or blood samples

were associated with a negative prognosis in lung cancer patients [15, 83, 85, 86]. Interestingly, Seike et al. described that aberrant miR-21 expression; enhanced by the activated EGFR signaling pathway, played a significant role in lung carcinogenesis in those that never-smoked [82]. Mechanistically, it has been described that overexpression of miR-21 leads to the inhibition of several tumor suppressor genes, such as *PTEN*, *TPMI* and *PDCD4* [87]. Thus, miR-21 seems to be a promising biomarker and is also an interesting therapeutic target whose inhibition may have benefits in NSCLC patients. Recently, a preclinical study in a murine lung cancer model with an anti-miR-21 molecule revealed that treated animals displayed tumor regression or no tumor growth and prolonged survival while compared with the untreated group [88].

Our results obtained in the validation set by RTqPCR also indicated that patients with elevated miR-188 expression in tumor tissue had a shorter RFS ( $p = 0.009$ ) and OS ( $p = 0.002$ ). However, these findings could not be confirmed by *in silico* analysis in the TCGA cohort due to probably technical (pair tumor/normal analysis, NGS vs RTqPCR) and biological (amount of miRNA) differences. Several interpretations can explain this results. Initially, miRNA data expression of patients in our validation cohort was analyzed using RTqPCR while the TCGA validation cohort samples were analyzed by NGS. The different sensitivity between these two techniques could explain, in part, these different results. Otherwise, a distinct concept to calculate relative expression could have influence over them too. In validation set, the relative miRNA expression was calculated as the number of times the tumor tissue expression was higher or lower compared to its paired-normal tissue for each patient (Fold-change) whereas the relative expression of TCGA data was calculated by RPKM. Despite the miRNA profiling techniques have vastly improved in the last years, there are still differences in performance and platform-specific biases that can impact the generated output [28]. Finally, the expression levels of miR-21 were high in normal and tumor samples, due to its constitutive expression, which is frequently upregulated in solid tumours. Therefore, the range RPKM values between high and low normalized was wide, so when dichotomization is performed, patients with higher or lower values from median are clearly defined and Kaplan-Meier analysis shown two well differentiated and significative populations of patients with a clearly different prognosis. In contrast, the expression levels of miR-188 were very low in normal and even in tumor samples. Consequently, the ranges between normalized values were narrow, so when dichotomization is performed, patients with higher or lower values from median were not clearly differentiated and Kaplan-Meier differences found were not significative. This can explain why miR-188 cannot find a prognosis value in TCGA cohort.

There are limited studies analyzing the prognostic

role of miR-188 in cancer [89-91], and in fact none has been found in lung cancer to date. In concordance with our results, in patients with acute myeloid leukemia (cytogenetically-normal), high miR-188 expression has been significantly associated with shorter OS and event-free survival [89]. Although the computational analysis has shown a relationship of miR-188 with the carcinogenesis process, further studies are still needed to clarify the function of this miRNA in carcinogenesis and its prognostic implication in cancer.

Finally, we identified a patient subgroup defined by a combined higher expression levels of miR-21 and miR-188 that exhibited poor outcome and resulted in an independent prognostic factor for RFS (HR: 0.485 [0.313-0.753];  $p = 0.001$ ) and OS (HR 0.389 [0.237-0.638];  $p < 0.0001$ ) in multivariate analysis, suggesting its potential role as biomarker useful for distinguishing patients which could benefit from more exhaustive monitoring.

In summary, the miRNA signature identified in this work may provide new biomarkers for providing early prognoses in NSCLC patients as well as being potentially useful as a therapeutic target for this disease in the near future.

## CONCLUSIONS

This study revealed that the NGS system can accurately detect miRNAs and specifically identify dysregulated miRNAs in resectable NSCLC samples; furthermore, these results were validated in a large independent cohort of patients. Survival analyses showed that miR-21-5p or miR-188-5p overexpression were negative prognostic factors, implicating miR-188 in NSCLC for the first time. Furthermore, the combined signature of these two miRNAs was significantly associated with shorter RFS and OS times and was confirmed by a multivariate analysis as an independent prognostic marker, representing a potential novel negative prognostic biomarker for NSCLC. However, especially considering that the role of miR-188 in NSCLC remains unclear, further studies must be performed in diverse populations and using functional evaluation methods in order to confirm and extend our findings. Given that, to date, very few studies have used paired fresh frozen-tissues, and it would be interesting to extend this study in NSCLC, using a greater number of samples, as well as in other tumor types. We consider our findings to be important in both translational clinical research and in the development of novel miRNA-based cancer therapies.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients and tissue samples

This retrospective study included 32 patients in the training set, and 178 patients in the validation set with NSCLC from the *Consortio Hospital General Universitario de Valencia* who underwent surgery between 2004 and 2013, and who fit the eligibility criteria: resected, non-pretreated stage I to IIIA patients (according to the American Joint Committee on Cancer staging manual) with a histological diagnosis of NSCLC. Tumor and adjacent normal lung specimens were obtained by surgical resection and were preserved in RNA-later at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis (Applied Biosystems, USA). The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and the institutional ethical review board approved the protocol. Relapse-free survival (RFS) was estimated as the time from surgery to recurrence or death from the disease, whereas overall survival (OS) was defined as the time from diagnosis to the date of death or the patient's last follow-up. *In silico* validation set included data from 618 resectable NSCLC caucasian patients from the TCGA project.

### RNA isolation and quality evaluation

Total RNA isolation from the tumor and normal fresh frozen tissues was performed using TRI Reagent (Sigma, USA) according to the manufacturer's instructions. RNA samples were subjected to quality control before carrying out NGS; using RNA Nano and Small RNA Chips on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Germany). The miRNA fraction was enriched with an optimal profile using a PureLink miRNA isolation kit (Invitrogen, USA). After performing quality control, 32 of the tested samples had an optimal quality profile for NGS sequencing.

### NGS

Small RNA sequencing using a sample barcode-identification multiplex with SOLiD (Sequencing by Oligo Ligation Detection) technology was performed. A SOLiD total RNA-seq kit was used to prepare small RNA libraries and templated beads were subsequently prepared according to the manufacturer's instructions. Briefly, the libraries were constructed and the cDNAs amplified with the 3' PCR primers supplied in the SOLiD RNA barcoding kit containing the P2 sequence required for emulsion PCR (ePCR) using beads. After ePCR and bead enrichment, the samples were deposited onto a slide and sequenced on the SOLiD™ 4 System (Applied Biosystems, USA).

## RTqPCR

The expression of 22 randomly-selected miRNAs was validated in an independent cohort using miRNA-specific TaqMan assays (Applied Biosystems). Briefly, reverse transcription (RT) was performed with 500 ng of total RNA using a TaqMan MicroRNA reverse transcription kit (Applied Biosystems) following the multiplex RT protocol, according to the manufacturer's instructions. Normalization and relative expression quantification was calculated with miR-16 using the comparative C<sub>q</sub> method ( $2^{-(C_q \text{ sample} - C_q \text{ control})}$ ) to validate the miRNA expression and used the Pfaffl formula to perform survival analysis.

## Bioinformatic analysis

In the training set, color space fasta (csfasta) and quality (qual) format input data were grouped for each sample and transformed into FASTQ files in order to import them into the CLC Genomics Workbench software (version 5.5.2; CLC bio, Denmark). The trimming and count were performed together to remove adapter sequences and to count different tags. The miRNAs were subsequently annotated using the miRBase platform (release 20.0, *Homo sapiens*) and the Ensembl.org or tRNAscan-SE databases for other small RNA biotypes. Reads for the same mature miRNAs were grouped and normalized by totals, reads per kilobase per million mapped reads (RPKM). Principal components analysis was performed to visualize the sample grouping and the Baggerley test was used to analyze differential miRNA expression between tumor and normal tissues and the FDR (false discovery rate) was used to adjust *p*-values.

Functional analyses were carried out using a new bioinformatics algorithm [92] with differentially deregulated miRNAs taking account statistics and *p*-values obtained from Baggerley test.

*In silico* validation was performed using two lung cancer data sets from the TCGA consortium [93, 94]. Clinical and miRNA-seq (Illumina HiSeq platform) information was directly downloaded from the ICGC Data Portal [95], <https://dcc.icgc.org/releases/current/projects/LUAD-US>, and <https://dcc.icgc.org/releases/current/projects/LUSC-US>. MiR-21-5p and miR-188-5p RPKM values were extracted using their genomic positions, obtained from miRBase. *T*-tests paired (p1, only cases with paired samples tumor and normal, *N* = 71) and non-paired (p2, comparison of all tumor samples in front of all normal samples) were carried out using expression values with logarithmic transformation to analyse the differential expression using the R package [96]. Analyses were considered to be statistically significant to *p*-value ≤ 0.05.

## Statistical analysis

Mann-Whitney and Chi-square tests were applied to confirm that there were not any statistically significant differences in clinicopathological characteristics between both training and validation sets. The Wilcoxon matched-pairs test was used to validate NGS results tested by RTqPCR. The survival curves were plotted according to the univariate Kaplan-Meier method (log-rank) with clinicopathological variables and dichotomized microRNA expression levels. For multiple comparisons, the Bonferroni method was applied, maintaining the overall probability of *kp* < 0.05. Finally, a Cox model for multivariate analyses was used to assess the independent value of the tested biomarkers. Statistical analysis was performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS, USA) version 15.0. A *p*-value ≤ 0.05 was considered to be statistically significant for all analyses.

## CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

## GRANT SUPPORT

This work was supported by the RD12/0036/0025 and RD06/0020/1024, ISCIII, grants from the Fondo Europeo de Desarrollo Regional (FEDER), by funds from the Proyecto de Investigación Fundamental Orientada a la Transmisión de Conocimiento a la Empresa (TRACE; TRA09-0132) and Beca Roche Oncohematología.

## Editorial note

This paper has been accepted based in part on peer-review conducted by another journal and the authors' response and revisions as well as expedited peer-review in Oncotarget.

## REFERENCES

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108.
2. Ramalingam SS, Owonikoko TK, Khuri FR. Lung cancer: New biological insights and recent therapeutic advances. *CA Cancer J Clin.* 2011;61:91-112.
3. Camps C, del Pozo N, Blasco A, Blasco P, Sirera R. Importance of quality of life in patients with non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer.* 2009;10:83-90.
4. Hoffman PC, Mauer AM, Vokes EE. Lung cancer. *Lancet.* 2000;355:479-485.
5. Carnio S, Novello S, Papotti M, Loiacono M, Scagliotti GV. Prognostic and predictive biomarkers in early stage non-

- small cell lung cancer: tumor based approaches including gene signatures. *Transl Lung Cancer Res.* 2013;2:372-381.
6. Burotto M, Thomas A, Subramaniam D, Giaccone G, Rajan A. Biomarkers in early-stage non-small-cell lung cancer: current concepts and future directions. *J Thorac Oncol.* 2014;9:1609-1617.
  7. Camps C, Jantus-Lewintre E, Cabrera A, Blasco A, Sanmartin E, Gallach S, Caballero C, del Pozo N, Rosell R, Guijarro R, Sirera R. The identification of KRAS mutations at codon 12 in plasma DNA is not a prognostic factor in advanced non-small cell lung cancer patients. *Lung Cancer.* 2011;72:365-369.
  8. Uso M, Jantus-Lewintre E, Bremnes RM, Calabuig S, Blasco A, Pastor E, Borreda I, Molina-Pinelo S, Paz-Ares L, Guijarro R, Martorell M, Forteza J, Camps C, Sirera R. Analysis of the immune microenvironment in resected non-small cell lung cancer: the prognostic value of different T lymphocyte markers. *Oncotarget.* 2016;7:52849-52861.
  9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science.* 2001;294:853-858.
  10. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001;294:858-862.
  11. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science.* 2001;294:862-864.
  12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75:843-854.
  13. Ambros V. MicroRNA pathways in flies and worms: growth, death, fat, stress, and timing. *Cell.* 2003;113:673-676.
  14. Duncavage E, Goodgame B, Sezhiyan A, Govindan R, Pfeifer J. Use of microRNA expression levels to predict outcomes in resected stage I non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol.* 2010;5:1755-1763.
  15. Markou A, Sourvinou I, Vorkas PA, Yousef GM, Lianidou E. Clinical evaluation of microRNA expression profiling in non small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2013;81:388-396.
  16. Wang Y, Chen J, Lin Z, Cao J, Huang H, Jiang Y, He H, Yang L, Ren N, Liu G. Role of deregulated microRNAs in non-small cell lung cancer progression using fresh-frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded samples. *Oncol Lett.* 2016;11:801-808.
  17. Gallach S, Calabuig-Farinas S, Jantus-Lewintre E, Camps C. MicroRNAs: promising new antiangiogenic targets in cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:878450.
  18. Bediaga NG, Davies MP, Acha-Sagredo A, Hyde R, Raji OY, Page R, Walshaw M, Gosney J, Alfirevic A, Field JK, Liloglou T. A microRNA-based prediction algorithm for diagnosis of non-small lung cell carcinoma in minimal biopsy material. *Br J Cancer.* 2013;109:2404-2411.
  19. Skrzypski M, Czapiewski P, Goryca K, Jassem E, Wyrwicz L, Pawlowski R, Rzyman W, Biernat W, Jassem J. Prognostic value of miRNA expression in operable non-small cell lung cancer patients. *Br J Cancer.* 2014.
  20. Gasparini P, Cascione L, Landi L, Carasi S, Lovat F, Tibaldi C, Ali G, D'Incecco A, Minuti G, Chella A, Fontanini G, Fassan M, Cappuzzo F, Croce CM. microRNA classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK-, EGFR-, and KRAS-driven lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:14924-14929.
  21. Rolfo C, Fanale D, Hong DS, Tsimberidou AM, Piha-Paul SA, Pauwels P, Van Meerbeeck JP, Caruso S, Bazan V, Cicero G, Russo A, Giovannetti E. Impact of microRNAs in resistance to chemotherapy and novel targeted agents in non-small cell lung cancer. *Curr Pharm Biotechnol.* 2014;15:475-485.
  22. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt RL, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris CC, Croce CM. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2257-2261.
  23. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, Seike M, Kumamoto K, Yi M, Stephens RM, Okamoto A, Yokota J, Tanaka T, Calin GA, Liu CG, Croce CM, Harris CC. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell.* 2006;9:189-198.
  24. Tam S, de BR, Tsao MS, McPherson JD. Robust global microRNA expression profiling using next-generation sequencing technologies. *Lab Invest.* 2014;94:350-358.
  25. Uso M, Jantus-Lewintre E, Sirera R, Bremnes RM, Camps C. miRNA detection methods and clinical implications in lung cancer. *Future Oncol.* 2014;10:2279-2292.
  26. Liu L, Li Y, Li S, Hu N, He Y, Pong R, Lin D, Lu L, Law M. Comparison of next-generation sequencing systems. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:251364.
  27. Chugh P, Dittmer DP. Potential pitfalls in microRNA profiling. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2012;3:601-616.
  28. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012;13:358-369.
  29. Linsen SE, de WE, Janssens G, Heater S, Chapman L, Parkin RK, Fritz B, Wyman SK, de BE, Voest EE, Kuersten S, Tewari M, Cuppen E. Limitations and possibilities of small RNA digital gene expression profiling. *Nat Methods.* 2009;6:474-476.
  30. Buitrago DH, Patnaik SK, Kadota K, Kannisto E, Jones DR, Adusumilli PS. Small RNA sequencing for profiling microRNAs in long-term preserved formalin-fixed and paraffin-embedded non-small cell lung cancer tumor specimens. *PLoS One.* 2015;10:e0121521.
  31. Wang J, Li Z, Ge Q, Wu W, Zhu Q, Luo J, Chen L. Characterization of microRNA transcriptome in tumor, adjacent, and normal tissues of lung squamous cell carcinoma. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;149:1404-



- 1414.
32. Yang C, Sun C, Liang X, Xie S, Huang J, Li D. Integrative analysis of microRNA and mRNA expression profiles in non-small-cell lung cancer. *Cancer Gene Ther.* 2016;23:90-97.
  33. Stenvold H, Donnem T, Andersen S, Al-Saad S, Busund LT, Bremnes RM. Stage and tissue-specific prognostic impact of miR-182 in NSCLC. *BMC Cancer.* 2014;14:138.
  34. Pignot G, Cizeron-Clairac G, Vacher S, Susini A, Tozlu S, Vieillefond A, Zerbib M, Lidereau R, Debre B, Amsellem-Ouazana D, Bieche I. microRNA expression profile in a large series of bladder tumors: identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer. *Int J Cancer.* 2013;132:2479-2491.
  35. Cekaite L, Rantala JK, Bruun J, Guriby M, Agesen TH, Danielsen SA, Lind GE, Nesbakken A, Kallioniemi O, Lothe RA, Skotheim RI. MiR-9, -31, and -182 deregulation promote proliferation and tumor cell survival in colon cancer. *Neoplasia.* 2012;14:868-879.
  36. Liu H, Wang Y, Li X, Zhang YJ, Li J, Zheng YQ, Liu M, Song X, Li XR. Expression and regulatory function of miRNA-182 in triple-negative breast cancer cells through its targeting of profilin 1. *Tumour Biol.* 2013;34:1713-1722.
  37. Krishnan K, Steptoe AL, Martin HC, Wani S, Nones K, Waddell N, Mariasegaram M, Simpson PT, Lakhani SR, Gabrielli B, Vlassov A, Cloonan N, Grimmond SM. MicroRNA-182-5p targets a network of genes involved in DNA repair. *RNA.* 2013;19:230-242.
  38. Wang S, Hu J, Zhang D, Li J, Fei Q, Sun Y. Prognostic role of microRNA-31 in various cancers: a meta-analysis. *Tumour Biol.* 2014;35:11639-11645.
  39. Meng W, Ye Z, Cui R, Perry J, Dedousi-Huebner V, Huebner A, Wang Y, Li B, Volinia S, Nakanishi H, Kim T, Suh SS, Ayers LW, Ross P, Croce CM, Chakravarti A, Jin VX, Lautenschlaeger T. MicroRNA-31 Predicts the Presence of Lymph Node Metastases and Survival in Patients with Lung Adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2013;19:5423-5433.
  40. Gao W, Liu L, Xu J, Shao Q, Liu Y, Zeng H, Shu Y. A systematic analysis of predicted MiR-31-targets identifies a diagnostic and prognostic signature for lung cancer. *Biomed Pharmacother.* 2014;68:419-427.
  41. Lin CW, Chang YL, Chang YC, Lin JC, Chen CC, Pan SH, Wu CT, Chen HY, Yang SC, Hong TM, Yang PC. MicroRNA-135b promotes lung cancer metastasis by regulating multiple targets in the Hippo pathway and LZTS1. *Nat Commun.* 2013;4:1877.
  42. Darnet S, Moreira FC, Hamoy IG, Burbano R, Khayat A, Cruz A, Magalhaes L, Silva A, Santos S, Demachki S, Assumpcao M, Assumpcao P, Ribeiro-Dos-Santos A. High-Throughput Sequencing of miRNAs Reveals a Tissue Signature in Gastric Cancer and Suggests Novel Potential Biomarkers. *Bioinform Biol Insights.* 2015;9:1-8.
  43. Gaedcke J, Grade M, Camps J, Sokilde R, Kaczkowski B, Schetter AJ, Difilippantonio MJ, Harris CC, Ghadimi BM, Moller S, Beissbarth T, Ried T, Litman T. The rectal cancer microRNAome—microRNA expression in rectal cancer and matched normal mucosa. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4919-4930.
  44. Cui R, Meng W, Sun HL, Kim T, Ye Z, Fassan M, Jeon YJ, Li B, Vicentini C, Peng Y, Lee TJ, Luo Z, Liu L, Xu D, Tili E, Jin V, Middleton J, Chakravarti A, Lautenschlaeger T, Croce CM. MicroRNA-224 promotes tumor progression in nonsmall cell lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E4288-E4297.
  45. Adamopoulos PG, Kontos CK, Rapti SM, Papadopoulos IN, Scorilas A. miR-224 overexpression is a strong and independent prognosticator of short-term relapse and poor overall survival in colorectal adenocarcinoma. *Int J Oncol.* 2015;46:849-859.
  46. Avgeris M, Mavridis K, Tokas T, Stravodimos K, Fragoulis EG, Scorilas A. Uncovering the clinical utility of miR-143, miR-145 and miR-224 for predicting the survival of bladder cancer patients following treatment. *Carcinogenesis.* 2015;36:528-537.
  47. Cui R, Kim T, Fassan M, Meng W, Sun HL, Jeon YJ, Vicentini C, Tili E, Peng Y, Scarpa A, Liang G, Zhang YK, Chakravarti A, Croce CM. MicroRNA-224 is implicated in lung cancer pathogenesis through targeting caspase-3 and caspase-7. *Oncotarget.* 2015;6:21802-21815.
  48. Li X, Shi Y, Yin Z, Xue X, Zhou B. An eight-miRNA signature as a potential biomarker for predicting survival in lung adenocarcinoma. *J Transl Med.* 2014;12:159.
  49. Yu SL, Lee DC, Sohn HA, Lee SY, Jeon HS, Lee JH, Park CG, Lee HY, Yeom YI, Son JW, Yoon YS, Kang J. Homeobox A9 directly targeted by miR-196b regulates aggressiveness through nuclear Factor-kappa B activity in non-small cell lung cancer cells. *Mol Carcinog.* 2015.
  50. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, Wojdemann M, Johansen JS. MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol.* 2012;25:1609-1622.
  51. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, Gel B, Quera A, Bandres E, Garcia-Foncillas J, Ramirez J, Monzo M. miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis.* 2009;30:1903-1909.
  52. Guan P, Yin Z, Li X, Wu W, Zhou B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J Exp Clin Cancer Res.* 2012;31:54.
  53. Vosa U, Vooder T, Kolde R, Vilo J, Metspalu A, Annilo T. Meta-analysis of microRNA expression in lung cancer. *Int J Cancer.* 2013;132:2884-2893.
  54. Minna E, Romeo P, Dugo M, De CL, Todoerti K, Pilotti S, Perrone F, Seregni E, Agnelli L, Neri A, Greco A, Borrello MG. miR-451a is underexpressed and targets AKT/mTOR

- pathway in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:12731-12747.
55. Liu J, Xue H, Zhang J, Suo T, Xiang Y, Zhang W, Ma J, Cai D, Gu X. MicroRNA-144 inhibits the metastasis of gastric cancer by targeting MET expression. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015;34:35.
  56. Sun P, Wang L, Lu Y, Liu Y, Li L, Yin L, Zhang C, Zhao W, Shen B, Xu W. MicroRNA-195 targets VEGFR2 and has a tumor suppressive role in ACHN cells via PI3K/Akt and Raf/MEK/ERK signaling pathways. *Int J Oncol*. 2016;49:1155-1163.
  57. Song L, Li D, Zhao Y, Gu Y, Zhao D, Li X, Bai X, Sun Y, Zhang X, Sun H, Wang Y, Peng L. miR-218 suppressed the growth of lung carcinoma by reducing MEF2D expression. *Tumour Biol*. 2016;37:2891-2900.
  58. Zeng XJ, Wu YH, Luo M, Cong PG, Yu H. Inhibition of pulmonary carcinoma proliferation or metastasis of miR-218 via down-regulating CDCP1 expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2017;21:1502-1508.
  59. Shi ZM, Wang L, Shen H, Jiang CF, Ge X, Li DM, Wen YY, Sun HR, Pan MH, Li W, Shu YQ, Liu LZ, Peiper SC, He J, Jiang BH. Downregulation of miR-218 contributes to epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis in lung cancer by targeting Slug/ZEB2 signaling. *Oncogene*. 2017;36:2577-2588.
  60. Hu H, Xu Z, Li C, Xu C, Lei Z, Zhang HT, Zhao J. MiR-145 and miR-203 represses TGF-beta-induced epithelial-mesenchymal transition and invasion by inhibiting SMAD3 in non-small cell lung cancer cells. *Lung Cancer*. 2016;97:87-94.
  61. Xiang Y, Zhang Y, Tang Y, Li Q. MALAT1 Modulates TGF-beta1-Induced Endothelial-to-Mesenchymal Transition through Downregulation of miR-145. *Cell Physiol Biochem*. 2017;42:357-372.
  62. Zhang Y, Lin Q. MicroRNA-145 inhibits migration and invasion by down-regulating FSCN1 in lung cancer. *Int J Clin Exp Med*. 2015;8:8794-8802.
  63. Chen Z, Zeng H, Guo Y, Liu P, Pan H, Deng A, Hu J. miRNA-145 inhibits non-small cell lung cancer cell proliferation by targeting c-Myc. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010;29:151.
  64. Yuan Y, Zheng S, Li Q, Xiang X, Gao T, Ran P, Sun L, Huang Q, Xie F, Du J, Xiao C. Overexpression of miR-30a in lung adenocarcinoma A549 cell line inhibits migration and invasion via targeting EYA2. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2016;48:220-228.
  65. Wen XP, Ma HL, Zhao LY, Zhang W, Dang CX. MiR-30a suppresses non-small cell lung cancer progression through AKT signaling pathway by targeting IGF1R. *Cell Mol Biol (Noisy -le-grand)*. 2015;61:78-85.
  66. Anand S, Cheresh DA. Emerging Role of Micro-RNAs in the Regulation of Angiogenesis. *Genes Cancer*. 2011;2:1134-1138.
  67. Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, Nuovo G, Marsh CB, Nana-Sinkam SP. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008;373:607-612.
  68. Sun Y, Bai Y, Zhang F, Wang Y, Guo Y, Guo L. miR-126 inhibits non-small cell lung cancer cells proliferation by targeting EGFL7. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:1483-1489.
  69. Song L, Li D, Gu Y, Wen ZM, Jie J, Zhao D, Peng LP. MicroRNA-126 Targeting PIK3R2 Inhibits NSCLC A549 Cell Proliferation, Migration, and Invasion by Regulation of PTEN/PI3K/AKT Pathway. *Clin Lung Cancer*. 2016;17:e65-e75.
  70. Sun C, Sang M, Li S, Sun X, Yang C, Xi Y, Wang L, Zhang F, Bi Y, Fu Y, Li D. Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget*. 2015;6:39756-39792.
  71. Cineaglia NC, Andrade SC, Tokar T, Pinheiro M, Severino FE, Oliveira RA, Hasimoto EN, Cataneo DC, Cataneo AJ, Defaveri J, Souza CP, Marques MM, Carvalho RF, Coutinho LL, Gross JL, Rogatto SR, Lam WL, Jurisica I, Reis PP. Integrative transcriptome analysis identifies deregulated microRNA-transcription factor networks in lung adenocarcinoma. *Oncotarget*. 2016.
  72. Nymark P, Guled M, Borze I, Faisal A, Lahti L, Salmenkivi K, Kettunen E, Anttila S, Knuutila S. Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011;50:585-597.
  73. Ulivi P, Foschi G, Mengozzi M, Scarpi E, Silvestrini R, Amadori D, Zoli W. Peripheral blood miR-328 expression as a potential biomarker for the early diagnosis of NSCLC. *Int J Mol Sci*. 2013;14:10332-10342.
  74. Chu Y, Ouyang Y, Wang F, Zheng A, Bai L, Han L, Chen Y, Wang H. MicroRNA-590 promotes cervical cancer cell growth and invasion by targeting CHL1. *J Cell Biochem*. 2014;115:847-853.
  75. Xiao X, Tang C, Xiao S, Fu C, Yu P. Enhancement of proliferation and invasion by MicroRNA-590-5p via targeting PBRM1 in clear cell renal carcinoma cells. *Oncol Res*. 2013;20:537-544.
  76. Fan Y, Yin S, Hao Y, Yang J, Zhang H, Sun C, Ma M, Chang Q, Xi JJ. miR-19b promotes tumor growth and metastasis via targeting TP53. *RNA*. 2014;20:765-772.
  77. Jepsen RK, Novotny GW, Klarskov LL, Christensen IJ, Hogdall E, Riis LB. Investigating intra-tumor heterogeneity and expression gradients of miR-21, miR-92a and miR-200c and their potential of predicting lymph node metastases in early colorectal cancer. *Exp Mol Pathol*. 2016;101:187-196.
  78. Latchana N, Ganju A, Howard JH, Carson WE, III. MicroRNA dysregulation in melanoma. *Surg Oncol*. 2016;25:184-189.
  79. Usmani A, Shoro AA, Memon Z, Hussain M, Rehman R. Diagnostic, prognostic and predictive value of

- MicroRNA-21 in breast cancer patients, their daughters and healthy individuals. *Am J Cancer Res.* 2015;5:2484-2490.
80. Yang M, Shen H, Qiu C, Ni Y, Wang L, Dong W, Liao Y, Du J. High expression of miR-21 and miR-155 predicts recurrence and unfavourable survival in non-small cell lung cancer. *Eur J Cancer.* 2013;49:604-615.
  81. Capodanno A, Boldrini L, Proietti A, Ali G, Pelliccioni S, Niccoli C, D'Incecco A, Cappuzzo F, Chella A, Lucchi M, Mussi A, Fontanini G. Let-7g and miR-21 expression in non-small cell lung cancer: correlation with clinicopathological and molecular features. *Int J Oncol.* 2013;43:765-774.
  82. Seike M, Goto A, Okano T, Bowman ED, Schetter AJ, Horikawa I, Mathe EA, Jen J, Yang P, Sugimura H, Gemma A, Kudoh S, Croce CM, Harris CC. MiR-21 is an EGFR-regulated anti-apoptotic factor in lung cancer in never-smokers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:12085-12090.
  83. Zhu W, Xu B. MicroRNA-21 identified as predictor of cancer outcome: a meta-analysis. *PLoS One.* 2014;9:e103373.
  84. Fu X, Han Y, Wu Y, Zhu X, Lu X, Mao F, Wang X, He X, Zhao Y, Zhao Y. Prognostic role of microRNA-21 in various carcinomas: a systematic review and meta-analysis. *Eur J Clin Invest.* 2011;41:1245-1253.
  85. Markou A, Tsaroucha EG, Kaklamanis L, Fotinou M, Georgoulas V, Lianidou ES. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem.* 2008;54:1696-1704.
  86. Gao W, Yu Y, Cao H, Shen H, Li X, Pan S, Shu Y. Deregulated expression of miR-21, miR-143 and miR-181a in non small cell lung cancer is related to clinicopathologic characteristics or patient prognosis. *Biomed Pharmacother.* 2010;64:399-408.
  87. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13:622-638.
  88. Florczuk M, Szpechcinski A, Chorostowska-Wynimko J. miRNAs as Biomarkers and Therapeutic Targets in Non-Small Cell Lung Cancer: Current Perspectives. *Target Oncol.* 2017.
  89. Jinlong S, Lin F, Yonghui L, Li Y, Weidong W. Identification of let-7a-2-3p or/and miR-188-5p as prognostic biomarkers in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *PLoS One.* 2015;10:e0118099.
  90. Wang L, Liu H. microRNA-188 is downregulated in oral squamous cell carcinoma and inhibits proliferation and invasion by targeting SIX1. *Tumour Biol.* 2015.
  91. Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, Kassem M, Alfayez M, Aldahmash A, Alajej NM. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Sci Rep.* 2016;6:25997.
  92. Garcia-Garcia F, Panadero J, Dopazo J, Montaner D. Integrated gene set analysis for microRNA studies. *Bioinformatics.* 2016;32:2809-2816.
  93. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization of squamous cell lung cancers. *Nature.* 2012;489:519-525.
  94. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.* 2014;511:543-550.
  95. Zhang J, Baran J, Cros A, Guberman JM, Haider S, Hsu J, Liang Y, Rivkin E, Wang J, Whitty B, Wong-Erasmus M, Yao L, Kasprzyk A. International Cancer Genome Consortium Data Portal—a one-stop shop for cancer genomics data. *Database (Oxford).* 2011;2011:bar026.
  96. R Core Team: R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.; 2015.

## Review Article

# MicroRNAs: Promising New Antiangiogenic Targets in Cancer

Sandra Gallach,<sup>1</sup> Silvia Calabuig-Fariñas,<sup>1</sup> Eloisa Jantus-Lewintre,<sup>1,2</sup> and Carlos Camps<sup>3,4</sup>

<sup>1</sup> Molecular Oncology Laboratory, General University Hospital Research Foundation, Avda Tres Cruces 2, 46014 Valencia, Spain

<sup>2</sup> Department of Biotechnology, Universitat Politècnica de València, Camino de Vera s/n, 46022 Valencia, Spain

<sup>3</sup> Medical Oncology Department, General University Hospital, Avda Tres Cruces 2, 46014 Valencia, Spain

<sup>4</sup> Department of Medicine, Universitat de València, Avda Blasco Ibañez 15, 46010 Valencia, Spain

Correspondence should be addressed to Eloisa Jantus-Lewintre; [jantus\\_elo@gva.es](mailto:jantus_elo@gva.es)

Received 6 June 2014; Accepted 18 July 2014; Published 14 August 2014

Academic Editor: Elisa Giovannetti

Copyright © 2014 Sandra Gallach et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

MicroRNAs are one class of small, endogenous, non-coding RNAs that are approximately 22 nucleotides in length; they are very numerous, have been phylogenetically conserved, and involved in biological processes such as development, differentiation, cell proliferation, and apoptosis. MicroRNAs contribute to modulating the expression levels of specific proteins based on sequence complementarity with their target mRNA molecules and so they play a key role in both health and disease. Angiogenesis is the process of new blood vessel formation from preexisting ones, which is particularly relevant to cancer and its progression. Over the last few years, microRNAs have emerged as critical regulators of signalling pathways in multiple cell types including endothelial and perivascular cells. This review summarises the role of miRNAs in tumour angiogenesis and their potential implications as therapeutic targets in cancer.

## 1. Introduction

MicroRNAs (miRNAs) were initially discovered in 1993 by Lee et al. while they were studying the *lin-4* gene. They showed that *lin-4* encodes a small RNA with antisense complementarity to the *lin-14* gene which resulted in reduced *lin-14* protein expression and thus disrupted the regulation of developmental timing of the nematode *Caenorhabditis elegans* [1]. miRNAs were subsequently shown to inhibit their target genes through specific sequences which are complementary to the target messenger RNA (mRNA). This discovery resulted in a paradigm shift in our understanding of gene regulation because miRNAs are now known to repress thousands of target genes and to coordinate many physiological processes including, but not limited to, development, differentiation, cell proliferation, and apoptosis [2–4]. The aberrant expression or alteration of miRNAs also contributes to a range of human pathologies, including cancer [5–7].

## 2. MicroRNAs: Definition, Biogenesis, and Function

miRNAs are one class of small noncoding RNAs that are approximately 18–25 nucleotides in length; they are evolutionary conserved single-stranded RNA molecules which are involved in the specific regulation of gene expression in eukaryotes [8–10]; thousands have been identified in a wide variety of species. They can increase or decrease protein expression by binding to the 3'-untranslated region (UTR) or to other regions (e.g., the 5'-UTR, coding sequences) of target mRNA transcripts [11] and thus play a central role in gene regulation in both health and disease. miRNA genes are located in inter- or intragenic regions of protein-coding gene introns and/or exons and are transcribed from DNA but not translated into proteins; they can exist individually or form clusters (reviewed in [12]).

miRNA biogenesis starts with transcription from a miRNA gene by RNA polymerase II (pol II), generating a

primary transcript RNA (pri-miRNA) which is up to several kilobases in length [13] and which can be distinguished by the presence of an imperfect double stranded (ds) RNA region known as the stem-loop structure. This structure is recognised by the nuclear RNase III endonuclease Droscha and its cofactor DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) which together with other proteins form a complex known as the microprocessor complex that cleaves the pri-miRNA and releases an approximately 60–70 nt long precursor miRNA (pre-miRNA) [14–17]. The pre-miRNA is exported from the nucleus to the cytoplasm via the exportin-5 protein (RAN-GTP-dependent transporter) [18–20] and once the complex is in the cytoplasm, Dicer (RNase III endonuclease), with the help of TRBP (the human immunodeficiency virus transactivating) and AGO2 (argonaute 2), generates the final mature 18–25 nt ds miRNA, miRNA:miRNA\* (the complementary miRNA strand, referred to as miRNA\*) [21, 22]. The mature miRNA loses one of its strands and the remaining one is loaded onto an argonaute-containing RNA-induced silencing complex (RISC) to form a miRISC which mediates protein inhibition [23, 24].

Once a miRNA binds to its target gene, two mechanisms of action are known: (i) mRNA degradation and (ii) translational mRNA inhibition without degradation, the latter of which occurs in animals, including mammals [25]. In the first of these mechanisms the binding is completely complementary between the miRNA and mRNA sequences whereas in the second one, where the bound mRNA remains untranslated, the binding is not completely complementary, resulting in reduced target gene expression (Figure 1). Another important characteristic of miRNAs is that one single miRNA has the potential to regulate many target genes while any one gene can be targeted by multiple miRNAs, meaning that miRNAome-mRNAome interaction can be a complicated network.

Some data in humans have shown that about 30–50% of genes coding for proteins are controlled by miRNAs [26]; therefore, any signalling pathway or cellular mechanism could potentially be governed by them. The causes of miRNA dysregulation in cancer can result from various mechanisms including (reviewed in [27]) the deletion or amplification of miRNA-coding chromosomal regions [6, 28–30], mutations in the miRNA or the target site sequence of its respective gene(s) [31–34], epigenetic silencing of miRNA promoters [35–38], or the dysregulation of proteins upstream of the miRNA pathway such as cellular signalling and transcription factors [39–45]. Hence, the ability of miRNAs to simultaneously regulate several genes makes them a very attractive study target, especially, given that many tumour cell types have altered miRNA expression patterns. In particular, recent work has provided support for the idea that noncoding RNAs, and in particular miRNAs, may play important roles in physiological and pathological angiogenesis.

### 3. Tumour Angiogenesis

Tumour angiogenesis is the process by which new blood vessels form in neoplasms; it starts in the early stages of

disease and is a crucial step in the growth and spread of tumours. Without forming new blood vessels tumours cannot grow beyond a certain size due to the lack of oxygen and other essential nutrients [46]. Neovascularization has a dual effect on the tumour: firstly it supplies nutrients, oxygen, and growth factors that stimulate tumour cell growth [47]. Secondly, in combination with lymphangiogenesis, it is a prerequisite for metastasis as it provides a site of entry into the circulation allowing shed tumour cells to travel through the bloodstream to reach remote organs [48]. This pathological angiogenesis is characterized by uncontrolled growth and disordered vasculature and appears when there is an imbalance between pro- and antiangiogenic factors [49].

In order to initiate the neovascularization, tumour cells may overexpress one or more angiogenic inducers, mobilise proangiogenic proteins from the extracellular matrix, or attract host cells such as macrophages which produce their own angiogenic proteins [50].

The activation of angiogenesis starts when preexisting vessels become permeabilised in response to stimulating factors such as VEGF (vascular endothelial growth factor), PLGF (placental growth factor), or ANG-1 (angiopoietin-1). The basement membrane and extracellular matrix (ECM) are locally degraded by extracellular matrix metalloproteinases (MMPs) allowing the underlying endothelial cells (ECs), which are attracted by the angiogenic stimulus produced by the tumour cells and the microenvironment, to migrate into the perivascular space [51]. In tumour vasculature, the pericyte coating is decreased or is inadequate, leading to the formation of fenestrations and/or transcellular holes; these incomplete basal membranes and the fact that tumour blood vessel walls can also be formed by both endothelial and tumour cells lead to the formation of vessels with irregular diameters and structural abnormalities [51, 52].

In summary, angiogenesis is regarded as an essential step in cancer development which promotes tumour progression and metastasis by providing an entry site into the circulation [53]. Angiogenesis has become the focus of intense study in recent years, for example, in the development of antiangiogenesis pharmacological agents as attractive antitumor targets [54, 55]. In addition, the response of the vascular endothelium to angiogenic stimuli is modulated by certain miRNAs which can be either proangiogenic or antiangiogenic. For this reason, the study of miRNAs and angiogenesis is likely to improve our understanding of the process of carcinogenesis and may lead to the identification of new therapeutic targets for cancer treatment.

## 4. Role of MicroRNAs in the Regulation of Angiogenesis

**4.1. Enzymes Involved in miRNA Biogenesis.** One approach to studying the biological relevance of miRNAs is by silencing their functions by mutating or disrupting Dicer, a critical enzyme involved in miRNA maturation [22]. Functional loss of Dicer results in profound vascular developmental abnormalities in both zebrafish and mice [56, 57], but the first evidence that miRNAs were involved in the regulation

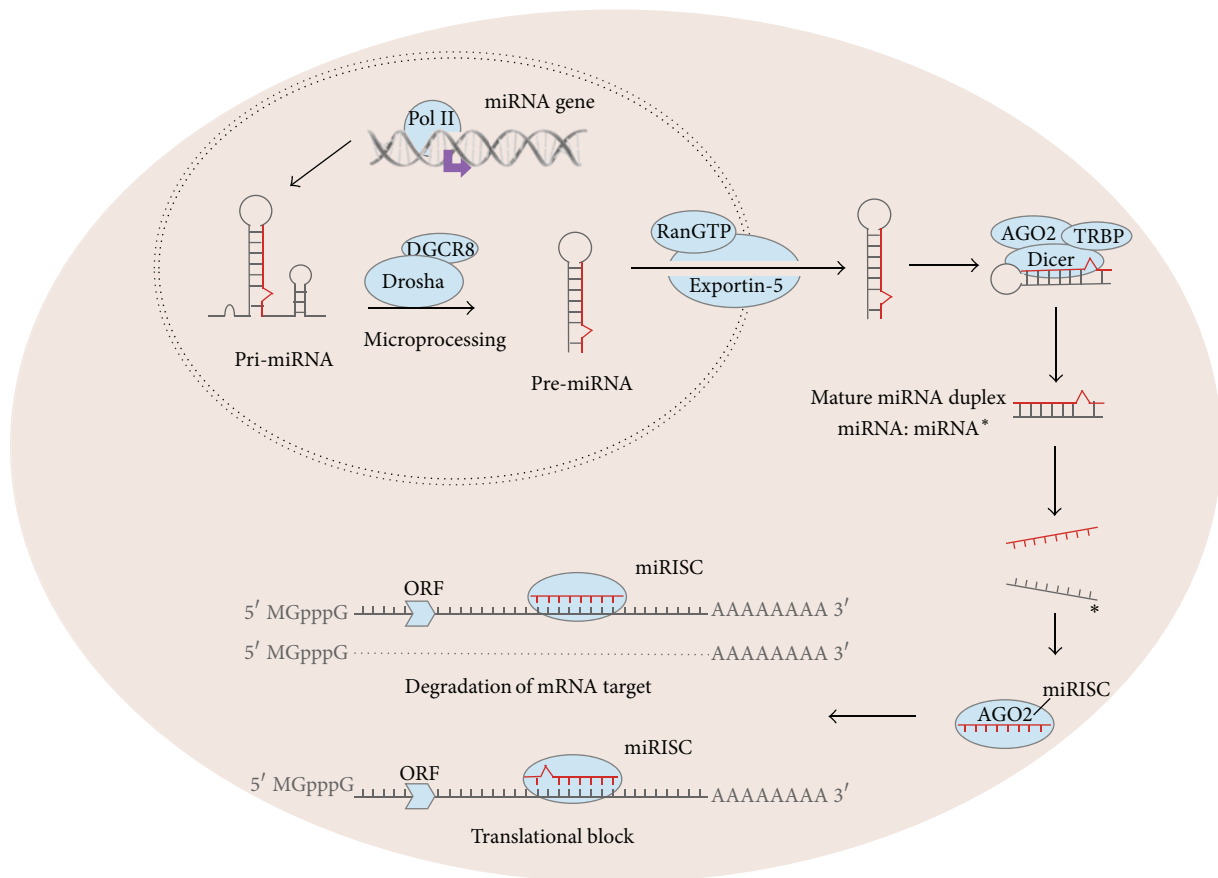


FIGURE 1: miRNA biogenesis: miRNA gene transcription generates primary miRNA (pri-miRNA) in the nucleus which is then cleaved by the microprocessor complex (Drosha and DGCR8), liberating pre-miRNA which is exported from the nucleus to the cytoplasm by exportin-5. Pre-miRNA is finally processed by Dicer and TRBP to obtain a mature miRNA with the capacity to bind to target mRNAs. AGO2: argonaute 2, DGCR8: DiGeorge syndrome critical region 8, miRISC: miRNA bound to RNA-induced silencing complex, ORF: origin replication frame, Pol II: polymerase II, and TRBP: the human immunodeficiency virus transactivating.

of angiogenesis during vascular development came from investigating mice with hypomorphic Dicer expression; these mice had a retarded phenotype and died as embryos between days 12.5 and 14.5 because Dicer is specifically required for the formation/maintenance of blood vessels in embryos and yolk sacs [58]. Furthermore, these mutant embryos also had altered *Vegf*, *Flt1*, *Kdr* (kinase insert domain receptor), and *Tie2* expression indicating that Dicer probably exerts its function because it is involved in the biogenesis of miRNAs that regulate the expression levels of these critical proangiogenic factors in mice [58]. Similarly, generation of mutant embryos disrupts Dicer in zebrafish and results in pericardial oedema and vascular defects [59]. Moreover, genetic silencing of Dicer and/or Drosha in HUVECs reduces EC proliferation, migration, capillary sprouting, and tube forming activity *in vitro* and, in the case of Dicer (but not Drosha), reduces angiogenesis *in vivo* [60, 61]. This difference in the effects of Dicer and Drosha might be due to a recently described alternative Drosha processing pathway which is miRNA-independent [62]. Another new study in bone marrow mice endothelial progenitor cells (EPCs) also showed that conditional ablation of Dicer led to the inhibition

of angiogenesis and impaired tumour growth, demonstrating that functional Dicer is also necessary for bone marrow-mediated tumour angiogenesis [63]. Together, these studies reveal that Dicer and Drosha are prerequisite enzymes in miRNA processing and demonstrate the essential role of miRNAs in angiogenesis.

**4.2. MicroRNAs and Endothelial Cells.** Different cell types contribute to tumour neovascularization; among them, the endothelial and perivascular cells are generally acknowledged to play a central role in the angiogenesis process. miR-126 was suggested to be an endothelium specific miRNA, which modulates the endothelial phenotype *in vitro* and blood vessel integrity *in vivo*, respectively [64]. It is encoded by intron 7 of the *EGFL7* (EGF-like domain 7) gene, which encodes an EC-specific secreted peptide that acts as a chemoattractant and smooth muscle cell migration inhibitor [65–67]; both miR-126 and *Egfl7* have a similar EC expression pattern [68]. In concordance, it has been demonstrated that this miRNA is enriched in tissues with a high vascular component such as the lung and heart [69, 70]. miR-126 promotes angiogenesis in

response to VEGF and bFGF (basic fibroblast growth factor) through negative suppression regulators in signal transduction pathways [64, 68, 71]. Furthermore, miR-126 has been shown to be enriched in Flk-1 (kinase insert domain receptor; a type III VEGF receptor tyrosine kinase) positive cells derived from mouse embryonic bodies. miR-126 also directly regulates the vascular process by targeting *SPRED-1* (sprouty-related, *EVH1* domain containing 1), *VCAMI* (vascular cell adhesion molecule 1), and *PIK3R2* (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2, also known as p85- $\beta$ ) resulting in posttranscriptional repression in HeLa cells [64]. miR-126 loss-of-function studies in both mice and zebrafish highlighted its importance in developmental and pathological angiogenesis affecting the EC function *in vivo* [64]. Targeted deletion of miR-126 in mice causes leaky vessels, hemorrhaging, and partial embryonic lethality, due to a loss of vascular integrity and defects in EC proliferation, migration, and angiogenesis; these vascular abnormalities are similar to those caused by diminished angiogenic growth factor signalling (e.g., by VEGF or FGF). miR-126 enhances MAP kinase signalling in response to VEGF and FGF and, in its absence, angiogenic growth factor signalling is reduced. This process may be regulated by *Vegf* suppression mediated by *Spred-1*, considering that it is a negative regulator of the RAS/MAP kinase pathway; therefore, miR-126 promotes blood vessel formation by repressing *SPRED-1* expression [68]. Another finding was that miR-126 deletion inhibits VEGF-dependent AKT and ERK signalling derepressing the p85 $\beta$  subunit of *Pi3-kinase* and of *Spred-1*, respectively [71]. Finally, Png and colleagues reported that miR-126 regulates EC recruitment to metastatic breast cancer cells *in vitro* and *in vivo* [72]. According to these data, it seems that miR-126 contributes to the EC recruitment in physiological as well as in pathological conditions and might be a promising antiangiogenic target.

Other miRNAs have been found to regulate the angiogenic process by exerting an antiangiogenic function. Among these miR-221 and miR-222 are highly conserved miRNAs which are transcribed from a pri-miRNA located on the human X chromosome. These miRNAs are negative regulators of angiogenesis [73], have a proliferative effect on cancer cells [74], and are also expressed by growth factor-stimulated or quiescent ECs [11]; indeed, microarray data indicate that these are the most abundantly expressed miRNAs in HUVECs [73]. This latter study showed that these two miRNAs inhibit stem cell factor (SCF) by decreasing the abundance of c-KIT (tyrosine kinase receptor for SCF), thus blocking EC migration, proliferation, and angiogenesis *in vitro*. Their antiangiogenic activity was further demonstrated by their interaction with the c-KIT 3'-UTR in ECs [75] and this group also showed that these two miRNAs regulate endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in ECs by silencing Dicer [61]. NO is synthesized by eNOS and is necessary for EC survival, migration, and angiogenesis [76]. However, binding sites for these miRNAs were not found in the eNOS 3'-UTR, suggesting that miR-221/222 are likely to indirectly regulate eNOS protein production. These miRNAs can also specifically promote cancer cell proliferation by regulating the *p27* (Kip1) tumour suppressor gene [74], indicating that

the regulation of proliferation by miR-221/222 is cell-type specific. More recent studies have shown that these miRNAs control different target genes: miR-222 is involved in inflammation mediated by vascular growth factors [77], whereas miR-221 is required for vascular remodelling [78]. Similarly, a study performed in a murine model of liver tumorigenesis showed that miR-221 but not miR-222 accelerated tumour growth [79].

Similar to miR-221/222, the polycistronic miR-17-92 gene cluster (Cl3orf25), located on human chromosome 13q31.3, which encodes six mature miRNAs, miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b, and miR-92a [80], is also highly expressed in ECs [81]. This cluster is amplified in several types of lymphoma and solid tumours [45, 82] and regulates vascular integrity and angiogenesis, promoting tumour neovascularization *in vivo* by downregulating antiangiogenic *THBS1* (thrombospondin 1) [83]. A recent study showed that while miR-17, miR-18a, and miR-19a expression were enhanced and miR-92a expression was reduced during EC differentiation, inhibiting these miRNAs did not affect EC differentiation [84]. Although the cluster is highly upregulated in several human tumour types, only miR-18a and miR-19a have a proangiogenic function during tumour angiogenesis [71, 85, 86]. In contrast, an antiangiogenic role for miR-17-92 cluster members has also been reported in two different studies in cultured ECs [86, 87]: the first reported an antiangiogenic role for miR-92a in ECs, where injection of miR-92a antagomirs (small synthetic RNAs that are perfectly complementary to the specific miRNA to inhibit its function) into mice promoted neovascularization in ischemic limbs. This antiangiogenic function was mediated by ITGA5 (integrin  $\alpha 5$  subunit) repression and also indirectly suppressed eNOS production [87]. The second showed that overexpression of miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, and miR-19b inhibited EC sprouting, network formation, and cell migration, which was reversed when they were silenced [86]. However, the combined antagomir inhibition of miR-17 and miR-20a *in vivo* enhanced vessel invasion into subcutaneous tissue, although it did not enhance tumour angiogenesis; relevant targets for this miR-17 antiangiogenic activity include the cell cycle inhibitor *p21*, the SIP receptor EDG1, and the protein kinase JAK-1 [86]. A new study has shown that miR-17-3p controls the angiogenic process in HUVECs *in vitro* in a cell-autonomous manner by modulating the FLK-1 (VEGFR-2) expression implicated in the pleiotropic effects of angiogenesis. miR-17-3p negatively regulates FLK-1-mediated angiogenesis in ECs by rapidly downregulating expression via a 21 bp fragment from the *FLK-1* 3'-UTR [88]. Thus both the pro- and antiangiogenic properties of the miR-17-92 cluster seem to be related to the cellular microenvironment.

Inhibition of Dicer and Drosha by siRNAs reduces *let-7f* and miR-27b expression in ECs *in vitro*, and inhibitors for both miRNAs contribute to the reduction of *in vitro* angiogenesis and sprout formation, suggesting that *let-7f* and miR-27b promote angiogenesis by targeting antiangiogenic genes such as *THBS1* (using *in silico* analysis of predicted targets), although these targets have not yet been characterised [60, 75]. Furthermore, miR-214 overexpression in ECs significantly inhibited tubular sprouting, and, similarly, knockdown

of the quaking protein (a direct miR-214 target which is critical for vascular development) reduced proangiogenic growth factor expression and EC sprouting; moreover, miR-214 upregulation decreased the secretion of proangiogenic growth factors, including VEGF, which was reversed by inhibiting it [89].

Finally, Fang et al. reported that miR-93, a miRNA from the miR-106B-25 cluster and a paralog of the miR-17-92 cluster, has both pro- and antiangiogenic properties. It enhanced EC activities, including cell spreading and tube formation in a human breast carcinoma cell line by targeting the *LATS2* gene (large tumour suppressor kinase 2), whereas it was found to be upregulated in human breast carcinoma tissues [90].

The most important mechanisms and functions involved in EC regulation by miRNAs described above are summarized in Figure 2 and Table 1.

**4.3. miRNAs and Hypoxia.** Hypoxia, a key driver of angiogenesis, works primarily by inducing angiogenic factors via the HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor-1 alpha) pathway. Hypoxia occurs during tumour development, and several hypoxia-regulated miRNAs have been identified in cancer cells, as detailed below.

miR-210 is the only miRNA so far identified which strongly responds to hypoxic stress in virtually all experimental systems *in vivo* and *in vitro* and in both normal and tumour cells under physiological hypoxic conditions [91]. Hypoxia in tumours is closely related with angiogenesis [92] and several proangiogenic factors are overexpressed in tumours as a response to a hypoxic microenvironment [93], VEGF being the best example [94, 95]. miR-210 and VEGF expression were closely correlated in breast cancer patients [96], showing a possible role for miR-210 in tumour angiogenesis. In support of this, two independent studies demonstrated that upregulation of miR-210 in normoxic HUVECs induced the formation of capillary-like structures and VEGF-dependent EC migration, while inhibiting it antagonised these processes [97, 98]. Furthermore, miR-210 induces angiogenesis in part repressing endothelial ligand ephrin-A3, which is an antiangiogenic factor [97]. In another study HUVECs cultured with exosomes derived from mouse breast cancer 4T1 cells which were transfected with miR-210 had significantly increased migration and capillary formation [99]. Taken together, this data suggests that miR-210 may be one of the angiogenesis-promoting factors released by tumour cells, therefore explaining the increased quantities of miR-210 found in the circulation of cancer patients [100, 101].

Two studies performed in four different murine tumour cell lines as well as the MCE-7 breast cancer cell line showed that miR-20b regulates angiogenesis by targeting VEGF and HIF-1 $\alpha$  [102, 103]. While repression of miR-20b enhanced HIF-1 $\alpha$  and VEGF protein levels in normoxic conditions, hypoxic conditions increased miR-20b levels and decreased HIF-1 $\alpha$  and VEGF levels. Overexpression of HIF-1 $\alpha$  also downregulated miR-20b expression in normoxic tumour cells, whereas HIF-1 $\alpha$  repression in hypoxic tumour cells caused miR-20b to increase. It is thought that this might

be a novel molecular regulation mechanism through which miR-20b regulates HIF-1 $\alpha$  and VEGF but which is also self-regulated by HIF-1 $\alpha$  so that tumour cells continuously adapt to different oxygen concentrations [103]. In support of this idea Cascio et al. used hypoxia-mimicking conditions (CoCl<sub>2</sub> exposure) to demonstrate that VEGF expression in breast cancer cells is mediated by HIF-1 $\alpha$  and STAT3 in a miR-20b-dependent manner. miR-20b decreased VEGF protein levels after CoCl<sub>2</sub> treatment, and VEGF mRNA downregulation by miR-20b was associated with reduced levels of nuclear HIF-1 $\alpha$  and STAT3; STAT3 was also necessary for CoCl<sub>2</sub>-mediated HIF1 $\alpha$  nuclear accumulation and its recruitment to the VEGF promoter [102].

Additionally, miR-21 has been identified as one of the most important miRNAs associated with tumour growth and metastasis. Lei et al. confirmed that its overexpression in DU145 cells increases both HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression to promote tumour angiogenesis and that, similar to previous findings [103], HIF-1 $\alpha$  (itself a key downstream miR-21 target) downregulation negated miR-21-induced tumour angiogenesis. miR-21 activates AKT and ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinases) by targeting PTEN (phosphatase and tensin homolog) which elevates HIF-1 $\alpha$  and VEGF expression [104]. Interestingly, miR-21 is only upregulated by hypoxia in AKT2-expressing cells, and AKT2 confers greater resistance to hypoxia than AKT1 or AKT3. When miR-21 is upregulated in hypoxic conditions AKT2 downregulates PTEN which then activates the other two Akt isoforms. In addition, miR-21 also downregulates PDCD4 (programmed cell death 4) and sprouty 1 (Spry1) which, together with PTEN downregulation, confers resistance to hypoxia [105]. This group also confirmed the involvement of the AKT2/miR-21 pathway in angiogenesis *in vivo* in hypoxic human ovarian carcinoma cells and in the MMTV-PyMT (mouse mammary tumour virus-polyoma-middle T) breast cancer metastasis model. Taken together, these data indicate that a novel AKT2-dependent pathway is activated by hypoxia and that this promotes tumour resistance by inducing miR-21.

The miR-200 family plays a crucial role in epithelial-to-mesenchymal transition by controlling cell migration and polarity [106–108]. Delivery of miR-200b mimic into HMECs (human microvascular endothelial cells) suppressed the angiogenic response, whereas miR-200b-depleted HMECs exhibited elevated angiogenesis *in vitro*, as evidenced by Matrigel tube formation and cell migration assays [109]. Using different technologies, this group showed that (i) ETS-1 (avian erythroblastosis virus E26 (v-ets) oncogene homolog-1), an essential angiogenesis-related transcription factor, is a direct miR-200b target, (ii) some ETS-1-associated genes such as *MMP-11* and *VEGFR-2* were downregulated by miR-200b, and (iii) hypoxia and HIF-1 $\alpha$  stabilisation inhibited miR-200b expression, increasing ETS-1 expression. As miR-200b becomes downregulated in a hypoxic environment its expression is derepressed and angiogenesis is promoted [109]. A recent study on the A549 and HUVEC cell lines demonstrated that miR-200c regulates VEGFR-2 expression, increasing cancer cell radiosensitivity by targeting the VEGF-VEGFR-2 pathway. Ectopic miR-200c expression in HUVECs significantly impaired angiogenesis, tubulogenesis,



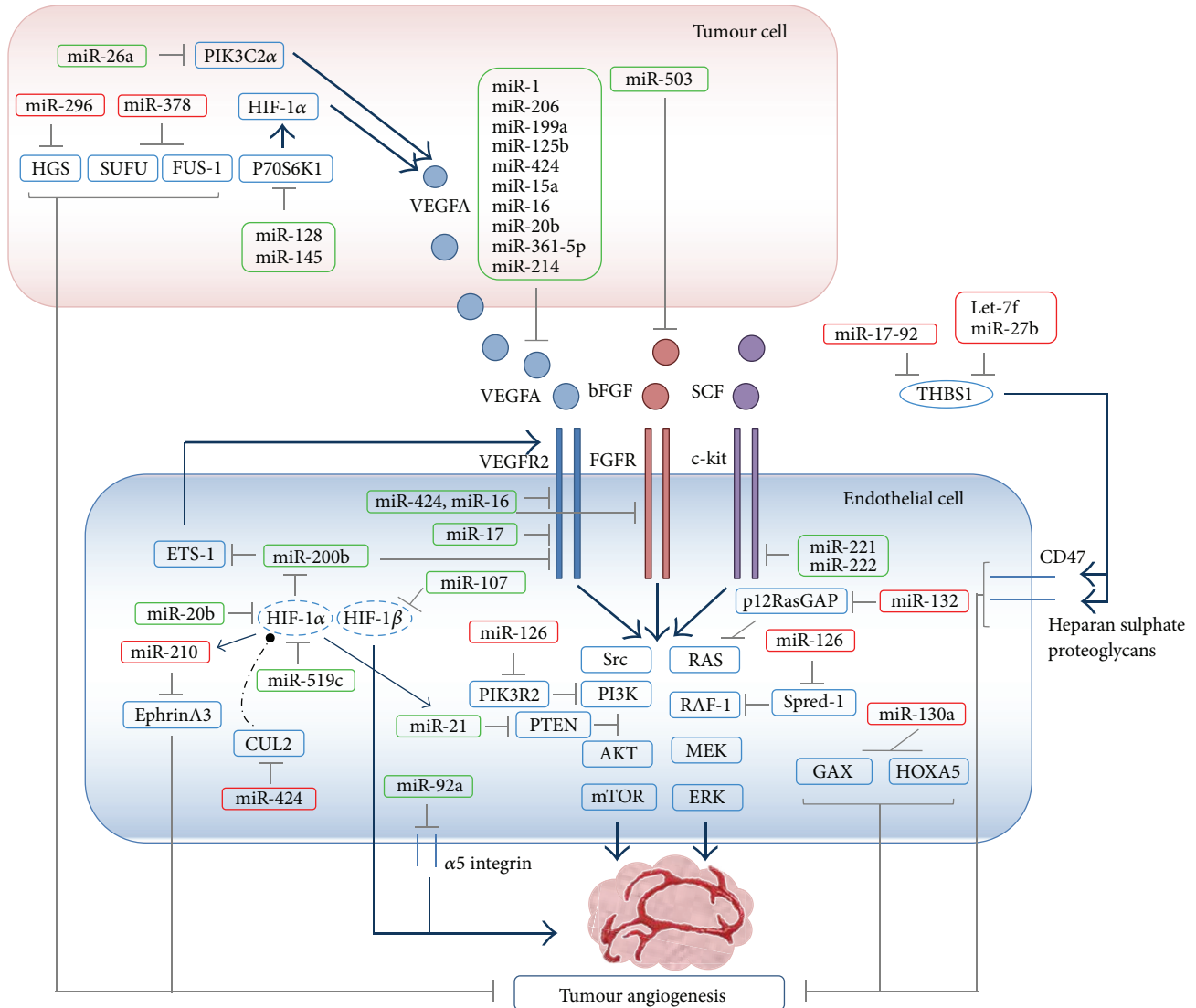


FIGURE 2: miRNAs involved in angiogenic process. Angiogenesis regulation conducted by different miRNAs is based on a complex network and is summarized in this figure. Red boxes indicate proangiogenic miRNA, green boxes indicate antiangiogenic miRNAs, and dashed circles indicate genes involved in molecular pathway taking place in both tumour and endothelial cells. Grey lines represent inhibitory processes while the blue lines with arrows represent activation processes and the dashed black line represents the ubiquitin-mediated degradation HGS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate), SUFU (suppressor of fused), FUS-1 (FUS RNA binding protein), PIK3C2 $\alpha$  (phosphoinositide-3-kinase class 2 $\alpha$ ), THBS1 (thrombospondin-1), HIF-1 $\alpha$  (hypoxia-inducible factor 1 alpha), HIF-1 $\beta$  (hypoxia-inducible factor-1 beta), VEGF (vascular endothelial growth factor), bFGF (basic fibroblast growth factor), Spred-1 (sprouty-related, EVH1 domain containing 1), PIK3R2 (phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2), SCF (stem cell factor), c-KIT (tyrosine-protein kinase kit), VEGFR-2 (vascular endothelial growth factor receptor 2), ERK (extracellular signal-regulated kinase), AKT (v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1), PTEN (phosphatase and tensin homolog), Ets-1 (avian erythroblastosis virus E26 (v-ets) oncogene homolog-1), fibroblast growth factor receptor-1 (FGFR-1), GAX (growth arrest homeobox) and HOXA5 (homeobox A5), RAS (v-ki-ras2 kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog), RAF-1 (v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1), Cul2 (Cullin 2), mTOR (mechanistic target of rapamycin serine/threonine kinase), and Src (v-src avian sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog).

and migration, whereas miR-200c suppression increased tube formation and migration by about 30% [110].

In addition to the key miRNAs discussed above, miR-107, miR-519c, and miR-424 have also been implicated in hypoxia-induced angiogenesis. Yamakuchi et al. showed that miR-107 decreases hypoxic signalling in human colon cancer cells by inhibiting *HIF-1 $\beta$*  and that it is transcriptionally

regulated by p53; in addition, miR-107 overexpression in mouse tumour cells repressed tumour angiogenesis, growth, and VEGF expression [111]. Cha et al. identified miR-519c as another important hypoxia-independent regulator which directly binds the *HIF-1 $\alpha$*  3'UTR and thus causes a reduction in tumour angiogenesis. Overexpression of this miRNA significantly decreased HIF-1 $\alpha$  protein levels and

TABLE 1: Angiogenic miRNAs related to cancer and their targets.

| miRNA             | Role                             | Function  | Targets                                      | Reference                |
|-------------------|----------------------------------|---|--|--------------------------|
| Dicer             | Function loss                    | Maturation of microRNAs   | miRNAs                                       | [56, 57]<br>[58, 60, 61] |
| miR-126           | Proangiogenic                    | Regulates the response of endothelial cells to VEGF                                 | SPRED-1,<br>PIK3R2,<br>VECAM-1,              | [64, 68, 71]             |
| miR-221/222       | Antiangiogenic and proangiogenic | Inhibitor of SCF  | C-KIT, eNOS,<br>p27                          | [73]<br>[61]<br>[74]     |
| miR-17-92 cluster | Proangiogenic and antiangiogenic | Regulation of vascular integrity  | THBS1, p21, SIP,<br>JAK1<br>Flk-1 (VEGFR-2)  | [83]<br>[86]<br>[88]     |
| let-7f; miR-27b   | Proangiogenic                    | ↑EC-mediated angiogenesis   | *ND  | [75]                     |
| miR-214           | Antiangiogenic                   | Tubular sprouting   | Quaking                                      | [89]                     |
| miR-93            | Proangiogenic                    | Enhanced endothelial cell activity  | LATS2  | [90]                     |
| miR-210           | Proangiogenic                    | Endothelial cell migration and formation of capillaries                             | Ephrin-A3                                    | [97]                     |
| miR-20b           | Antiangiogenic                   | Decreases levels of HIF1A and VEGF  | VEGF, HIF-1 $\alpha$                         | [102, 103]               |
| miR-21            | Antiangiogenic                   | Induction of tumour angiogenesis, confers resistance to hypoxia                     | PTEN,<br>PDCD4, Sprouty1                     | [104]<br>[105]           |
| miR-200 family    | Antiangiogenic                   | Epithelial-mesenchymal transition   | ETS-1  | [109]                    |
| miR-200c          | Antiangiogenic                   | Epithelial-mesenchymal transition   | VEGFR-2                                      | [110]                    |
| miR-107           | Antiangiogenic                   | Hypoxia signalling  | HIF-1 $\beta$                                | [111]                    |
| miR-519c          | Proangiogenic                    | Depletion of tumour angiogenesis  | HIF-1 $\alpha$                               | [112]                    |
| miR-424           | Proangiogenic and antiangiogenic | Destabilization of the E3-ligase assembly, increasing HIF-1 $\alpha$ levels         | CUL-2<br>VEGF<br>VEGFR-2<br>FGFR-1           | [113]<br>[117]           |
| miR-15a           | Antiangiogenic                   | Control of the cell cycle, apoptosis, proliferation, and angiogenesis               | BCL-2<br>VEGF-A                              | [116]                    |
| miR-16            | Antiangiogenic                   | Controls VEGF expression and induces cell apoptosis                                 | VEGF<br>VEGFR-2<br>FGFR-1<br>BCL-2<br>VEGF-A | [117]<br>[116]           |
| miR-378           | Proangiogenic                    | Cell survival and tumour growth   | SUFU and FUS-1                               | [114, 119]               |
| miR-296           | Proangiogenic                    | Promotes angiogenesis by increasing levels of proangiogenic growth factor receptors | HGS  | [120]                    |
| miR-199a          | Antiangiogenic                   | Suppresses tumour angiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway                 | HER3   | [121]                    |
| miR-125b          | Antiangiogenic                   | Suppresses tumour angiogenesis via the HIF-1 $\alpha$ /VEGF pathway                 | HER2<br>HER3                                 | [121]                    |
| miR-361-5p        | Antiangiogenic                   | Cancer development and progression  | VEGF A                                       | [122]                    |
| miR-1/206         | Antiangiogenic                   | Regulation of VegfA expression  | VEGF A                                       | [124]                    |
| miR-10b           | Proangiogenic                    | Regulation of endothelial cell division and migration                               | HOXD10, FLT1                                 | [123]                    |
| miR-196b          | Proangiogenic                    | *ND   | *ND  | [63]                     |
| miR-503           | Antiangiogenic                   | Overexpression reduces tumour angiogenesis  | FGF2, VEGFA                                  | [130]                    |
| miR-128           | Antiangiogenic                   | Decreases cell proliferation, tumour growth, and angiogenesis                       | P70S6K1                                      | [131]                    |

TABLE 1: Continued.

| miRNA    | Role           | Function   | Targets                | Reference      |
|----------|----------------|--|------------------------|----------------|
| mir-145  | Antiangiogenic | Inhibition of tumour growth and angiogenesis                             | P70S6K1                | [132]          |
| miR-130a | Proangiogenic  | Increases angiogenesis by targeting GAX and HOXA5 (antiangiogenic genes) | GAX, HOXA5             | [133]          |
| miR-132  | Proangiogenic  | Increases Ras activity   | p120RasGAP             | [134]          |
| miR-26a  | Antiangiogenic | Suppresses tumour growth and metastasis                                  | PIK3C2 $\alpha$<br>HGF | [135]<br>[136] |

\*ND: not described.

reduced HUVEC tubulogenesis, whereas its inhibition by antagomirs had the opposite effect [112]. miR-424, which is increased in hypoxic ECs and during vascular remodelling *in vivo*, is thought to play an important role in postischemic vascular remodelling and angiogenesis. It inhibits CUL2 (Cullin 2) expression by targeting its 3'-UTR, stabilising HIF-1 $\alpha$ , which then transcriptionally activates VEGF; similarly, EC transfection with miR-424 increases both HIF-1 $\alpha$  and HIF-2 $\alpha$  expression and increases proliferation and migration, presumably through the same VEGF-mediated mechanism [113].

In summary, many different studies have identified the functional targets and pathways involved in miRNA-mediated regulation of hypoxia (Figure 2 and Table 1), providing a rationale for a new therapeutic approach to suppressing hypoxia-induced tumour angiogenesis.

**4.4. miRNAs and the VEGF Pathway.** The first miRNAs which were directly associated with tumour biology by their downregulation or deletion were miR-15a and miR-16; expression of these miRNAs is reduced in response to hypoxia which increases VEGF expression [114]. These miRNAs also induce apoptosis in leukaemia cells by inhibiting BCL-2 (an antiapoptotic protein) and blocking cell cycle progression, making them attractive antitumour targets which could be used to block tumour cell survival, proliferation, and VEGF-mediated angiogenesis [115]. miR-15a and miR-16 are significantly underexpressed in primary multiple myeloma (MM) cells as well as MM cell lines and their expression inversely correlates with VEGF in both human MM cell lines and normal plasma cells [116]. Moreover, miR-16 and another miRNA, miR-424, decrease VEGF, VEGFR-2, and FGFR-1 (fibroblast growth factor receptor-1) expression (all of which have been validated as miR-16 and miR-424 targets in ECs using mimetic microRNAs) and hence play an important role in regulating the cell-intrinsic angiogenic activity of ECs by increasing VEGF and bFGF signalling [117]. Dejean et al. showed that miR-16 directly interacts with VEGF mRNA at the 3'-UTR and that ALK expression leads to miR-16 downregulation, thus increasing VEGF levels. This was further supported by experiments in TPM3-ALK (conditional onco-ALK) MEF cells which showed that both ALK and HIF1 $\alpha$  expression are a prerequisite for miR-16 downregulation; in agreement with these findings, increased miR-16 expression *in vivo* reduced angiogenesis and tumour growth [118].

miR-378 is another important angiogenic regulator. When this miRNAs is overexpressed in cancer cell lines, *SUFU* (suppressor of fused) and *FUS-1* (FUS RNA binding protein), two tumour suppressor genes, are downregulated, and as a consequence there is an increase in the levels of VEGF, thus increasing cell survival and reducing cell death [119].

Similarly, increased miR-296 expression activates angiogenesis in cultured ECs due to the suppression of HGS (hepatocyte growth factor-regulated tyrosine kinase substrate) which mediates VEGFR-2 and PDGFR- $\beta$  (platelet derived growth factor receptor beta) degradation, whereas miR-296 inhibition reduces angiogenesis in tumour xenografts [120]. In contrast, He et al. identified another two miRNAs, miR-199a and miR-125b, which were downregulated in ovarian cancer tissues and cell lines, and overexpression of these miRNAs inhibits tumour-induced angiogenesis and is associated with a decrease in VEGF mRNA and protein expression [121]. A different miRNA, miR-361-5p, represses a miRNA recognition element located in a conserved downstream region of the *VEGFA* 3'-UTR and is inversely correlated with VEGFA expression in human squamous cell carcinoma (SCC) cells and in healthy skin, indicating that it may play a role in cancers [122].

Two studies in zebrafish have demonstrated that miR-1, miR-206, and miR-10 govern angiogenesis by targeting *vegf* [123, 124]. They negatively regulate developmental angiogenesis by controlling VegfA in muscle and thus angiogenic signalling to the endothelium. Interestingly, reducing the levels of VegfAa but not VegfAb rescued the increase in angiogenesis previously observed when miR-1/206 were knocked down [124]. miR-10 repression led to premature truncation of intersegmental vessel growth in the trunk of zebrafish larvae, and its overexpression promoted angiogenesis in both zebrafish and cultured HUVECs. miR-10 acts by directly regulating FLT1 (a cell-surface receptor that binds VEGF) and its soluble splice variant SFLT1. Its downregulation in zebrafish and HUVECs increases FLT1/SFLT1 protein levels, which binds VEGF with higher affinity than VEGFR-2 and therefore negatively regulates VEGFR-2 signalling pathway [123]. Moreover, miR-10b and miR-196b have been related to angiogenesis and cancer metastasis [125–129] and are both upregulated in murine ECs treated with tumour-conditioned medium, although only miR-10 responded to increased VEGF levels. These miRNAs are preferentially expressed in the vasculature of more invasive human breast tumours

and are upregulated by tumour-produced growth factors in human ECs [63]. Taken together, these studies establish miR-10, and perhaps miR-196b, as potential new targets for the selective modulation of angiogenesis [123].

Zhou et al. reported that miR-503 simultaneously downregulates *FGF2* and *VEGFA*. miR-503 expression is inhibited in hepatocarcinoma cells and primary tumours which may be due to an epigenetic mechanism; its overexpression reduces tumour angiogenesis *in vitro* and *in vivo*, and furthermore, its expression is downregulated by hypoxia via HIF1 $\alpha$ , thus indicating an antiangiogenesis role in tumorigenesis [130]. Finally, other studies have indicated that miRNAs may function as tumour suppressors by targeting p70S6K1. Two independent studies, the first with miR-128 in glioma [131] and the second with miR-145 in colon cancer tissues [132], demonstrated that decreased p70S6K1 expression, mediated by these miRNAs, inhibits cell proliferation, tumour growth, and angiogenesis which is thought to be because HIF-1 $\alpha$  and VEGF are both downstream to this molecule.

In conclusion, the key angiogenic factor VEGF appears to be regulated by several miRNAs including miR-191, miR-126, miR-155, miR-31, the miR-17-92 cluster, miR-10, miR196, and miR-1/206 (summarized in Figure 2 and Table 1); however, exhaustive studies on the implication of these miRNAs in therapeutic treatments are needed before these findings can be added to existing therapeutic anti-VEGF drugs.

**4.5. miRNAs That Affect Other Pathways Implicated in Angiogenesis.** Other angiogenesis-modulating miRNAs that do not affect any of the previously described targets include miR-132, miR-26a, and miR-130a (Figure 2 and Table 1), the latter of which inhibits the expression of two antiangiogenic genes: *GAX* (growth arrest homeobox) and *HOXA5* (homeobox A5) [133] and is produced in increased amounts by hECs (human embryonic carcinoma cells) in culture. Similarly, miR-132 is also highly upregulated in a human vasculogenesis model as well as in human tumour endothelium [134]. Its ectopic expression *in vitro* enhances EC proliferation and tubulogenesis. MiR-132 expression in hECs repressed p120RasGAP (its predicted target) increasing RAS activity and thus promoting angiogenesis, which could explain why p120RasGAP is expressed in normal but not in tumour endothelium [134]. Further, supporting this, the same group showed that the addition of anti-miR-132 inhibited angiogenesis in wild-type mice but not in mice with an inducible *Rasa1* (encoding p120RasGAP) deletion; in another experiment, targeted delivery of anti-miR-132 nanoparticles to the vessels restored p120RasGAP expression in the tumour endothelium, suppressing angiogenesis and decreasing the tumour burden in an orthotopic xenograft mouse model of human breast carcinoma. It is therefore thought that miR-132 acts as an angiogenic switch by suppressing endothelial p120RasGAP expression, resulting in Ras activation and induction of neovascularization which is counteracted by anti-miR-132 [134]. Taken together, these observations indicate that miR-132 may play an important role in pathological neovascularization downstream of multiple triggers, including tumour-derived growth factors, viral infections, and inflammation.

Recent studies in human HCCs (hepatocellular carcinoma cells) have demonstrated that miR-26a is implicated in tumour angiogenesis [135, 136]. Ectopic expression of miR-26a reduces VEGFA levels in HepG2 (human hepatocellular liver carcinoma cell line) cells. Furthermore, *in silico* analysis indicates that *PIK3C2 $\alpha$*  is a downstream miR-26a target gene, and inhibition studies suggest that miR-26a decreases VEGFA expression in HCCs via the PI3K/AKT/HIF-1 $\alpha$ /VEGFA pathway. Finally, VEGFA levels inversely correlate with miR-26a levels in HCC tumours [135], and there is also a correlation between miR-26a downregulation and increased angiogenic potential in HCCs [136]. In addition, HGF (hepatocyte growth factor) has been identified as a miR-26a target, demonstrating its antiangiogenic function which is at least partially mediated by inhibiting cMet (HGF-hepatocyte growth factor receptor) and its downstream signalling pathway, thus reducing VEGFA expression in HCCs and decreasing VEGFR-2 signaling in ECs [136].

## 5. “Angiogenic” miRNAs in the Era of Personalised Medicine

There are different therapeutic strategies for inhibiting miRNAs *in vivo* that are currently being evaluated in preclinical models (reviewed in [137]). These strategies include the following.

**Antagomirs.** They are a class of chemically engineered oligonucleotides which are able to silence endogenous miRNAs. They are specifically designed, chemically modified, cholesterol-conjugated single-stranded RNA analogues which are complementary to miRNA targets [138–140].

**Locked Nucleic Acid- (LNA-) AntimiRs.** They are antisense RNA oligonucleotides in which the ribose moiety of an LNA nucleotide is modified to increase stability and specificity. LNA nucleotides can be mixed with DNA or RNA residues in the oligonucleotide depending on the user's requirements [141].

**MiR Sponge.** This is miRNA-inhibiting transgene which expresses an mRNA which contains multiple tandem binding sites for an endogenous miRNA which is thus able to stably interact with the corresponding miRNA and prevent its association with its endogenous targets [142].

**miR-Mask.** This is a single-stranded 2'-O-methyl-modified antisense oligonucleotide which is fully complementary to the predicted miRNA binding sites in the 3'-UTRs of target mRNAs. The miR-mask is therefore able to obscure the access of the miRNA to its binding sites on the target mRNA and so impairs its inhibitory function [143].

Alternatively, there are strategies intended to restore miRNA levels, such as miRNA mimics. It is based on the use of double-stranded synthetic oligonucleotides that mimic endogenous miRNAs and are processed into the cell when they are transfected [144]. The expression vectors of these miRNAs are constructed with promoters that can enable the expression of certain miRNAs in a tissue-/tumour-specific

manner [145]. For instance, a liposome-formulated mimic of the tumour suppressor miR-34 named MRX34 (developed by Mirna Therapeutics) produced a complete tumour regression in orthotopic mouse models of hepatocellular carcinoma [146]. These results prompted the development of an ongoing phase I multicentre clinical trial (ClinicalTrials.gov identifier:NCT01829971) to evaluate the safety of MRX34 in patients with primary liver cancer or those with liver metastasis from other cancers.

In summary, although the pharmacological manipulation of miRNAs is still in its initial steps, there are scientific evidences demonstrating the potent modulatory impact of certain miRNAs on the angiogenic response.

## 6. Conclusions

miRNAs are implicated in most, if not all, signalling pathways and in many human diseases, including cancer. This review summarizes the role of miRNAs in the control of different pathways related to angiogenesis and, in particular, with the tumour neovascularization. To date there are groups of well characterized miRNAs implicated in regulating EC function and angiogenesis, making them attractive objectives in tumour angiogenesis. Hopefully, in a few years targeted use of specific miRNAs against angiogenic pathways in cancer will become a reality, allowing combining these with other types of antitumour strategies.

## Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

## Acknowledgments

This study was partially supported by a Grant from Ministerio de Ciencia e Innovación de España (TRA09-0132), Beca Roche en Onco-Hematología 2009, and Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer (RD12/0036/0025).

## References

- [1] R. C. Lee, R. L. Feinbaum, and V. Ambros, "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*," *Cell*, vol. 75, no. 5, pp. 843–854, 1993.
- [2] A. Esquela-Kerscher and F. J. Slack, "Oncomirs—microRNAs with a role in cancer," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 4, pp. 259–269, 2006.
- [3] R. Garzon, M. Fabbri, A. Cimmino, G. A. Calin, and C. M. Croce, "MicroRNA expression and function in cancer," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 12, no. 12, pp. 580–587, 2006.
- [4] P. S. Meltzer, "Cancer genomics: small RNAs with big impacts," *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 745–746, 2005.
- [5] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska et al., "MicroRNA expression profiles classify human cancers," *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 834–838, 2005.
- [6] G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru et al., "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 101, no. 9, pp. 2999–3004, 2004.
- [7] G. A. Calin and C. M. Croce, "MicroRNA signatures in human cancers," *Nature Reviews Cancer*, vol. 6, no. 11, pp. 857–866, 2006.
- [8] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Identification of novel genes coding for small expressed RNAs," *Science*, vol. 294, no. 5543, pp. 853–858, 2001.
- [9] N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein, and D. P. Bartel, "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*," *Science*, vol. 294, no. 5543, pp. 858–862, 2001.
- [10] R. C. Lee and V. Ambros, "An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*," *Science*, vol. 294, no. 5543, pp. 862–864, 2001.
- [11] D. P. Bartel, "MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions," *Cell*, vol. 136, no. 2, pp. 215–233, 2009.
- [12] M. Ul Hussain, "Micro-RNAs (miRNAs): genomic organisation, biogenesis and mode of action," *Cell and Tissue Research*, vol. 349, no. 2, pp. 405–413, 2012.
- [13] Y. Lee, M. Kim, J. Han et al., "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II," *The EMBO Journal*, vol. 23, no. 20, pp. 4051–4060, 2004.
- [14] A. M. Denli, B. B. J. Tops, R. H. A. Plasterk, R. F. Ketting, and G. J. Hannon, "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex," *Nature*, vol. 432, no. 7014, pp. 231–235, 2004.
- [15] R. I. Gregory, K. Yan, G. Amuthan et al., "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs," *Nature*, vol. 432, no. 7014, pp. 235–240, 2004.
- [16] J. Han, Y. Lee, K. Yeom, Y. Kim, H. Jin, and V. N. Kim, "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing," *Genes and Development*, vol. 18, no. 24, pp. 3016–3027, 2004.
- [17] J. Han, Y. Lee, K. H. Yeom et al., "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex," *Cell*, vol. 125, no. 5, pp. 887–901, 2006.
- [18] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara, and B. R. Cullen, "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs," *Genes & Development*, vol. 17, no. 24, pp. 3011–3016, 2003.
- [19] E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg, and U. Kutay, "Nuclear Export of MicroRNA Precursors," *Science*, vol. 303, no. 5654, pp. 95–98, 2004.
- [20] M. T. Bohnsack, K. Czaplinski, and D. Görlich, "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs," *RNA*, vol. 10, no. 2, pp. 185–191, 2004.
- [21] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond, and G. J. Hannon, "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference," *Nature*, vol. 409, no. 6818, pp. 363–366, 2001.
- [22] G. Hutvagner, J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, É. Bálint, T. Tuschl, and P. D. Zamore, "A cellular function for the RNA-interference enzyme dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA," *Science*, vol. 293, no. 5531, pp. 834–838, 2001.
- [23] G. Hutvagner and P. D. Zamore, "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex," *Science*, vol. 297, no. 5589, pp. 2056–2060, 2002.
- [24] Z. Mourelatos, J. Dostie, S. Paushkin et al., "miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs," *Genes and Development*, vol. 16, no. 6, pp. 720–728, 2002.

- [25] R. W. Carthew and E. J. Sontheimer, "Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs," *Cell*, vol. 136, no. 4, pp. 642–655, 2009.
- [26] J. Krol, I. Loedige, and W. Filipowicz, "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay," *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, no. 9, pp. 597–610, 2010.
- [27] T. A. Farazi, J. I. Hoell, P. Morozov, and T. Tuschl, "MicroRNAs in human cancer," *Advances in Experimental Medicine and Biology*, vol. 774, pp. 1–20, 2013.
- [28] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu et al., "Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, no. 24, pp. 15524–15529, 2002.
- [29] H. Tagawa and M. Seto, "A microRNA cluster as a target of genomic amplification in malignant lymphoma," *Leukemia*, vol. 19, no. 11, pp. 2013–2016, 2005.
- [30] J. T. Huse, C. Brennan, D. Hambarzumyan et al., "The PTEN-regulating microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo," *Genes and Development*, vol. 23, no. 11, pp. 1327–1337, 2009.
- [31] J. Takamizawa, H. Konishi, K. Yanagisawa et al., "Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival," *Cancer Research*, vol. 64, no. 11, pp. 3753–3756, 2004.
- [32] C. Mayr, M. T. Hemann, and D. P. Bartel, "Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation," *Science*, vol. 315, no. 5818, pp. 1576–1579, 2007.
- [33] L. J. Chin, E. Ratner, S. Leng et al., "A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk," *Cancer Research*, vol. 68, no. 20, pp. 8535–8540, 2008.
- [34] S. Jiang, H. Zhang, M. Lu et al., "MicroRNA-155 functions as an oncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene," *Cancer Research*, vol. 70, no. 8, pp. 3119–3127, 2010.
- [35] L. Han, P. D. Witmer, E. Casey, D. Valle, and S. Sukumar, "DNA methylation regulates microRNA expression," *Cancer Biology & Therapy*, vol. 6, no. 8, pp. 1284–1288, 2007.
- [36] Y. Saito and P. A. Jones, "Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells," *Cell Cycle*, vol. 5, no. 19, pp. 2220–2222, 2006.
- [37] Y. Saito, G. Liang, G. Egger et al., "Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells," *Cancer Cell*, vol. 9, no. 6, pp. 435–443, 2006.
- [38] U. Lehmann, B. Hasemeier, M. Christgen et al., "Epigenetic inactivation of microRNA gene hsa-mir-9-1 in human breast cancer," *Journal of Pathology*, vol. 214, no. 1, pp. 17–24, 2008.
- [39] T. Chang, E. A. Wentzel, O. A. Kent et al., "Transactivation of miR-34a by p53 Broadly Influences Gene Expression and Promotes Apoptosis," *Molecular Cell*, vol. 26, no. 5, pp. 745–752, 2007.
- [40] L. He, X. He, S. W. Lowe, and G. J. Hannon, "microRNAs join the p53 network—another piece in the tumour-suppression puzzle," *Nature Reviews Cancer*, vol. 7, no. 11, pp. 819–822, 2007.
- [41] P. Landgraf, M. Rusu, R. Sheridan et al., "A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing," *Cell*, vol. 129, no. 7, pp. 1401–1414, 2007.
- [42] M. E. Hatley, D. M. Patrick, M. R. Garcia et al., "Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21," *Cancer Cell*, vol. 18, no. 3, pp. 282–293, 2010.
- [43] T. Huang, F. Wu, G. B. Loeb et al., "Up-regulation of miR-21 by HER2/neu signaling promotes cell invasion," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, no. 27, pp. 18515–18524, 2009.
- [44] K. A. O'Donnell, E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang, and J. T. Mendell, "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression," *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 839–843, 2005.
- [45] L. He, J. M. Thomson, M. T. Hemann et al., "A microRNA polycistron as a potential human oncogene," *Nature*, vol. 435, no. 7043, pp. 828–833, 2005.
- [46] J. Folkman, "Fundamental concepts of the angiogenic process," *Current Molecular Medicine*, vol. 3, no. 7, pp. 643–651, 2003.
- [47] T. Veikkola, M. Karkkainen, L. Claesson-Welsh, and K. Alitalo, "Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors," *Cancer Research*, vol. 60, no. 2, pp. 203–212, 2000.
- [48] B. R. Zetter, "Angiogenesis and tumor metastasis," *Annual Review of Medicine*, vol. 49, pp. 407–424, 1998.
- [49] R. Roskoski Jr., "Vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling in tumor progression," *Critical Reviews in Oncology Hematology*, vol. 62, no. 3, pp. 179–213, 2007.
- [50] M. K. Gupta and R. Y. Qin, "Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis," *World Journal of Gastroenterology*, vol. 9, no. 6, pp. 1144–1155, 2003.
- [51] G. Bergers and L. E. Benjamin, "Tumorigenesis and the angiogenic switch," *Nature Reviews Cancer*, vol. 3, no. 6, pp. 401–410, 2003.
- [52] M. Papetti and I. M. Herman, "Mechanisms of normal and tumor-derived angiogenesis," *The American Journal of Physiology—Cell Physiology*, vol. 282, no. 5, pp. C947–C970, 2002.
- [53] P. Carmeliet, "Angiogenesis in life, disease and medicine," *Nature*, vol. 438, no. 7070, pp. 932–936, 2005.
- [54] M. Katoh, "Therapeutics targeting angiogenesis: genetics and epigenetics, extracellular miRNAs and signaling networks (Review)," *International Journal of Molecular Medicine*, vol. 32, no. 4, pp. 763–767, 2013.
- [55] J. Welti, S. Loges, S. Dimmeler, and P. Carmeliet, "Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 123, no. 8, pp. 3190–3200, 2013.
- [56] E. Bernstein, S. Y. Kim, M. A. Carmell et al., "Dicer is essential for mouse development," *Nature Genetics*, vol. 35, no. 3, pp. 215–217, 2003.
- [57] E. Wienholds, M. J. Koudijs, F. J. M. Van Eeden, E. Cuppen, and R. H. A. Plasterk, "The microRNA-producing enzyme Dicer1 is essential for zebrafish development," *Nature Genetics*, vol. 35, no. 3, pp. 217–218, 2003.
- [58] W. J. Yang, D. D. Yang, S. Na, G. E. Sandusky, Q. Zhang, and G. Zhao, "Dicer is required for embryonic angiogenesis during mouse development," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, no. 10, pp. 9330–9335, 2005.
- [59] A. J. Giraldez, R. M. Cinalli, M. E. Glasner et al., "MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish," *Science*, vol. 308, no. 5723, pp. 833–838, 2005.
- [60] A. Kuehbacher, C. Urbich, A. M. Zeiher, and S. Dimmeler, "Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis," *Circulation Research*, vol. 101, no. 1, pp. 59–68, 2007.
- [61] Y. Suárez, C. Fernández-Hernando, J. S. Pober, and W. C. Sessa, "Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells," *Circulation Research*, vol. 100, no. 8, pp. 1164–1173, 2007.

- [62] J. G. Ruby, C. H. Jan, and D. P. Bartel, "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing," *Nature*, vol. 448, no. 7149, pp. 83–86, 2007.
- [63] P. N. Plummer, R. Freeman, R. J. Taft et al., "MicroRNAs regulate tumor angiogenesis modulated by endothelial progenitor cells," *Cancer Research*, vol. 73, no. 1, pp. 341–352, 2013.
- [64] J. E. Fish, M. M. Santoro, S. U. Morton et al., "miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity," *Developmental Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 272–284, 2008.
- [65] L. H. Parker, M. Schmidt, S. Jin et al., "The endothelial-cell-derived secreted factor Egfl7 regulates vascular tube formation," *Nature*, vol. 428, no. 6984, pp. 754–758, 2004.
- [66] L. Campagnolo, A. Leahy, S. Chitnis et al., "EGFL7 is a chemoattractant for endothelial cells and is up-regulated in angiogenesis and arterial injury," *The American Journal of Pathology*, vol. 167, no. 1, pp. 275–284, 2005.
- [67] F. Soncin, V. Mattot, F. Lionneton et al., "VE-statin, an endothelial repressor of smooth muscle cell migration," *EMBO Journal*, vol. 22, no. 21, pp. 5700–5711, 2003.
- [68] S. Wang, A. B. Aurora, B. A. Johnson et al., "The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis," *Developmental Cell*, vol. 15, no. 2, pp. 261–271, 2008.
- [69] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel, and T. Tuschl, "Identification of tissue-specific MicroRNAs from mouse," *Current Biology*, vol. 12, no. 9, pp. 735–739, 2002.
- [70] E. Wienholds, W. P. Kloosterman, E. Miska et al., "MicroRNA expression in zebrafish embryonic development," *Science*, vol. 309, no. 5732, pp. 310–311, 2005.
- [71] F. Kuhnert, M. R. Mancuso, J. Hampton et al., "Attribution of vascular phenotypes of the murine Egfl7 locus to the microRNA miR-126," *Development*, vol. 135, no. 24, pp. 3989–3993, 2008.
- [72] K. J. Png, N. Halberg, M. Yoshida, and S. F. Tavazoie, "A microRNA regulon that mediates endothelial recruitment and metastasis by cancer cells," *Nature*, vol. 481, no. 7380, pp. 190–196, 2012.
- [73] L. Polisenio, A. Tuccoli, L. Mariani et al., "MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs," *Blood*, vol. 108, no. 9, pp. 3068–3071, 2006.
- [74] C. Le Sage, R. Nagel, D. A. Egan et al., "Regulation of the p27Kip1 tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation," *The EMBO Journal*, vol. 26, no. 15, pp. 3699–3708, 2007.
- [75] Y. Suárez and W. C. Sessa, "MicroRNAs as novel regulators of angiogenesis," *Circulation Research*, vol. 104, no. 4, pp. 442–454, 2009.
- [76] A. Papapetropoulos, G. García-Cardena, J. A. Madri, and W. C. Sessa, "Nitric oxide production contributes to the angiogenic properties of vascular endothelial growth factor in human endothelial cells," *Journal of Clinical Investigation*, vol. 100, no. 12, pp. 3131–3139, 1997.
- [77] P. Dentelli, A. Rosso, F. Orso, C. Olgasi, D. Taverna, and M. F. Brizzi, "MicroRNA-222 controls neovascularization by regulating signal transducer and activator of transcription 5A expression," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 30, no. 8, pp. 1562–1568, 2010.
- [78] S. Nicoli, C. Knyphausen, L. J. Zhu, A. Lakshmanan, and N. D. Lawson, "MiR-221 is required for endothelial tip cell behaviors during vascular development," *Developmental Cell*, vol. 22, no. 2, pp. 418–429, 2012.
- [79] P. Pineau, S. Volinia, K. McJunkin et al., "miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 1, pp. 264–269, 2010.
- [80] L. Venturini, K. Battmer, M. Castoldi et al., "Expression of the miR-17-92 polycistron in chronic myeloid leukemia (CML) CD34+ cells," *Blood*, vol. 109, no. 10, pp. 4399–4405, 2007.
- [81] J. T. Mendell, "miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease," *Cell*, vol. 133, no. 2, pp. 217–222, 2008.
- [82] A. Ota, H. Tagawa, S. Karnan et al., "Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma," *Cancer Research*, vol. 64, no. 9, pp. 3087–3095, 2004.
- [83] F. Kuhnert and C. J. Kuo, "miR-17-92 angiogenesis micromanagement," *Blood*, vol. 115, no. 23, pp. 4631–4633, 2010.
- [84] K. Tréguer, E. Heinrich, K. Ohtani, A. Bonauer, and S. Dimmeler, "Role of the microRNA-17-92 cluster in the endothelial differentiation of stem cells," *Journal of Vascular Research*, vol. 49, no. 5, pp. 447–460, 2012.
- [85] M. Dews, A. Homayouni, D. Yu et al., "Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster," *Nature Genetics*, vol. 38, no. 9, pp. 1060–1065, 2006.
- [86] C. Doebele, A. Bonauer, A. Fischer et al., "Members of the microRNA-17–92 cluster exhibit a cell-intrinsic antiangiogenic function in endothelial cells," *Blood*, vol. 115, no. 23, pp. 4944–4950, 2010.
- [87] A. Bonauer, G. Carmona, M. Iwasaki et al., "MicroRNA-92a controls angiogenesis and functional recovery of ischemic tissues in Mice," *Science*, vol. 324, no. 5935, pp. 1710–1713, 2009.
- [88] R. Yin, R. Wang, L. Guo, W. Zhang, and Y. Lu, "MiR-17-3p inhibits angiogenesis by downregulating flk-1 in the cell growth signal pathway," *Journal of Vascular Research*, vol. 50, no. 2, pp. 157–166, 2013.
- [89] A. van Mil, S. Grundmann, M. Goumans et al., "MicroRNA-214 inhibits angiogenesis by targeting Quaking and reducing angiogenic growth factor release," *Cardiovascular Research*, vol. 93, no. 4, pp. 655–665, 2012.
- [90] L. Fang, W. W. Du, W. Yang et al., "MiR-93 enhances angiogenesis and metastasis by targeting LATS2," *Cell Cycle*, vol. 11, no. 23, pp. 4352–4365, 2012.
- [91] X. Huang, Q.-T. Le, and A. J. Giaccia, "MiR-210—micromanager of the hypoxia pathway," *Trends in Molecular Medicine*, vol. 16, no. 5, pp. 230–237, 2010.
- [92] J. M. Brown and A. J. Giaccia, "The unique physiology of solid tumors: Opportunities (and problems) for cancer therapy," *Cancer Research*, vol. 58, no. 7, pp. 1408–1416, 1998.
- [93] P. Carmeliet and R. K. Jain, "Angiogenesis in cancer and other diseases," *Nature*, vol. 407, no. 6801, pp. 249–257, 2000.
- [94] Y. Liu, S. R. Cox, T. Morita, and S. Kourembanas, "Hypoxia regulates vascular endothelial growth factor gene expression in endothelial cells: Identification of a 5' enhancer," *Circulation Research*, vol. 77, no. 3, pp. 638–643, 1995.
- [95] D. Shweiki, A. Itin, D. Soffer, and E. Keshet, "Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis," *Nature*, vol. 359, no. 6398, pp. 843–845, 1992.
- [96] J. A. Foekens, A. M. Sieuwerts, M. Smid et al., "Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 105, no. 35, pp. 13021–13026, 2008.

- [97] P. Fasanaro, Y. D'Alessandra, V. Di Stefano et al., "MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand ephrin-A3," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 23, pp. 15878–15883, 2008.
- [98] Y. L. Lou, F. Guo, F. L. Liu et al., "MiR-210 activates notch signaling pathway in angiogenesis induced by cerebral ischemia," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 370, no. 1-2, pp. 45–51, 2012.
- [99] N. Kosaka, H. Iguchi, K. Hagiwara, Y. Yoshioka, F. Takeshita, and T. Ochiya, "Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic micrornas regulate cancer cell metastasis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 288, no. 15, pp. 10849–10859, 2013.
- [100] A. S. Ho, X. Huang, H. Cao et al., "Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer," *Translational Oncology*, vol. 3, no. 2, pp. 109–113, 2010.
- [101] A. Zhao, G. Li, M. Péoc'h, C. Genin, and M. Gigante, "Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma," *Experimental and Molecular Pathology*, vol. 94, no. 1, pp. 115–120, 2013.
- [102] S. Cascio, A. D'Andrea, R. Ferla et al., "miR-20b modulates VEGF expression by targeting HIF-1 $\alpha$  and STAT3 in MCF-7 breast cancer cells," *Journal of Cellular Physiology*, vol. 224, no. 1, pp. 242–249, 2010.
- [103] Z. Lei, B. Li, Z. Yang et al., "Regulation of HIF-1 $\alpha$  and VEGF by miR-20b tunes tumor cells to adapt to the alteration of oxygen concentration," *PLoS ONE*, vol. 4, no. 10, Article ID e7629, 2009.
- [104] L. Z. Liu, C. Li, Q. Chen et al., "Mir-21 induced angiogenesis through AKT and ERK activation and HIF-1 $\alpha$  expression," *PLoS ONE*, vol. 6, no. 4, Article ID e19139, 2011.
- [105] C. Polytarchou, D. Iliopoulos, M. Hatziapostolou et al., "Akt2 regulates all Akt isoforms and promotes resistance to hypoxia through induction of miR-21 upon oxygen deprivation," *Cancer Research*, vol. 71, no. 13, pp. 4720–4731, 2011.
- [106] P. A. Gregory, A. G. Bert, E. L. Paterson et al., "The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1," *Nature Cell Biology*, vol. 10, no. 5, pp. 593–601, 2008.
- [107] M. Korpál, E. S. Lee, G. Hu, and Y. Kang, "The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 22, pp. 14910–14914, 2008.
- [108] S. Park, A. B. Gaur, E. Lengyel, and M. E. Peter, "The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2," *Genes and Development*, vol. 22, no. 7, pp. 894–907, 2008.
- [109] Y. C. Chan, S. Khanna, S. Roy, and C. K. Sen, "MiR-200b targets Ets-1 and is down-regulated by hypoxia to induce angiogenic response of endothelial cells," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 3, pp. 2047–2056, 2011.
- [110] L. Shi, S. Zhang, H. Wu et al., "MiR-200c increases the radiosensitivity of non-small-cell lung cancer cell line A549 by targeting VEGF-VEGFR2 pathway," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e78344, 2013.
- [111] M. Yamakuchi, C. D. Lotterman, C. Bao et al., "P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 107, no. 14, pp. 6334–6339, 2010.
- [112] S. T. Cha, P. S. Chen, G. Johansson et al., "MicroRNA-519c suppresses hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  expression and tumor angiogenesis," *Cancer Research*, vol. 70, no. 7, pp. 2675–2685, 2010.
- [113] G. Ghosh, I. V. Subramanian, N. Adhikari et al., "Hypoxia-induced microRNA-424 expression in human endothelial cells regulates HIF- $\alpha$  isoforms and promotes angiogenesis," *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 120, no. 11, pp. 4141–4154, 2010.
- [114] Z. Hua, Q. Lv, W. Ye et al., "Mirna-directed regulation of VEGF and other angiogenic under hypoxia," *PLoS ONE*, vol. 1, article e116, no. 1, 2006.
- [115] A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri et al., "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 39, pp. 13944–13949, 2005.
- [116] C. Y. Sun, X. M. She, Y. B. Qin et al., "miR-15a and miR-16 affect the angiogenesis of multiple myeloma by targeting VEGF," *Carcinogenesis*, vol. 34, no. 2, pp. 426–435, 2013.
- [117] A. Chamorro-Jorganes, E. Araldi, L. O. F. Penalva, D. Sandhu, C. Fernández-Hernando, and Y. Suárez, "MicroRNA-16 and MicroRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 31, no. 11, pp. 2595–2606, 2011.
- [118] E. Dejean, M. H. Renalier, M. Foisseau et al., "Hypoxia-microRNA-16 downregulation induces VEGF expression in anaplastic lymphoma kinase (ALK)-positive anaplastic large-cell lymphomas," *Leukemia*, vol. 25, no. 12, pp. 1882–1890, 2011.
- [119] D. Y. Lee, Z. Deng, C. H. Wang, and B. B. Yang, "MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 51, pp. 20350–20355, 2007.
- [120] T. Würdinger, B. A. Tannous, O. Saydam et al., "miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells," *Cancer Cell*, vol. 14, no. 5, pp. 382–393, 2008.
- [121] J. He, Y. Jing, W. Li et al., "Roles and Mechanism of miR-199a and miR-125b in Tumor Angiogenesis," *PLoS ONE*, vol. 8, no. 2, Article ID e56647, 2013.
- [122] A. Kanitz, J. Imig, P. J. Dziunycz et al., "The expression levels of microRNA-361-5p and its target VEGFA are inversely correlated in human cutaneous squamous cell carcinoma," *PLoS ONE*, vol. 7, no. 11, Article ID e49568, 2012.
- [123] D. Hassel, P. Cheng, M. P. White et al., "MicroRNA-10 regulates the angiogenic behavior of zebrafish and human endothelial cells by promoting vascular endothelial growth factor signaling," *Circulation Research*, vol. 111, no. 11, pp. 1421–1433, 2012.
- [124] C. Stahlhut, Y. Suárez, J. Lu, Y. Mishima, and A. J. Giraldez, "miR-1 and miR-206 regulate angiogenesis by modulating VegfA expression in zebrafish," *Development*, vol. 139, no. 23, pp. 4356–4364, 2012.
- [125] D. Tehler, N. M. Høyland-Kroghsbo, and A. H. Lund, "The miR-10 microRNA precursor family," *RNA Biology*, vol. 8, no. 5, pp. 728–734, 2011.
- [126] A. H. Lund, "MiR-10 in development and cancer," *Cell Death and Differentiation*, vol. 17, no. 2, pp. 209–214, 2010.
- [127] L. Ma, J. Teruya-Feldstein, and R. A. Weinberg, "Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer," *Nature*, vol. 449, no. 7163, pp. 682–688, 2007.
- [128] R. M. O'Connell, D. S. Rao, A. A. Chaudhuri, and D. Baltimore, "Physiological and pathological roles for microRNAs in the



- immune system,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 2, pp. 111–122, 2010.
- [129] X. Shen, J. Fang, X. Lv et al., “Heparin impairs angiogenesis through inhibition of microRNA-10b,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 30, pp. 26616–26627, 2011.
- [130] B. Zhou, R. Ma, W. Si et al., “MicroRNA-503 targets FGF2 and VEGFA and inhibits tumor angiogenesis and growth,” *Cancer Letters*, vol. 333, no. 2, pp. 159–169, 2013.
- [131] Z.-M. Shi, J. Wang, Z. Yan et al., “MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1,” *PLoS ONE*, vol. 7, no. 3, Article ID e32709, 2012.
- [132] Q. Xu, L. Liu, X. Qian et al., “MiR-145 directly targets p70S6K1 in cancer cells to inhibit tumor growth and angiogenesis,” *Nucleic Acids Research*, vol. 40, no. 2, pp. 761–774, 2012.
- [133] Y. Chen and D. H. Gorski, “Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes *GAX* and *HOXA5*,” *Blood*, vol. 111, no. 3, pp. 1217–1226, 2008.
- [134] S. Anand, B. K. Majeti, L. M. Acevedo et al., “MicroRNA-132-mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis,” *Nature Medicine*, vol. 16, no. 8, pp. 909–914, 2010.
- [135] Z. T. Chai, J. Kong, X. D. Zhu, Y. Y. Zhang, L. Lu, and J. M. Zhou, “MicroRNA-26a inhibits angiogenesis by down-regulating VEGFA through the PIK3C2alpha/Akt/HIF-1alpha pathway in hepatocellular carcinoma,” *PLoS ONE*, vol. 8, no. 10, Article ID e77957, 2013.
- [136] X. Yang, X. F. Zhang, X. Lu et al., “MicroRNA-26a suppresses angiogenesis in human hepatocellular carcinoma by targeting hepatocyte growth factor-cMet pathway,” *Hepatology*, vol. 59, no. 5, pp. 1874–1885, 2014.
- [137] S. Anand, “A brief primer on microRNAs and their roles in angiogenesis,” *Vascular Cell*, vol. 5, no. 1, article 2, 2013.
- [138] C. Esau, X. Kang, E. Peralta et al., “MicroRNA-143 regulates adipocyte differentiation,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 50, pp. 52361–52365, 2004.
- [139] J. Krützfeldt, N. Rajewsky, R. Braich et al., “Silencing of microRNAs in vivo with ‘antagomirs,’” *Nature*, vol. 438, no. 7068, pp. 685–689, 2005.
- [140] J. Krützfeldt, S. Kuwajima, R. Braich et al., “Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs,” *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 9, pp. 2885–2892, 2007.
- [141] J. Elmén, M. Lindow, A. Silahtaroglu et al., “Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver,” *Nucleic Acids Research*, vol. 36, no. 4, pp. 1153–1162, 2008.
- [142] M. S. Ebert and P. A. Sharp, “MicroRNA sponges: progress and possibilities,” *RNA*, vol. 16, no. 11, pp. 2043–2050, 2010.
- [143] C. Esau, S. Davis, S. F. Murray et al., “miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting,” *Cell Metabolism*, vol. 3, no. 2, pp. 87–98, 2006.
- [144] A. G. Bader, D. Brown, J. Stoudemire, and P. Lammers, “Developing therapeutic microRNAs for cancer,” *Gene Therapy*, vol. 18, no. 12, pp. 1121–1126, 2011.
- [145] J. Ji, J. Shi, A. Budhu et al., “MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer,” *The New England Journal of Medicine*, vol. 361, no. 15, pp. 1437–1447, 2009.
- [146] A. G. Bader, “MiR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic,” *Frontiers in Genetics*, vol. 3, article 120, 2012.