



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas**

**\*IDENTIFICACIÓN DE UNA FIRMA DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS  
ASOCIADA A RECURRENCIA EN PACIENTES CON CÁNCER DE CAVIDAD  
ORAL\***

**T E S I S**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestra en Ciencias**

PRESENTA:  
**BIOL. ASHLIN NINIBETH LARA HOLGUÍN**

**TUTOR PRINCIPAL**

**Dra. Marcela Lizano Soberón**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR**

**Dra Leticia Rocha Zavaleta**  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

**Dr. Felipe Vaca Paniagua**  
Facultad de Estudios Superiores Iztacala

Ciudad de México, Abril, 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

***Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Epidemiología y Biología Molecular de Virus Oncogénicos, perteneciente a la Unidad de Investigación Biomédica en Cáncer, del Instituto Nacional de Cancerología, bajo la supervisión de la Dra. Marcela Lizano Soberón, con el apoyo económico del proyecto FOSISS 261499: Caracterización de mecanismos de resistencia a tratamiento en cáncer de cabeza y cuello y desarrollo de un panel de biomarcadores, S0008-2015-1.***

## AGRADECIMIENTOS

### **A mi tutora, Marcela Lizano:**

Por abrirme las puertas de su laboratorio, por su gran apoyo, por confiar en mí y por todas sus enseñanzas tanto a nivel profesional, como personal. Por ser una inspiración, por toda su paciencia, entrega, dedicación y pasión por la ciencia, pero sobre todo por su infinita calidad humana, lo que me ha permitido desarrollarme como científica y como un mejor ser humano. Me siento orgullosa de estar bajo su tutela y poder seguir trabajando juntas, pues hemos y seguiremos siendo un gran equipo.

### **A mi colega y amigo Antonio Martínez:**

Por apoyarme cuando muchos otros se negaron y compartirme los conocimientos sin los cuales este trabajo no habría sido logrado.

### **Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT):**

Por el otorgamiento de la beca de manutención No. De CVU 740750, sin la cual no hubiera podido efectuar mi sueño de complementar mi formación profesional con el desarrollo de un posgrado de alta calidad.

### **A la Universidad Nacional Autónoma de México y al Instituto Nacional de Cancerología:**

Por darme la oportunidad de continuar mi formación científica en sus aulas y laboratorios y por todos los materiales provistos para la realización de mi proyecto de maestría.

### **Al Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP):**

Por el apoyo que me otorgaron para asistir a un Congreso Internacional en España.

### **Al Colegio Mexicano para la Investigación del Cáncer:**

Por el apoyo que me otorgaron para asistir a un Congreso Nacional en Puebla.

### **A los miembros de mi comité tutor y mis sinodales:**

Por su asesoría, comentarios y sugerencias, que enriquecieron de forma valiosa este proyecto y permitieron mejorar la presente tesis.

### **A mis compañeros de laboratorio:**

Por sus enseñanzas teóricas y prácticas, por sus comentarios y sugerencias que enriquecieron este proyecto y mi formación profesional, pero sobre todo por hacer mis días de trabajo en nuestro laboratorio amenos y agradables con alguna plática, risas, comidas, etc. No podría pedir mejores compañeros y amigos que ustedes: Jhonner, Josué, Joaquín, Leslie, Omar, Fredy, Alfred, Katy, Dra. Adriana y Elenae.

## DEDICATORIAS

### **A mis padres Martha y Oscar:**

Por apoyarme siempre en todo lo que hago e impulsarme a nunca rendirme hasta cumplir todos mis sueños y metas, sin ustedes este o ninguno de mis logros hubieran sido posibles. Los amo infinitamente.

### **A mi prometido Roberto:**

Por ser mi mejor amigo, mi confidente, mi novio, mi amante, y la persona más maravillosa que he conocido. Gracias por apoyar, escuchar, impulsar y por siempre estar interesado y orgulloso de lo que hago. Te amo.

### **A mis hermanos Aldo y Cristian:**

Porque a pesar de que nunca entienden nada de lo que hago, me apoyan incondicionalmente.

**Finalmente dedico de manera especial este trabajo y agradezco infinitamente a los médicos, enfermeras, los pacientes con cáncer y sus familias, porque su lucha también es mi lucha. Espero que algún día algo de lo que hago pueda mejorar los tratamientos y calidad de vida de las personas que sufren esta terrible enfermedad.**



## ÍNDICE

<b>1. RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>2. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>7</b>
2.1 <i>Generalidades del cáncer.....</i>	<i>7</i>
2.2 <i>Cáncer de Cabeza y Cuello.....</i>	<i>8</i>
2.3 <i>Características moleculares del cáncer cabeza y cuello.....</i>	<i>9</i>
2.4 <i>Cáncer de Cavidad Oral.....</i>	<i>12</i>
2.5 <i>Recurrencia en cáncer de Cavidad Oral.....</i>	<i>15</i>
2.6 <i>Los microRNAs como posibles biomarcadores en cáncer.....</i>	<i>17</i>
2.7 <i>Generalidades de microRNAs y cáncer.....</i>	<i>18</i>
2.8 <i>Perfiles de expresión de microRNAs en cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cavidad oral.....</i>	<i>21</i>
<b>3. ANTECEDENTES.....</b>	<b>23</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>25</b>
<b>5. HIPÓTESIS.....</b>	<b>25</b>
<b>6. OBJETIVOS.....</b>	<b>26</b>
6.1 <i>General.....</i>	<i>26</i>
6.2 <i>Específicos.....</i>	<i>26</i>
<b>7. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>27</b>
1. <i>Generación de la base de datos.....</i>	<i>27</i>
2. <i>Selección de muestras y establecimiento de los grupos de recurrencia y no recurrencia.....</i>	<i>28</i>
3. <i>Realización de ensayos de microarreglos.....</i>	<i>28</i>
4. <i>Obtención de datos.....</i>	<i>29</i>
5. <i>Análisis de expresión diferencial de microRNAs entre pacientes recurrentes vs no recurrentes.....</i>	<i>30</i>
6. <i>Análisis de correlación entre niveles de expresión de microRNAs y tiempo libre de recurrencia.....</i>	<i>31</i>
7. <i>Establecimiento de la firma de expresión de microRNAs y su asociación con recurrencia.....</i>	<i>31</i>



8. Obtención de los blancos validados de los microRNAs.....	32
9. Determinación de los niveles de expresión de los RNAm blanco en los pacientes de TCGA.....	32
<b>8. RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
8.1 Análisis epidemiológico (Pacientes INCan).....	33
8.2 Extracción y cuantificación de RNA.....	35
8.3 Análisis de la calidad de imágenes de los microarreglos.....	36
8.4 Análisis Bioinformáticos y Bioestadísticos.....	37
8.4.1 Análisis de datos de microarreglos (Pacientes INCan).....	37
8.4.2 Análisis de datos de RNAseq (Pacientes TCGA).....	40
8.4.3 Análisis de correlación de Spearman.....	43
8.4.4 Asociación de los microRNAs seleccionados con recurrencia.....	44
8.5 Obtención de los blancos validados de los microRNAs de la firma.....	46
8.6 Niveles de expresión de los RNAm blanco en los pacientes de TCGA.....	47
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>49</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>58</b>
<b>11. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>59</b>
<b>12. REFERENCIAS.....</b>	<b>60</b>



## **1. RESUMEN**

El cáncer de cavidad oral es una de las neoplasias más prevalentes y letales en el mundo. En este tipo de cáncer la recurrencia se desarrolla entre el 18 y 76% de los casos. Esta se asocia con la falla en los tratamientos, conduciendo a altas tasas de mortalidad. Por lo anterior, existe la necesidad de identificar biomarcadores que permitan reconocer a los pacientes con alto riesgo de desarrollar recurrencia.

Los microRNAs son RNA pequeños de cadena sencilla, que regulan la expresión genética a nivel post-transcripcional y son considerados buenos biomarcadores. A pesar de que existen gran cantidad de estudios de perfiles de expresión de microRNAs en cáncer, son pocos los enfocados en la búsqueda de asociaciones con recurrencia de la enfermedad. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue identificar una firma de expresión de microRNAs, en biopsias de pacientes con cáncer de cavidad oral, asociada a recurrencia.

Se analizaron dos cohortes, los pacientes del INCan fueron divididos en 16 casos de recurrencia (<12 meses) y 24 no recurrencia (>48 meses) y los pacientes de TCGA en 32 casos de recurrencia y 33 de no recurrencia. Las cohortes de estudio comparten 9 microRNAs diferencialmente expresados: miR-1, miR-139-5p, miR-30a-5p, miR-501-3p, miR-500a-3p, miR-551b-3p, miR-99a-3p, miR-381-5p aumentados, y miR-6842-3p disminuido en el grupo de recurrencia vs el grupo de no recurrencia. Los 8 microRNAs cuya expresión está aumentada en el grupo de recurrencia, correlacionan negativamente, y el microRNA con expresión disminuida, correlaciona positivamente con el tiempo libre de recurrencia. Los pacientes con un “riesgo alto” de acuerdo a la presencia de la firma de expresión de los 9 microRNAs, tienden a recurrir de forma temprana, respecto a los pacientes con “riesgo bajo”. La firma de expresión aumenta significativamente el riesgo de desarrollar recurrencia, independientemente de los factores clínico-patológico tradicionales. Los microRNAs aumentados de la firma, comparten 54 de los blancos validados, de los cuales 29 tienen un nivel de expresión menor en los pacientes recurrentes vs no recurrentes de TCGA. Mientras que el microRNA disminuido de la firma tiene 85 blancos validados, de los cuales 53 tienen un nivel de expresión mayor en los pacientes recurrentes vs no recurrentes de TCGA.

## 2. INTRODUCCIÓN

### 2.1 Generalidades del cáncer

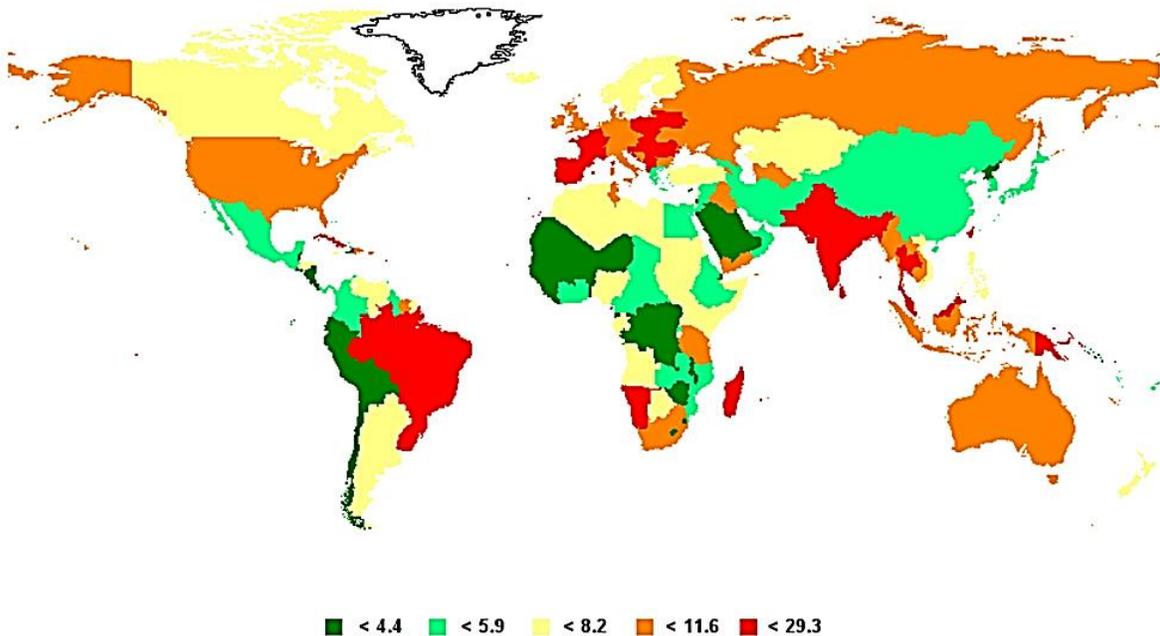
El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. Corresponde a un conjunto de enfermedades relacionadas entre sí, que surgen como resultado de la acumulación de daños genéticos y/o epigenéticos en el genoma, debidos a mutaciones heredadas, o bien, inducidos por carcinógenos ambientales tales como la luz UV, los rayos X, productos químicos, tabaco, o agentes biológicos como los virus. Esto promueve la expresión de oncogenes y/o a la inhibición de genes supresores de tumores, que regulan múltiples vías de señalización celular involucradas en la proliferación, la muerte celular programada, la diferenciación, entre otros procesos, permitiendo el establecimiento del fenotipo crucial característico de las células tumorales (Fig. 1) (WHO, 2016; NCI, 2016; Hanahan y Weinberg, 2011).



**Figura 1. Las características del cáncer.** Las células cancerosas se caracterizan por presentar un fenotipo que incluye diversos procesos desregulados como resistencia a la muerte celular, inestabilidad genómica, angiogénesis, proliferación sostenida, autosuficiencia en las señales de crecimiento e invasión y metástasis (Modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

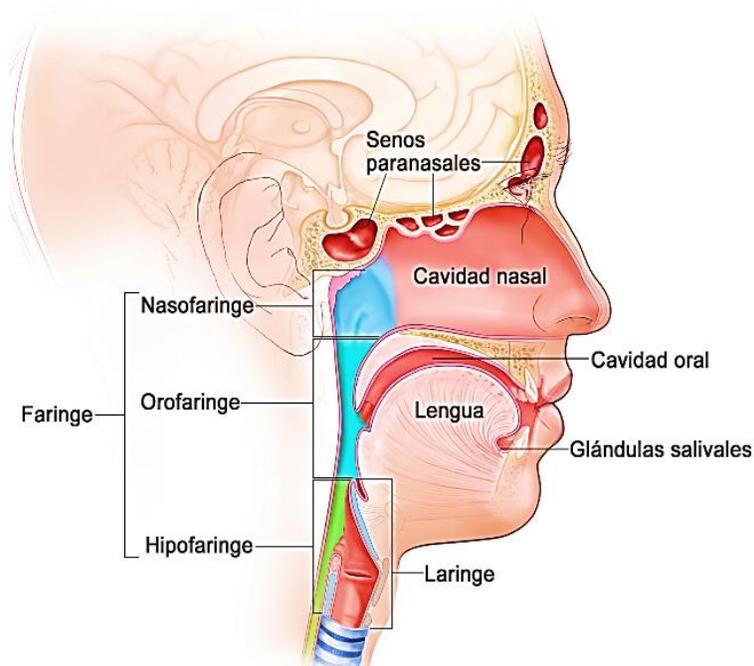
## **2.2 Cáncer de Cabeza y Cuello**

De la gran variedad de tipos de cáncer que afectan a la población, el cáncer de cabeza y cuello es uno de los más prevalentes y letales alrededor del mundo. Representa el sexto cáncer más común, con aproximadamente 600,000 casos alrededor del mundo y una mortalidad estimada del 50%. La incidencia de este tipo de cáncer es moderada a alta en países desarrollados de América, Europa y Oceanía y ha ido en aumento en los últimos años en países en vías de desarrollo, como México (Fig. 2) (Globocan, IARC, 2012).



**Figura 2.** Tasa de incidencia de cáncer de cabeza y cuello, por cada 100,000 casos. Ambos sexos, todas las edades, estandarizado (Globocan, IARC, 2012).

Los cánceres que se conocen en conjunto como cánceres de cabeza y cuello, generalmente comienzan en las células escamosas que revisten las superficies húmedas y mucosas del interior de la cabeza y del cuello, incluyendo la cavidad oral, laringe, faringe, glándulas salivales, cavidad nasal y senos paranasales (Fig. 3). También pueden desarrollarse en las glándulas salivales, pero este tipo de cáncer es relativamente poco común (NCI, 2016).



**Figura 3.** Regiones donde se desarrolla el cáncer de cabeza y cuello. Cavidad oral, glándulas salivales, laringe, faringe, cavidad nasal y senos paranasales (NCI, 2016).

### **2.3 Características moleculares del cáncer cabeza y cuello**

El hecho de que más del 95 % de los cánceres de cabeza y cuello sean carcinomas de células escamosas, sugiere que es relativamente una enfermedad homogénea, comparada con otros tipos de cáncer; sin embargo, diversos estudios han revelado que es inesperadamente heterogéneo (Leemans, *et al.*, 2011; Keck, *et al.*, 2014; TCGA, 2015). En general, se han distinguido dos subclases de tumores: los positivos al Virus del Papiloma Humano (VPH) y los negativos (Tabla 1) (Leemans, *et al.*, 2011; TCGA, 2015; Philip, *et al.*, 2017).

**Tabla 1.** Características clínicas y biológicas de los cánceres de cabeza y cuello positivos y negativos a VPH (Modificado de Leemans, *et al.*, 2011 y Philip, *et al.*, 2017)

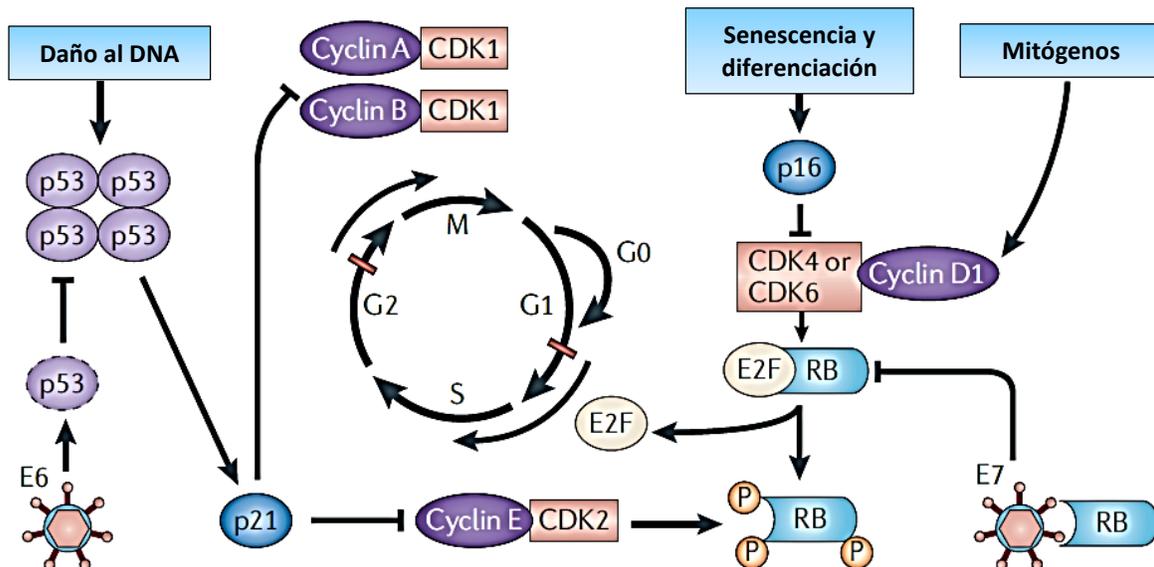
<b>Parámetro</b>	<b>VPH-Negativos</b>	<b>VPH-Positivos</b>
Incidencia	Disminuyendo	Aumentando
Proporción (%)	80	20
Etiología	Tabaquismo y etilismo	Sexo oral
Edad	>60 años	<60 años
Campos de cancerización	Si	No
Mutación en p53	Si	No
Subsitio anatómico	Cualquiera	Orofaringe
Pronóstico	Pobre	Favorable
Mediadores moleculares	Alta IC (cambios numéricos) Baja IC (sin cambios numéricos)	Positivos a E6 y E7

**IC: Inestabilidad cromosómica; VPH: Virus de papiloma humano**

### 2.3.1 Tumores VPH Positivos

El VPH es un virus de DNA de doble cadena que infecta las células basales de epitelios y es el principal agente etiológico para el desarrollo de cáncer cervico-uterino. Existen más de 150 tipos de VPH que pueden ser clasificados como de alto y bajo riesgo, según su potencial carcinogénico. El genoma viral codifica para algunas oncoproteínas, entre las que destacan E6 y E7, cuya expresión, entre otros mecanismos, inactiva a p53 y la proteína pRB respectivamente, afectando la regulación del ciclo celular en las células infectadas (Fig. 4) (Doorbar, *et al.*, 2015).

En los últimos años se ha demostrado que la infección por ciertos tipos de VPH, principalmente el VPH-16, está etiológicamente relacionada al desarrollo de cáncer de cabeza y cuello, particularmente en orofaringe (Gillison, *et al.*, 2008; Chaturvedi, *et al.*, 2011; Castellsagué, *et al.*, 2016). De forma específica en este tipo de cáncer, se ha visto que la carcinogénesis mediada por VPH, involucra (además de la inactivación de p53 y RB) la pérdida de TRAF3, mutaciones que activan a PI3KCA, y NF-κB, así como la amplificación de E2F1 (Fig. 5) (TCGA, 2015).



**Figura 4. Desregulación del ciclo celular por las oncoproteínas E6 y E7 del VPH.** La progresión del ciclo celular depende de pasar el punto de restricción en la fase G1, que es controlado por las proteínas de retinoblastoma, RB, RBL1 y RBL2 (sólo se muestra RB). Estas proteínas se unen e inactivan a los factores de transcripción E2F, que inducen la expresión de los genes de la fase de síntesis (S). En respuesta a una señal mitogénica, se activan los complejos ciclina D1-CDK4 y ciclina D1-CDK6, los cuales



fosforilan a las proteínas RB, causando la liberación (y por tanto activación) de los factores E2F. Estos factores inducen a ciclina E que forma un complejo con CDK2, que fosforila a RB, lo que inicia la entrada a la fase S. El inhibidor de los complejos ciclina D1-CDK4 y 6 es p16, que es codificado por el gen CDKN2A. La expresión de esta última proteína regula la senescencia y la diferenciación. La interacción entre ciclinas, CDKs y sus inhibidores determina si el punto de restricción puede ser superado, lo cual es estimulado usualmente por factores de crecimiento. Otro punto de control importante en el ciclo celular ocurre durante la fase G2, cuando el DNA ha sido replicado y los errores en la replicación son reparados. La proteína crucial involucrada en la respuesta a errores en la replicación es p53, la cual es mantenida a concentraciones bajas por una degradación mediada por MDM2 (no mostrada). Los sensores de daño a DNA, incluyendo ataxia-telangiectasia (ATM) y ataxia-telangiectasia relacionada a Rad3 (ATR), fosforilan las cinasas de checkpoint CHK1 y CHK2, conduciendo a un incremento en la actividad de p53. El tetrámero de p53 actúa como un factor de transcripción inducido por estrés que promueve la expresión de p21 también conocido como CDKN1A), el cual inhibe múltiples complejos ciclina-CDKs y arresta el ciclo celular. Además de su rol en el control del ciclo celular, p53 también es un regulador maestro de la apoptosis y otras funciones celulares asociadas al estrés, y es por lo tanto, uno de los principales blancos para inactivación en muchos tipos de cáncer. El genoma del VPH codifica para oncoproteínas, entre las que se encuentran E6 y E7. La proteína E6 se une a p53 y promueve su degradación, mientras que la proteína E7 se une e inactiva a las proteínas RB. Las consecuencias moleculares derivadas de la expresión de estas oncoproteínas virales son la inhibición de la apoptosis mediada por p53, así como la abrogación de los puntos de control del ciclo celular (Modificado de Leemans, *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Tumores VPH Negativos

Los tumores de cabeza y cuello no asociados a VPH se relacionan con el consumo de tabaco y alcohol. Una plétora de estudios han sido publicados con respecto a la identificación de genes candidatos en el desarrollo de cáncer de cabeza y cuello. Una lista de los cambios genéticos encontrados frecuentemente en este tipo de cáncer está resumida en la tabla 2 y la figura 5.

Comúnmente presentan mutaciones de pérdida de función o inactivación de genes supresores de tumores como p53, CDKN2A, PTEN y SMAD4, así como sobre expresión y activación de oncogenes, tales como el receptor con actividad de tirosina cinasa EGFR, RAS y PIK3CA. Un subgrupo de tumores de cavidad oral con pronóstico clínico favorable, exhiben poca alteración en el número de copias y mutaciones que activan a HRAS o PIK3CA, acoplado a mutaciones que inactivan a CASP8, NOTCH1 y p53. Otro subgrupo, principalmente de tumores de laringe, posee alteraciones de pérdida de función del modificador de la cromatina NSD1, los genes de la vía de WNT, AJUBA y FAT1, y activación del factor de estrés oxidativo NFE2L2 (Fig. 5 y Tabla 2) (Leemans, *et al.*, 2011; Keck, *et al.*, 2014; TCGA, 2015; Philip, *et al.*, 2017).



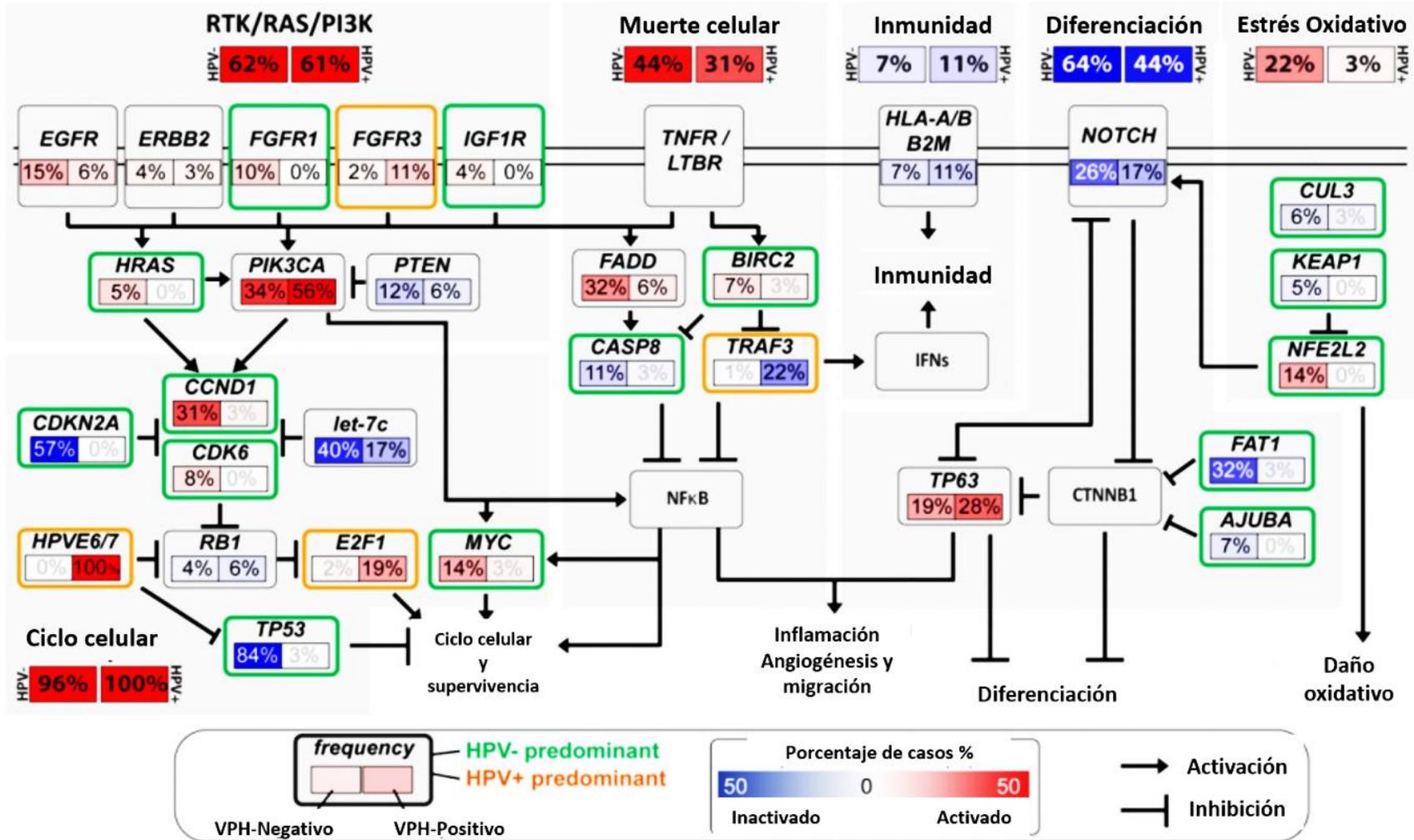
Tabla 2. Genes frecuentemente alterados en cáncer de cabeza y cuello (Modificado de Leemans, *et al.*, 2011 y Philip, *et al.*, 2017).

Gen	Estatus
<b>Supresores de tumores</b>	
p53	Establecido
CDKN2A	Establecido
PTEN	Establecido
SMAD 4	Establecido
FHIT	Candidato
CSMD1	Candidato
PTPRD	Candidato
RASSF1A	Candidato
<b>Oncogenes</b>	
PIK3CA	Establecido
EGFR	Establecido
MET	Establecido
CCND1	Establecido
MYC	Candidato
PARP1	Candidato
CCNL1	Candidato
p63	Candidato
DCUN1D1	Candidato
PTK2	Candidato
CTTN	Candidato
FADD	Candidato

**CDKN2A:** cyclin-dependent kinase inhibitor 2A; **PTEN:** Phosphatase and tensin homolog; **FHIT:** Bis(5'-adenosil)-trifosfatasa; **CSMD1:** CUB And Sushi Multiple Domains 1; **PTPRD:** Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type D; **RASSF1A:** Ras association domain-containing protein 1; **PIK3CA:** phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha; **EGFR:** Epidermal Growth Factor Receptor; **MET:** Mesenchymal Epithelial Transition; **CCND1:** Cyclin D1; **DCUN1D1:** DCN1-like protein 1; **PTK2:** protein tyrosine kinase 2; **CTTN:** Cortactin; **FADD:** Fas-associated protein with death domain.

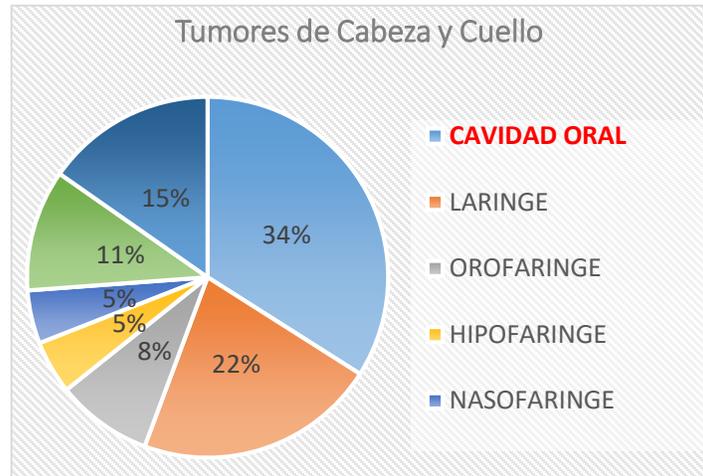
## 2.4 Cáncer de Cavidad Oral

Dentro de los cánceres de cabeza y cuello, los subsitios más prevalentes corresponden a los de cavidad oral, es decir, lengua, labios, revestimiento interior de las mejillas, paladar duro, trígono retromolar y piso de boca, que representan el 85% de todos los casos de cáncer de cabeza y cuello (Globocan, IARC, 2012; NCI, 2017).



**Figura 5. Desregulación de vías de señalización y factores de transcripción en cáncer de cabeza y cuello.** La frecuencia (%) de alteraciones genéticas para tumores negativos y positivos a VPH se muestran en cuadros rosa claro y rosa oscuro respectivamente. Los genes relacionados a VPH se muestran en naranja y los no relacionados en verde. Se muestra la activación (flechas) o inhibición de las vías (flechas truncas). La activación e inactivación de genes se muestra con rojo y azul respectivamente (Modificado de TCGA, 2015).

De los pacientes atendidos en el Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología, el cáncer de cavidad oral ocupa el primer lugar en porcentaje de casos de pacientes con cánceres de cabeza y cuello (Fig. 6).



**Figura 6.** Porcentaje de pacientes atendidos de acuerdo a los diferentes subsitios anatómicos en el servicio de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología, México (Archivo clínico, INCan, 2015).

Este tipo de cáncer raramente se asocia a infección por VPH (Castellsagué, *et al.*, 2016), sin embargo, existen otros factores de riesgo para su desarrollo, como son el consumo de tabaco y alcohol, así como de nuez areca, una higiene bucal deficiente y ser mayor de 40 años. Además existen otros factores de riesgo inherentes a la mayoría de los tipos de cáncer, como son, la predisposición genética (polimorfismos en genes reparadores de DNA y genes involucrados en vías que contribuyen a la carcinogénesis) y poseer un sistema inmune debilitado. Finalmente, la incidencia de este tipo de cáncer es 2 a 3 veces mayor en el caso de hombres que mujeres (NCI, 2015; ACS, 2016; ASCO, 2016; WHO, 2016; OCF, 2016; Garg, *et al.*, 2014).

Los signos y síntomas en pacientes con cáncer de cavidad oral, pueden ser una úlcera en la boca que no cicatriza o una hemorragia inusual, dolor en la boca que no cede, un bulto o engrosamiento en la mejilla, un parche blanco o rojo (leuco o eritroplasia) en las mejillas, la lengua, las amígdalas o el revestimiento de la boca, una movilidad súbita del diente sin causa aparente, un dolor de oído crónico, dificultades para comer o tragar, entumecimiento de la lengua y/o mal aliento. La mayoría de los signos tempranos son



indoloros y son difíciles de detectar sin un examen minucioso de la cavidad oral por un profesional dental o médico (ASCO, 2017; WHO, 2017, Villa, *et al.*, 2011)

El cáncer de cavidad oral a menudo comienza con lesiones premalignas tales como la leucoplasia y la eritroplasia, que corresponden un parche blanco o rojo que aparecen en la mucosa de la cavidad oral (Rodhus, *et al.*, 2014).

Las opciones de tratamiento incluyen cirugía, radioterapia, terapia dirigida, como el cetuximab (anticuerpo específico para el receptor del factor de crecimiento epidermal, EGFR) y quimioterapia, que puede incluir TPF (combinación de docetaxel, cisplatino y fluorouracilo); usados de forma individual o combinada, dependiendo de la localización y tamaño de la lesión. Los estadios tempranos (I y II) tienen mejor pronóstico y generalmente son tratados con cirugía y radioterapia. Si los nódulos regionales son positivos, se hace también una disección de nódulos cervicales. En estadios avanzados (III o más) se usa además quimioterapia y cetuximab (ASCO, 2017; NCI, 2017; Villa, *et al.*, 2011).

A pesar de los avances recientes en detección temprana, las técnicas de cirugía, los regímenes de radiación y quimioterapia, la tasa de supervivencia y calidad de vida para los pacientes con este tipo de cáncer, no ha mejorado significativamente en las últimas décadas (NCI, 2015).

### **2.5 Recurrencia en cáncer de Cavidad Oral**

La recurrencia se define como el regreso del cáncer posterior a un tratamiento curativo, después de un periodo durante el cual el cáncer no puede ser detectado (el tiempo preciso no está claramente definido). El cáncer puede volver al mismo sitio donde se desarrolló primero (recurrencia local), o aparecer en los nódulos linfáticos adyacentes (recurrencia regional), o presentarse en un órgano lejano (recurrencia distal) (ACS, 2013).

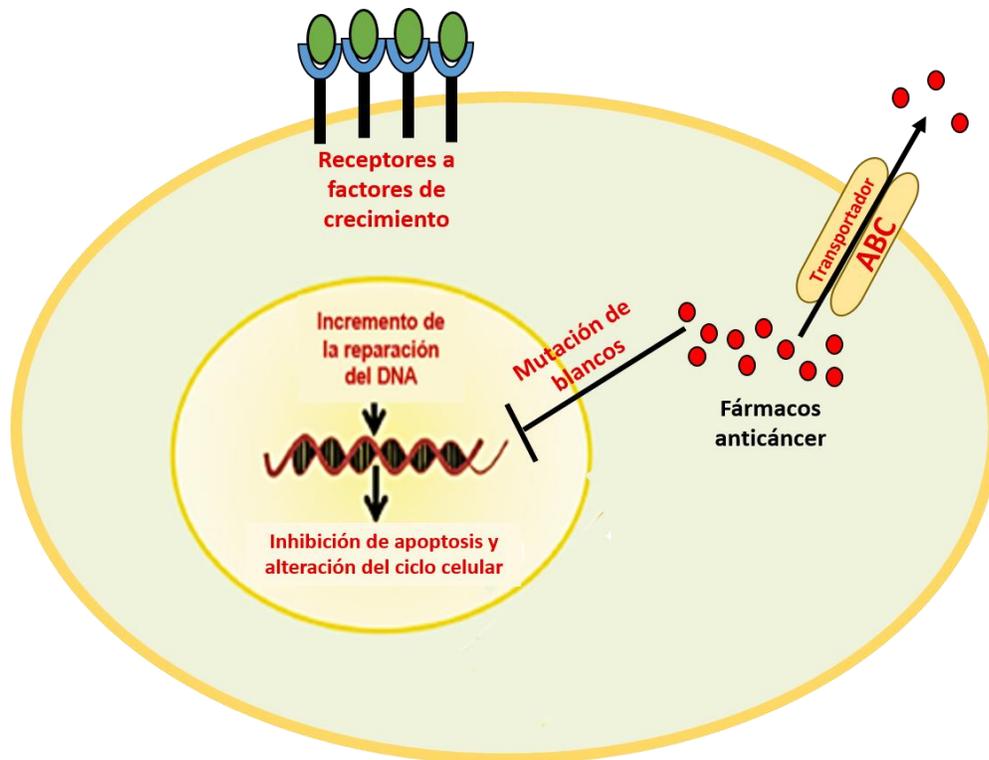
En este tipo de cáncer, las tasas de recurrencia varían entre el 18 y 76% de los pacientes y es considerada la mayor causa de las bajas tasas de supervivencia (alrededor



del 50%), y en el 90% de los casos está asociada a falla en los tratamientos de cirugía, radioterapia y/o quimioterapia. El tiempo medio de recurrencia se estima en 7.5 meses, y se estima que el 86% de las recurrencias ocurren en los primeros 24 meses (Leemans *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2004; Jemal, *et al.*, 2011).

La clasificación de tumores TNM, el grado histológico, así como la presencia de neoplasia o displasia en los bordes quirúrgicos después de la cirugía, son los factores pronósticos tradicionales asociados a recurrencia (González-García, *et al.*, 2009), sin embargo, el valor de estos factores clínico-patológicos es controversial, ya que aun dando seguimiento a estos pacientes, sigue habiendo recurrencia, además de que existen pacientes que a pesar de no presentar estos factores pronósticos recurren (Leemans, *et al.*, 1994; Leemans *et al.*, 2011).

Debido al carácter heterogéneo de los tumores, es difícil distinguir aquellos con buen pronóstico, de aquellos más agresivos (mal pronóstico), lo cuales recurren de forma temprana, mostrando resistencia a los tratamientos de quimio y radioterapia (Wang, *et al.*, 2010). Esto último puede ser consecuencia de la selección de *cancer stem cells* que sobre expresan transportadores de resistencia a múltiples drogas, receptores a factores de crecimiento y propiedades de transición epitelio mesénquima o de pluripotencialidad, además de exhibir alteración del ciclo celular, inhibición de la apoptosis, y la sobre activación de mecanismos de reparación del DNA (esto último muy importante en radioresistencia) (Fig. 7) (Suh *et al.*, 2014; Dey Ghosh, *et al.*, 2016; Garofalo y Croce, 2013).



**Figura 7. Mecanismos de resistencia a quimio y/o radioterapia.** En el caso de resistencia a quimioterapia, la expulsión de drogas a través de transportadores ABC, es una de las formas más explotadas por las células tumorales; las cuales además incrementan la expresión de receptores a factores de crecimiento, evaden la apoptosis, desregulan su ciclo celular, y pueden presentar alteración de los blancos de los agentes antineoplásicos. Por su parte, el incremento en la reparación del DNA es también muy frecuente, principalmente en la resistencia a radiación ionizante (Modificado de Garofalo y Croce, 2013).

## **2.6 Los microRNAs como posibles biomarcadores en cáncer**

Existe una gran necesidad de identificar biomarcadores que permitan incidir en el pronóstico de cáncer de cavidad oral, siendo de gran relevancia clínica aquellos que permitan reconocer a los pacientes con alto riesgo de desarrollar recurrencia (NCI, 2015; ASCO, 2016; WHO, 2016).

Recientemente se ha incrementado el interés por usar a los microRNAs como biomarcadores en cáncer, dada su gran estabilidad, al ser moléculas pequeñas de RNA y en su forma madura estar protegidos por complejos de proteínas (Bartel, 2009), además de la disponibilidad de métodos de detección altamente sensibles (Tian, *et al.*, 2015), y el hecho de que los microRNAs pueden ser extraídos de varios tipos de



muestras clínicamente relevantes, como son biopsias de pacientes embebidas en parafina, sangre y fluidos de pacientes (Wang, *et al.*, 2016; Hayes, *et al.*, 2014). No obstante, hasta la fecha, ningún microRNA ha llegado a usarse de forma rutinaria en la práctica clínica como biomarcador (Flatmark, *et al.*, 2016; Wang, *et al.*, 2016)

De la misma manera que ocurre con la expresión de los RNAm, el perfil de expresión de los microRNAs varía entre tejidos, estadios del desarrollo y patologías, lo que permite una detección altamente específica (Landgraf, *et al.*, 2007; Pérez-Rivas, *et al.*, 2014; Mordente, *et al.*, 2015). Asimismo, pueden funcionar como reguladores clave de procesos biológicos asociados a cáncer, como son proliferación, motilidad e invasión celular, contribuyendo a la carcinogénesis, la progresión y la metástasis (Pichler y Calin 2015).

Numerosos microRNAs se han encontrado desregulados en diversos tipos de cáncer, permitiendo distinguir entre tejido normal y tejido tumoral, así como entre tumores de distinto origen (Guo, *et al.*, 2014; Neerincx, *et al.*, 2015; Pichler y Calin 2015). Algunos microRNAs modulan la expresión de oncogenes, y otros regulan a genes supresores de tumores, mientras que otros funcionan directamente como oncogenes (oncomirs) y microRNAs supresores de tumores (Supresor-mirs) (Esquela-Kerscher y Slack, 2006).

## **2.7 Generalidades de microRNAs**

Los microRNAs son moléculas pequeñas de RNA (17 a 25 nucleótidos de longitud), endógenas, no codificantes, de cadena sencilla que juegan un papel importante en la regulación génica en animales, plantas, algas y virus (Bartel, 2004; Griffiths-Jones, *et al.*, 2008). En su forma madura se asocian con las proteínas argonautas formando el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés). Este complejo de ribonucleoproteínas regula la expresión génica a nivel post transcripcional, guiado por la unión de la región semilla del microRNA (nucleótidos 2 al 7 de su secuencia) a las regiones 3' o 5' no traducibles de sus RNA mensajeros (RNAm) blanco, conduciendo a la degradación del RNAm, su desestabilización o



inhibición de su traducción (Hutvagner, *et al.*, 2002; Liu, *et al.*, 2004; Meister, *et al.*, 2004; Pillai, *et al.*, 2004).

Lin-4 fue el primer microRNA que se descubrió. En el nematodo *Caenorhabditis elegans*, algunos genes heterocrónicos controlan el patrón de desarrollo temporal de los estadios larvarios; uno de estos genes es lin-4 (Lee, *et al.*, 1993).

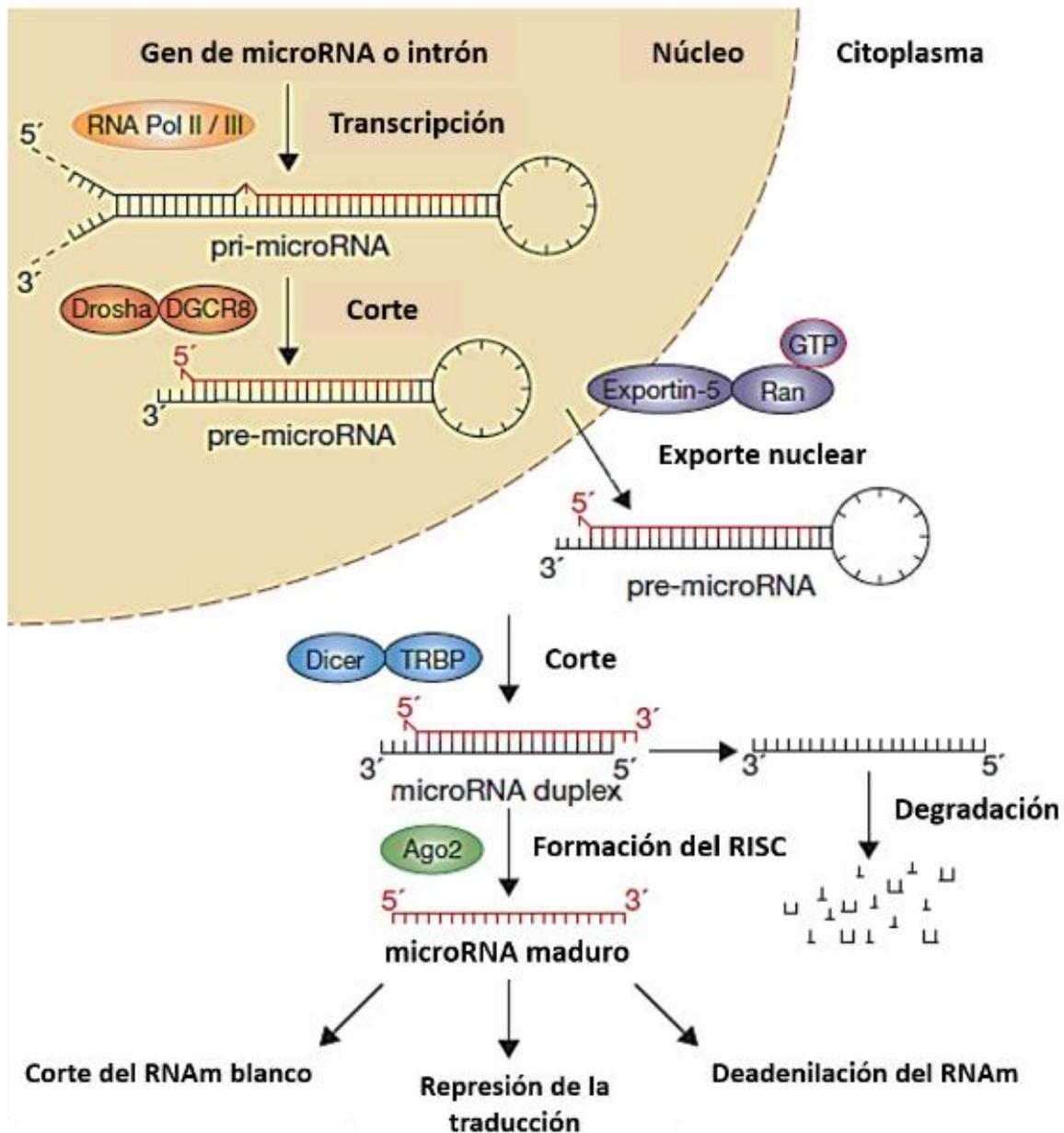
Se estima que los microRNAs están involucrados en la regulación de alrededor del 60% de los genes codificantes para proteínas en humano (Friedman, *et al.*, 2009), modulando una gran cantidad de procesos celulares, tales como el desarrollo, la morfogénesis, la proliferación, el crecimiento y la apoptosis (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Actualmente en el genoma humano se han identificado 1872 precursores y 2578 microRNAs maduros (miRBase 20), aunque los RNAm blancos regulados por la mayoría de estos son desconocidos.

La biosíntesis de los microRNAs (Fig. 8) es un proceso altamente regulado que consta de múltiples pasos. Esta comienza en el núcleo celular después de la transcripción y continúa a través del citoplasma, donde el microRNA maduro ejerce su función (Winter, *et al.*, 2009).

Los genes de los microRNAs son transcritos ya sea por la RNAPol II o RNAPol III, dando lugar a precursores largos llamados pri-microRNAs (Lee, *et al.*, 2004; Cai, *et al.*, 2004; Borchert, *et al.*, 2006). El pri-microRNA es subsecuentemente cortado en el núcleo por el complejo microprocesador, formado por la RNAsa III Drosha y la proteína DGCR8 (*DiGeorge critical region 8*; también conocida como Pasha en *C. elegans* y *D. melanogaster*) (Lee, *et al.*, 2003). Esta molécula, ahora llamada pre-microRNA, es reconocida por la proteína exportina-5, que permite su transporte al citoplasma a través de poros nucleares siguiendo un gradiente GTP-GDP (Yi, *et al.*, 2003).

Una vez que el pre-microRNA es liberado en el citoplasma es madurado a un microRNA de cadena sencilla de aproximadamente 22 nucleótidos y es cargado en el complejo RISC por el complejo RLC (*RISC loading complex*), compuesto por las proteínas

Dicer/TRBP/PACT/AGO2 (Fig. 8) (Gregory, *et al.*, 2005; Haase, *et al.*, 2005; Lee, *et al.*, 2006, MacRae, *et al.*, 2008).



**Figura 8. Biosíntesis de microRNAs.** El proceso de biosíntesis de microRNAs comienza en el núcleo donde el pri-microRNA es procesado a pre-microRNA, que es transportado a citoplasma por acción de exportina-5, donde finalmente es madurado por el complejo Dicer/TRBP y ejerce su función: promover el corte del RNAm, reprimir su traducción o su deadenilación. (Modificado de Winter, *et al.*, 2009).



## **2.8 Perfiles de expresión de microRNAs en cáncer de cabeza y cuello y cáncer de cavidad oral**

Se ha descrito que los perfiles de expresión de microRNAs pueden asociarse al diagnóstico y pronóstico de pacientes con cáncer (Cheerla y Gevaert, 2017), además de que permiten definir subtipos tumorales clínicamente relevantes, y predecir la respuesta al tratamiento e incluso la recurrencia de la enfermedad (Lu, *et al.*, 2005; Dvinge, *et al.*, 2013; Kim, *et al.*, 2011; Huo, *et al.*, 2016).

Se han realizado diversos estudios en los que se han determinado perfiles de expresión de microRNAs en muestras de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, así como líneas celulares. Dentro de estos, algunos han sido enfocados a determinar las diferencias en perfiles de expresión entre tejido sano y tumores identificando algunos microRNAs que pueden tener roles en la carcinogénesis, funcionando como oncogenes, como mir-21 o genes supresores de tumores, como let-7 (Chang, *et al.*, 2008; Ramdas, *et al.*, 2009; Avissar, *et al.*, 2009; Hui, *et al.*, 2009; Cao, *et al.*, 2013; Liu, *et al.*, 2016). Mientras que otros trabajos han permitido determinar diferencias y similitudes en la expresión de microRNAs al comparar tumores y líneas celulares derivadas de cáncer de cabeza y cuello (Chang, *et al.*, 2008).

Por otra parte, se han asociado firmas de expresión de microRNAs con factores conocidos asociados al desarrollo de cáncer de cabeza y cuello como son, mutaciones en TP53 (Ganci, *et al.*, 2013) o presencia de VPH (Mirghani, *et al.*, 2016).

Todos estos estudios se han hecho en biopsias de pacientes con cáncer de cabeza y cuello, considerando todos o algunos subsitios anatómicos, sin embargo, son relativamente pocos los estudios que se han realizado particularmente en cáncer de cavidad oral.

Entre los estudios realizados en cavidad oral, destacan aquellos que comparan perfiles de expresión de microRNAs entre tumores y tejido sano (Wong, *et al.*, 2008; Lajer, *et al.*, 2011), así como aquellos que constituyendo una firma, pueden estar asociados con



progresión, por ejemplo de leucoplasia a cáncer (Cervigne, *et al.*, 2009) o de carcinoma *in situ* a metástasis (Scapoli, *et al.*, 2010).

A pesar de que existen gran cantidad de estudios de perfiles de expresión de microRNAs en cáncer, son muy pocos los enfocados a hacer asociaciones de estos perfiles con recurrencia de la enfermedad. Algunos de los trabajos publicados se han realizado en otros tipos de cáncer, como de hígado (Zhong-Bo, *et al.*, 2012), pulmón (Santosh, *et al.*, 2010; Lu, *et al.*, 2012) y mama (Pérez-Rivas, *et al.*, 2014), no obstante los realizados en cáncer de cabeza y cuello, y particularmente en cavidad oral, son escasos.



### **3. ANTECEDENTES**

A pesar de que son pocos los estudios realizados en cáncer de cabeza y cuello, y particularmente en cavidad oral, que asocian perfiles de expresión de microRNAs con recurrencia de la enfermedad, podemos citar algunos.

Respecto a cáncer de cabeza y cuello, Childs y colaboradores (2009), evaluaron perfiles de expresión de microRNAs en biopsias de pacientes, comparando tumores y tejido sano adyacente. La mayoría de los microRNAs encontrados en tumores, mostraron baja expresión en el tejido normal. Además, sus análisis permitieron determinar que bajos niveles de miR-205 y let-7d están asociados a recurrencia local temprana y menor sobrevida (Childs, *et al.*, 2009).

Por su parte, Ganci y colaboradores (2013), determinaron perfiles de expresión de microRNAs en biopsias de pacientes comparando tumores y tejido sano, y a su vez, dentro de los tumores, compararon los que tenían a TP53 mutado y los que no. De este estudio se derivaron 2 firmas moleculares asociadas a mutaciones en TP53, constituidas por 4 microRNAs sub expresados (miR-17-3p, miR-21-3p, miR-21-5p y miR-139-3p), y 12 microRNAs sobre expresados (miR-17-3p, miR-18b-5p, miR-324-5p, miR-19a-3p, miR-200a-3p, miR-331-3p, miR-21-3p, miR-21-5p, miR-205-5p, miR-151a-3p, miR-96-5p y miR-429), que están relacionadas con recurrencia en periodos de tiempo cortos y menor sobrevida, respectivamente (Ganci, *et al.*, 2013).

Posteriormente Citron y colaboradores (2017) realizaron un estudio más amplio, y diferente a los anteriores en el sentido de que no compararon tejido sano contra tumor, sino que compararon los perfiles de 746 microRNAs de tumores de pacientes de recurrieron (n=11) y que no recurrieron (n=33) en los dos años posteriores a la cirugía. Encontraron 4 microRNAs diferencialmente expresados entre los grupos, miR-9 sobre expresado, mientras que miR-1, miR-133a y miR-150 sub expresados en los tumores de los pacientes recurrentes. De estos microRNAs, hicieron análisis funcionales demostrando que miR-9 promueve la transición epitelio-mesénquima (TEM) inhibiendo a E-cadherina y KRT13, además de que inhibe al gen supresor SASH1,



mientras que miR-1, miR-133 y miR-150 inhiben las vías de SP1 y TGF $\beta$ . Finalmente vieron que la inhibición farmacológica de estas vías indujo muerte de células de cáncer de cabeza y cuello y previno la recurrencia en un modelo murino de cáncer de cabeza y cuello (Citron, *et al.*, 2017).

Por otra parte, particularmente en cáncer de cavidad oral, el grupo de Ganci (2015) analizaron los perfiles de microRNAs de muestras de pacientes con cáncer de cavidad oral y sus contrapartes de tejido sano, encontrando que la expresión de 4 microRNAs (miR-21-3p, miR-96-5p, miR-130b-3p, y miR-141-3p) de forma individual y agrupados constituyendo una firma molecular, predicen exitosamente el desarrollo de recurrencia temprana, y su potencial predictivo fue superior a los factores clínico-patológicos tradicionales asociados a recurrencia (Ganci, *et al.*, 2015).

A su vez, Dey Ghosh y colaboradores (2016) realizaron un estudio en el que compararon líneas celulares de cáncer de cavidad oral quimio resistentes y sensibles, así como tumores primarios y recurrentes de pacientes con este tipo de cáncer. Encontraron una alta expresión en las líneas quimio resistentes y en los tumores recurrentes de miR-130b, miR-134, miR-149, miR-491, miR-181d, miR-146b.

Un año después, Yan y colaboradores (2017), investigaron si microRNAs circulantes pueden predecir la recurrencia post operatoria de pacientes con cáncer de cavidad oral. Analizaron por secuenciación de nueva generación muestras de plasma de 8 pacientes, colectadas antes y después de un año de la cirugía, así como muestras de 3 controles sanos. Ninguno de estos pacientes tuvo recurrencia, pero se validaron 6 microRNAs por qRT-PCR en una cohorte distinta de 20 pacientes. 8 de los 20 pacientes presentaron recurrencia al momento de que las muestras fueron colectadas (1 año después de la cirugía). Los resultados mostraron que la sub expresión de miR-486-5p, miR-375 y miR-92b-3p está altamente asociada con la recurrencia de la enfermedad. (Yan, *et al.*, 2017).



Finalmente, en el mismo año, Ries y colaboradores (2017) investigaron si microRNAs presentes en sangre total de pacientes con este tipo de cáncer funcionarían como biomarcadores de recurrencia. Los pacientes fueron divididos en recurrentes (n=21) y no recurrentes (n=21) y se determinaron sus perfiles de expresión de microRNAs. Los niveles de miR-3651 y miR-494 estuvieron incrementados significativamente y el nivel de miR-186 disminuído en sangre total de los pacientes recurrentes. Además hicieron asociaciones estadísticas, encontrando que efectivamente la desregulación de estos microRNAs está asociada a recurrencia en estos pacientes (Ries, *et al.*, 2017).

#### **4. JUSTIFICACIÓN**

La recurrencia es un evento común y la principal causa de las bajas tasas de supervivencia en pacientes con cáncer de cavidad oral; así mismo, los factores clínico-patológicos tradicionales (TNM, grado histológico y bordes libres), son imprecisos, por lo cual, la identificación de firmas de expresión de microRNAs, representa una oportunidad para determinar posibles biomarcadores, que permitan predecir adecuadamente la recurrencia en estos pacientes y ayudar a definir la estrategia terapéutica más apropiada después de la cirugía.

#### **5. HIPÓTESIS**

En los tumores de pacientes con cáncer de cavidad oral existen ciertos microRNAs que pronostican de forma precisa la recurrencia de la enfermedad, y están implicados en la regulación de genes supresores de tumores, vías de resistencia al tratamiento y/o de *cancer stem cells*.



## **6. OBJETIVOS**

### **6.1 General**

Identificar una firma de expresión de microRNAs asociada a recurrencia, en biopsias de pacientes con cáncer de cavidad oral.

### **6.2 Específicos**

1. Generar una base de datos de pacientes atendidos en el Instituto Nacional de Cancerología (INCan) de 2007 a 2013, con diagnóstico de cáncer en cavidad oral.
2. Descargar datos genómicos y clínicos de otros pacientes (cohorte de validación).
3. Determinar si existe asociación entre los factores clínico-patológico tradicionales y recurrencia en los pacientes del INCan.
4. Identificar a los pacientes que recurrieron y los que no recurrieron para determinar los microRNAs diferencialmente expresados entre ambos grupos (en las cohortes de descubrimiento y validación).
5. Correlacionar los niveles de expresión de los microRNAs con el tiempo libre de recurrencia en las cohortes de descubrimiento y validación.
6. Establecer la firma de microRNAs y determinar si está asociada a recurrencia en ambas cohortes.
7. Identificar los RNAm blancos validados de los microRNAs de la firma.
8. Seleccionar aquellos blancos que son regulados por 2 o más microRNAs, y establecer su nivel de expresión en la cohorte de validación.



## **7. MATERIALES Y MÉTODOS**

Este fue un estudio retrospectivo, previamente aprobado por los comités de ética y de investigación del Instituto Nacional de Cancerología, que está anidado dentro de la propuesta FOSISS 261499: *Caracterización de mecanismos de resistencia a tratamiento en cáncer de cabeza y cuello y desarrollo de un panel de biomarcadores*, S0008-2015-1.

Se generaron datos a partir de muestras embebidas en parafina de pacientes diagnosticados con cáncer de cavidad oral, recibidos en el Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), desde 2003 hasta 2013, quienes se consideraron como la cohorte de descubrimiento. Además se descargaron y analizaron datos de pacientes del *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), quienes constituyeron la cohorte de validación. Los análisis de datos se efectuaron para ambas cohortes de estudio.

### **\*Pacientes INCan (cohorte de descubrimiento)\***

#### **1. Generación de la base de datos**

Se generó una base de datos con información obtenida de los expedientes clínicos electrónicos (INCANET) de pacientes con cáncer de cavidad oral, recibidos en el Servicio de Cabeza y Cuello del Instituto Nacional de Cancerología (INCan), desde 2003 hasta 2013.

La siguiente información fue capturada:

- |                                 |   |
|---------------------------------|---|
| ✓ No. De Expediente             | ✓ Bordes libres de neoplasia            |
| ✓ Iniciales del paciente        | ✓ Respuesta a cirugía                   |
| ✓ Edad                          | ✓ Quimioterapia adicional               |
| ✓ Género                        | ✓ Radioterapia adicional                |
| ✓ Fecha de diagnóstico INCan    | ✓ Fecha de finalización del tratamiento |
| ✓ # IC                          | ✓ Recurrencia                           |
| ✓ Fecha de patología quirúrgica | ✓ Fecha de recurrencia                  |
| ✓ Histología                    | ✓ Tiempo libre de recurrencia           |
| ✓ Estadio TNM                   | ✓ Tipo de desenlace                     |
| ✓ Estadio clínico               | ✓ Fecha de muerte o último contacto     |
| ✓ Fecha de cirugía              |   |



## **2. Selección de muestras y establecimiento de los grupos de recurrencia y no recurrencia**

Los pacientes incluidos en el estudio fueron seleccionados de acuerdo a los siguientes criterios de inclusión: Pacientes con diagnóstico de cáncer de cavidad oral, a quienes se realizó cirugía sin tratamiento previo de quimio ni radioterapia, cuyas muestras de tumores (embebidas en parafina) se encontraban en el banco de tumores del INCan, con histología de carcinoma epidermoide.

Los pacientes fueron divididos en recurrentes y no recurrentes. Se consideraron en el grupo de recurrencia los pacientes que recurrieron antes de un año después de finalizar el tratamiento (cirugía o cirugía/terapia adyuvante), y en el grupo de no recurrencia aquellos pacientes que no recurrieron en periodos de más de 4 años después del tratamiento.

Finalmente, fueron excluidos los pacientes de los que no se obtuvo suficiente concentración de muestra biológica después de realizar la extracción de RNA, obteniendo un total de 16 casos recurrentes y 24 casos no recurrentes.

## **3. Realización de ensayos de microarreglos**

Las muestras de los pacientes fueron analizadas por patólogos del Instituto Nacional de Medicina Genómica (INMEGEN) y del INCan, quienes realizaron 10 cortes histológicos de cada muestra, para futura determinación de blancos proteicos; además determinaron la región tumoral, de la que se realizó biopsia tipo punch de 1mm de diámetro para extracción de RNA.

### **3.1 Extracción de RNA**

La extracción de RNA se realizó utilizando el kit comercial *Recover all* (Ambion), el cual permite la extracción de RNA total de muestras embebidas en parafina. La extracción se realizó siguiendo el protocolo del fabricante, el cual consiste básicamente de desparafinación, digestión por proteasas, aislamiento de ácidos nucleicos por columnas



y la digestión enzimática por DNAsas. Una vez extraído el RNA, fue resuspendido en agua libre de RNAsas y cuantificado por espectrofotometría en el equipo Nanodrop. Se tomaron como muestras de buena calidad aquellas cuyos índices 260/280 y 260/230 tuvieran valores  $\geq 1.2$ . Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta ser transportadas en hielo seco a la Unidad de Microarreglos del INMEGEN.

### 3.2 Microarreglos de expresión de microRNAs

Para analizar la expresión de microRNAs en las distintas muestras, se realizaron 40 microarreglos utilizando la plataforma GeneChip® microRNA 4.0 Array (Affymetrix), la cual evalúa de forma simultánea la expresión de 2560 microRNAs maduros humanos. La hibridación se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante y los arreglos fueron leídos usando el escáner GeneChip Scanner 3000 7G (Affymetrix), en la Unidad de Microarreglos del INMEGEN.

### **\*Pacientes TCGA (cohorte de validación)\***

#### **4. Obtención de datos**

Como parte de la validación de resultados en una cohorte distinta, se buscaron y descargaron datos clínicos y de niveles de expresión de genes de 65 pacientes con cáncer de cavidad oral de la base de datos de TCGA.

Los pacientes fueron divididos en 32 casos recurrentes y 33 no recurrentes, bajo los mismos criterios que los pacientes del INCan.



## \*Análisis de datos\*

### 5. Análisis de expresión diferencial de microRNAs entre pacientes recurrentes vs no recurrentes

#### 5.1 Pacientes INCan

Las imágenes escaneadas de los microarreglos fueron examinadas para comprobar que presentaran hibridación uniforme y no tuvieran defectos físicos tales como partículas de polvo.

Posteriormente, con el fin de determinar los valores netos de expresión, los valores de intensidad de señal fueron corregidos realizando una normalización global por cuantiles, siguiendo el algoritmo *Robust Multiarray Average (RMA)- Average-Detection Above Background (DABG)*, utilizando el software *Affymetrix Expression Console™*.

Una vez que los datos fueron normalizados, se realizó un análisis de expresión diferencial de microRNAs entre los grupos de recurrencia vs no recurrencia, usando el paquete *LIMMA* (Linear Models for Microarray), que pertenece al repositorio Bioconductor del software *R*.

Finalmente, los datos fueron filtrados, para obtener sólo aquellos microRNAs con un  $p\text{-Value} \leq 0.05$ .

#### 5.2 Pacientes TCGA

Con el fin de determinar los valores netos de expresión, se realizó la suma de los “counts” y la normalización de los datos de RNAseq usando el paquete *DESeq2* (Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution), del repositorio Bioconductor del software *R*.

Posteriormente, una vez que los datos fueron normalizados, se realizó un análisis de expresión diferencial de microRNAs entre los grupos de recurrencia vs no recurrencia, usando el paquete *DESeq2*, del repositorio Bioconductor del software *R*.



Finalmente, los datos fueron filtrados, para obtener sólo aquellos microRNAs con un p-value  $\leq 0.05$ .

## **6. Análisis de correlación entre niveles de expresión de microRNAs y tiempo libre de recurrencia**

Se realizó un análisis de correlación de Spearman usando el software *Python*, entre los niveles de expresión de los microRNAs presentes en el microarreglo (2560) y los microRNAs medidos en los pacientes de TCGA, con los respectivos tiempos libres de recurrencia de cada paciente (40 de la cohorte de descubrimiento y 65 de la cohorte de validación). Esto con el propósito de identificar a los microRNAs que aumentan o disminuyen su expresión conforme incrementa el tiempo libre de recurrencia. Se compararon los resultados con los encontrados por análisis de expresión diferencial.

## **7. Establecimiento de la firma de expresión de microRNAs y su asociación con recurrencia**

Los microRNAs seleccionados para la firma fueron aquellos con un p-value  $\leq 0.05$  en los análisis de expresión diferencial y correlación de Spearman, tanto para los pacientes del INCan como de TCGA.

Se realizó un análisis univariado de regresión de Cox usando el software *SPSS* para correlacionar el nivel de expresión (normalizado) de cada microRNA con el tiempo hasta el evento de recurrencia.

Posteriormente, con el fin de determinar si la firma de expresión de microRNAs es lo suficientemente robusta y permite predecir adecuadamente la recurrencia, se le asignó a cada paciente, tanto del INCan como de TCGA, un “Score de riesgo”, usando el nivel de expresión (normalizado) de cada microRNA de la firma, ponderado respecto al “hazard risk” (HR) obtenido en el análisis de Cox:

$$\text{Score de riesgo} = (\text{HR microRNA 1} * \text{Expresión microRNA 1}) + (\text{HR microRNA 2} * \text{Expresión microRNA 2}) \\ + \dots (\text{HR microRNA n} * \text{Expresión microRNA n})$$



Los pacientes fueron divididos en “Alto” y “Bajo” riesgo, de acuerdo al score obtenido, usando la mediana como punto de corte (Sung-Liang, *et al.*, 2008). Aquellos pacientes con mayores scores, se esperaba que tuvieran peor pronóstico.

Una vez determinados los score de cada paciente, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para visualizar cómo la presencia de la firma de expresión de microRNAs impacta en la recurrencia (Log-rank test,  $p \leq 0.05$ ).

Por otra parte, se realizó un análisis multivariado de regresión de Cox, para los pacientes del INCan, incluyendo en el modelo a los factores clínico-patológico tradicionales asociados a recurrencia, así como el riesgo asociado a la presencia de la firma, para determinar si la firma predice de forma robusta la recurrencia, independientemente de otros factores asociados a recurrencia. Nota: Se hizo este análisis sólo para los pacientes del INCan, porque sólo de estos se cuenta con datos de los factores clínico-patológico tradicionales.

## **8. Obtención de los blancos validados de los microRNAs**

Se obtuvieron los RNAm blanco de los microRNAs presentes en la firma al contrastar los resultados de 2 bases de datos de blancos validados experimentalmente: miRecords y miRTarBase.

Una vez identificados los RNAm blanco validados, se hizo un script en R para filtrar aquellos que son regulados por 2 o más de los microRNAs de la firma, con el fin de buscar su nivel de expresión en los datos de RNAseq de los pacientes de TCGA.

## **9. Determinación de los niveles de expresión de los RNAm blanco en los pacientes de TCGA**

Usando los “counts” de los RNAm blanco validados, se realizó un análisis de expresión diferencial entre los pacientes recurrentes y no recurrentes de TCGA, para determinar si el blanco se encontraba aumentado o disminuido y si esto correlacionó con el nivel de expresión de los microRNAs. Nota: Este análisis se realizó sólo para los pacientes de



TCGA, porque de los pacientes del INCan sólo se cuenta con datos de microRNAs y no de RNAm.

## **8. RESULTADOS**

Para el desarrollo de este proyecto, analizaron los expedientes clínicos de 558 pacientes del INCan, encontrando 40 pacientes que cuentan con la información de seguimiento necesaria, así como suficiente material biológico, divididos en 16 casos de recurrencia, y 24 de no recurrencia. Además, se buscaron y descargaron los datos de 606 pacientes con cáncer de cavidad oral de TCGA, de los cuales 65 cuentan con información sobre tiempo y evento de recurrencia, quienes fueron divididos en 32 recurrentes y 33 no recurrentes.

### **8.1 Análisis epidemiológico (Pacientes INCan)**

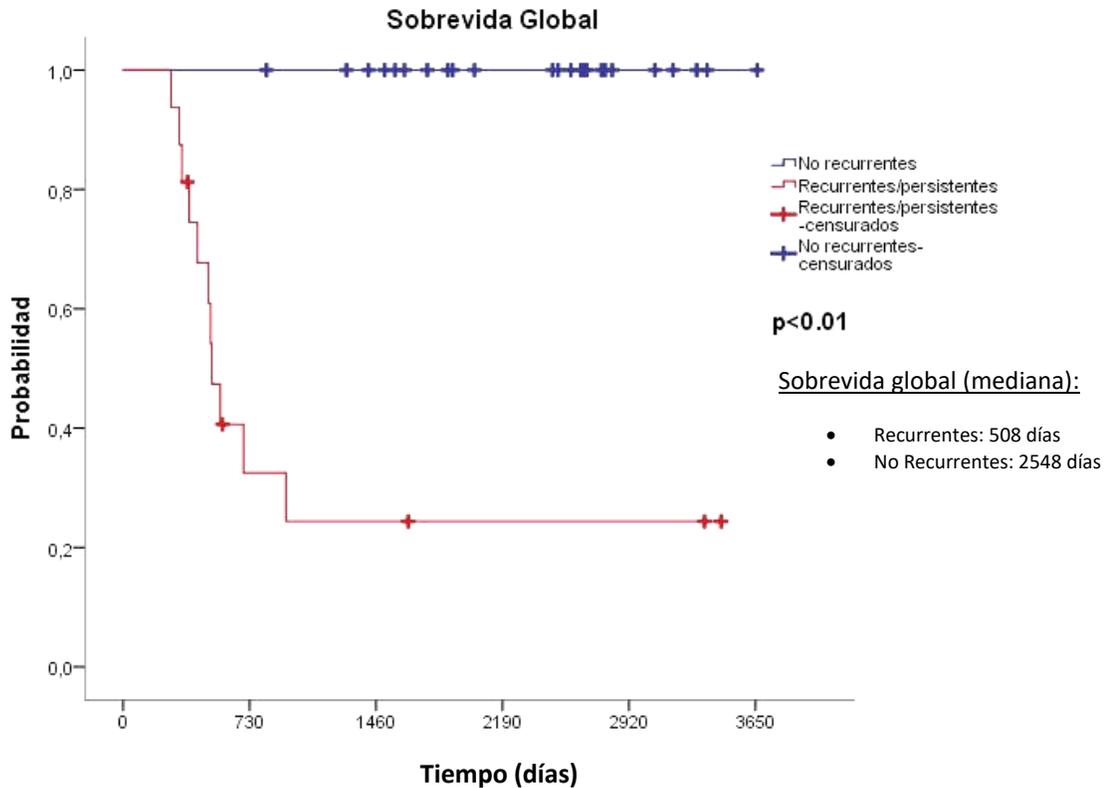
Con el fin de determinar si existe asociación de los factores clínico-patológico tradicionales con recurrencia, se realizó una prueba exacta de Fisher. Se encontró que ninguna de las variables está asociadas con recurrencia ( $p > 0.05$ ) (Tabla 3).

Por otra parte, se realizó una curva de supervivencia de Kaplan Meyer para determinar si el factor recurrencia impactó en la sobrevida de los pacientes. En la figura 9 se observa que los pacientes del grupo de Recurrencia tienen una sobrevida significativamente menor que aquellos No Recurrentes ( $p < 0.01$ ).



**Tabla 3: Características clínicas de los grupos de estudio**

	Pacientes		Total	Fisher Test
	Recurrentes	No Recurrentes		
<b>GÉNERO</b>				
Femenino	7 /43.8%	14 /58.3%	21 /52.5%	<b>0.52</b>
Masculino	9 /56.3%	10 /41.7%	19 /47.5%	
<b>ESTADIO CLÍNICO</b>				
EC I	1 /6.3%	5 /20.8%	6 /15%	<b>0.52</b>
EC II	3 /18.8%	4 /16.7%	7 /17.5%	
EC III	4 /25%	6 /25%	10 /25%	
EC IVA	5 /31.3%	4 /16.7%	9 /22.5%	
EC IVB	1 /6.3%	0 /0%	1 /2.5%	
NO CLASIFICABLE	2 /12.5%	5 /20.8%	7 /17.5%	
<b>BORDES LIBRES DE ENFERMEDAD</b>				
Si	12 /75%	22 /91.7%	34 /85%	<b>0.19</b>
No	4 /25%	2 /8.3%	6 /15%	
<b>HISTOLOGÍA</b>				
C. E. Bien diferenciado	12 /75%	12/50%	24 /60%	<b>0.24</b>
C.E. Moderadamente diferenciado	3 /18.8%	7/29.2%	10 /25%	
C.E. Poco diferenciado	1 /6.3%	5/20.8%	6/15%	
<b>Total</b>	<b>16 /100%</b>	<b>24 /100%</b>	<b>40/100%</b>	



**Figura 9.** Sobrevida global de los pacientes de la cohorte de descubrimiento (INCan). Se muestran en rojo los pacientes recurrentes y en azul los no recurrentes. Los datos censurados aparecen como cruces. La mediana de tiempo de supervivencia fue de 508 días para los pacientes recurrentes y de 2548 días para los pacientes no recurrentes. Se observa que los pacientes recurrentes tienen una supervivencia global significativamente menor a la de los pacientes no recurrentes ( $p < 0.01$ ).



## 8.2 Extracción y cuantificación de RNA

Una vez que se analizó la población, se procedió a la extracción de RNA total de muestras embebidas en parafina de tumores de los pacientes del INCan. En la tabla 4 se resumen las concentraciones de RNA de los 24 pacientes no recurrentes y los 16 recurrentes, así como valores de los índices 260/230 y 260/280, en todos los casos mayores o iguales a 1.2.

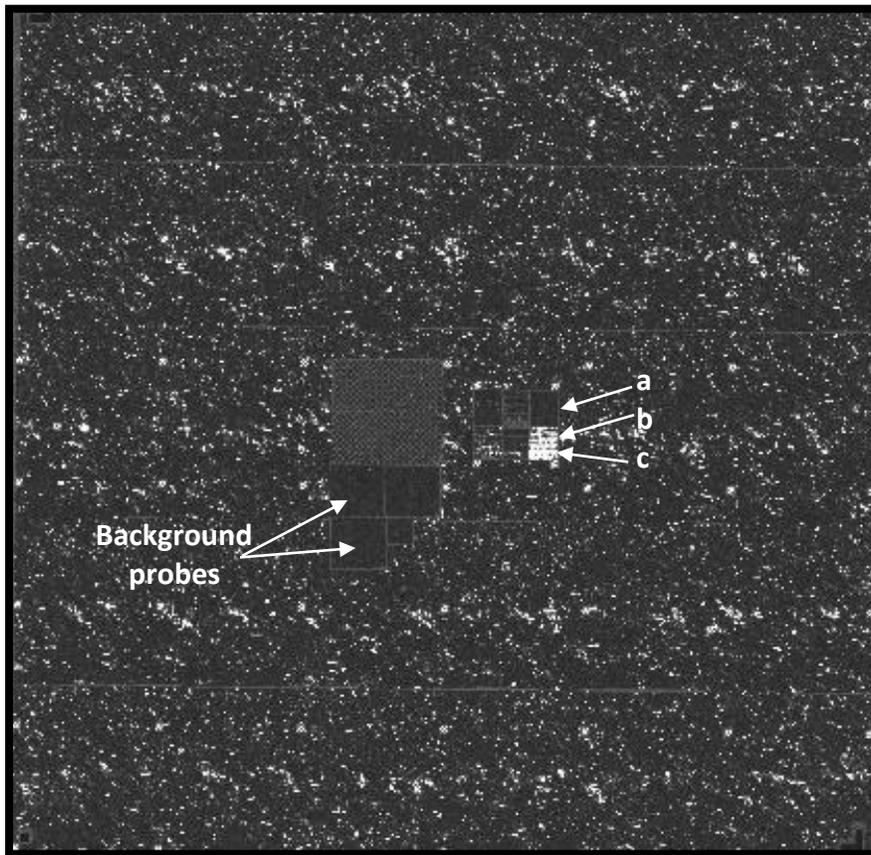
**Tabla 4:** Concentración de RNA total de las muestras de los pacientes

	No. Exp.	[RNA]TOTAL	260/280	260/230
<b>No recurrentes</b>	70154	249.3	2.02	1.7
	73434	345	2.03	2.03
	74109	49.2	2.1	1.2
	83289	407.9	2.03	1.97
	92443	127.3	2.11	1.9
	93776	22.2	2.22	2.06
	94254	61.4	2.05	1.61
	100943	1105.5	2.02	2.16
	101482	777	2.06	2.12
	101536	1110	2.05	2.03
	103959	333	2.08	2.05
	122333	39.5	1.82	1.26
	52993	105.1	2.03	1.76
	53827	187	1.99	1.78
	54028	340	1.99	1.94
	32364	116.7	1.99	1.79
	63616	104	2.08	1.85
	972682	30.1	2.01	1.45
	102595	149.8	2.07	2.01
	81388	20	1.97	1.64
	131393	31.3	2.09	1.2
	121879	36.9	2.06	1.27
	84648	56.5	2.08	1.64
	124634	22.2	1.93	1.79
<b>Recurrentes</b>	71284	243.3	2.02	1.93
	72088	30.8	2.07	1.72
	72302	66	2.01	1.3
	72455	248.5	2.03	1.92
	72814	60.1	2.05	1.07
	73334	128.2	1.99	1.75
	73487	185.4	2	1.9
	80566	316	2.03	1.96
	90395	75	2.02	1.6
	115113	207.1	2.02	1.87
	124852	73.1	2.07	1.73
	124968	198	2.02	2
	125015	45.7	2.15	1.28
	103556	57.8	2.07	1.99
	131889	80.3	2.07	1.97
	55178	144.7	2.04	1.99

### **8.3 Análisis de la calidad de imágenes de los microarreglos**

Después de realizar la extracción y cuantificación de RNA, se procedió a llevar a cabo los ensayos de microarreglos.

Antes de comenzar con el análisis de los datos (normalización global), se llevó a cabo un análisis visual de las imágenes .DAT de los arreglos hibridados; esto con el fin de determinar que no hubiera alteraciones en el arreglo, no relacionadas a la hibridación del RNA, que pudieran afectar la lectura de la intensidad de fluorescencia por el escáner (como polvo o manchas). Los arreglos mostraron buena calidad y no se observaron alteraciones de los mismos (Fig. 10), por lo que se pudo continuar con el análisis de los datos crudos (CEL files).



**Figura 10.** Imagen representativa de un microarreglo (Genechip 4.0, Affymetrix) hibridado con la muestra de 1 paciente recurrente. Se muestran los probes que representan el background, así como los controles de hibridación (a, b y c). a) Intensidad baja, b) Intensidad media, c) Intensidad alta. Se observa óptima hibridación del RNA.



## **8.4 Análisis Bioinformáticos y Bioestadísticos**

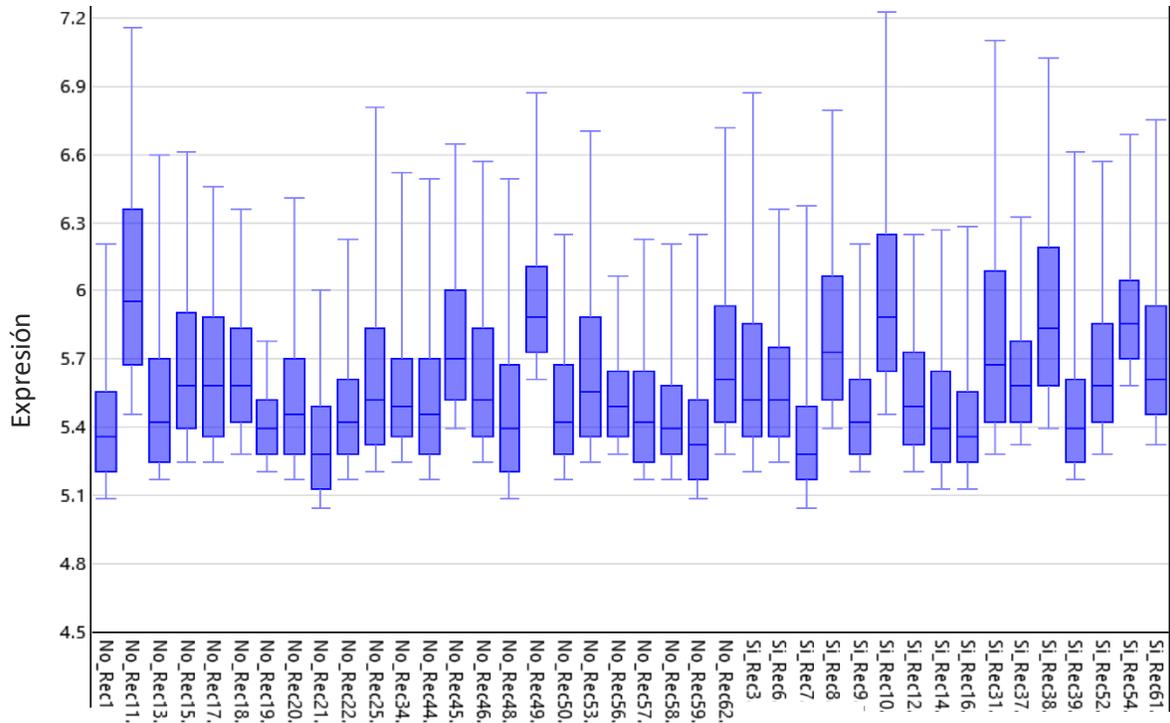
Para la evaluación de los datos obtenidos, tanto de los pacientes del INCan, como de los pacientes de TCGA, los análisis fueron divididos en “análisis de expresión diferencial”, “análisis de correlación de Spearman” y “análisis de regresión de Cox”.

### **8.4.1 Análisis de datos de microarreglos (Pacientes INCan)**

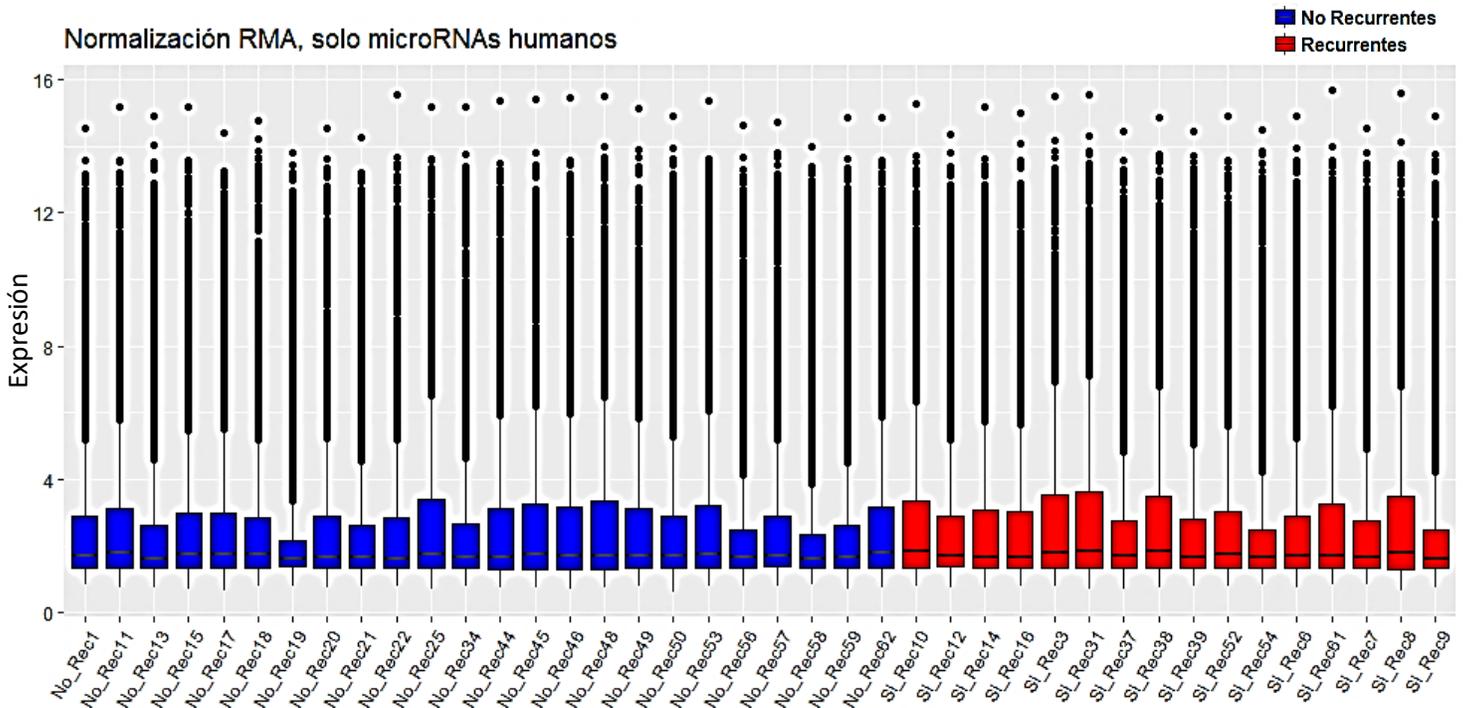
#### **8.4.1.1 Normalización global de datos crudos de microarreglos**

Una vez que la intensidad de fluorescencia es captada por el escáner, es codificada y transformada en valores numéricos, que son guardados en forma de “CEL Files”. Estos datos crudos fueron cargados en el software *Affymetrix Expression Console*<sup>™</sup>, en donde se realizó una normalización global de los datos, que consiste en una corrección de background, una normalización global y cálculo del nivel neto de expresión. Al hacer la normalización se seleccionó el algoritmo RMA-DABG, y que éste se aplicara exclusivamente a los probeset correspondientes a humano, pues el arreglo permite analizar RNA de distintas especies. Este algoritmo involucra: 1) Corrección de fondo sin contar Miss Match (MM) pues RMA estima que MM contiene hibridación específica e inespecífica y no es por tanto útil para corregir el fondo; 2) Normalización por cuantiles de los Perfect Match; 3) Sumarización de los probesets por median polish; y 4) Determinación de la detección sobre el background.

Cuando se obtuvieron los datos normalizados, la matriz de expresión fue cargada en el software *R*, donde se realizó un script que permitió filtrar de los 6660 datos de humano, aquellos correspondientes solamente a los 2560 microRNAs maduros, y los datos normalizados fueron graficados en un boxplot, usando el paquete *ggplot2* del software *R* (Fig. 12). También se graficaron los datos sin normalizar para comparar las distribuciones entre los arreglos (Fig. 11), lo que permitió corroborar que la normalización fue exitosa (Fig. 12).



**Figura 11.** 40 Microarreglos de expresión de microRNAs, datos no normalizados. Se observa una distribución de los datos muy distinta entre los arreglos.



**Figura 12.** 40 Microarreglos de expresión de microRNAs, datos normalizados por RMA-DABG. Se observa una distribución similar entre los niveles de expresión en cada arreglo.



### 8.4.1.2 Análisis de expresión diferencial (Pacientes INCan)

Después de que los datos fueron normalizados, se realizó un análisis de expresión diferencial de microRNAs entre los grupos de recurrencia y no recurrencia, usando el algoritmo *LIMMA*. Este es un modelo de ANOVA, pero diseñado para cada gen por separado, en vez de hacer un único modelo general y aplicarlo a cada gen. Este análisis permitió determinar los microRNAs que están expresados diferencialmente y con qué valor de significancia estadística. Finalmente, se filtraron aquellos microRNAs que tuvieran un p-value < 0.05, obteniendo 108 microRNAs expresados diferencialmente de forma significativa (Tabla 5).

**Tabla 5:** Resultados del análisis *LIMMA*. microRNAs diferencialmente expresados entre los grupos de recurrencia y no recurrencia con p-value < 0.05.

microRNAs aumentados			microRNAs disminuidos		
MicroRNAs	logFC	P.Value	MicroRNAs	logFC	P.Value
miR-133a-3p	2.997511792	0.001798864	miR-507	-0.130621246	0.026859741
miR-206	2.792095542	0.048696757	miR-216b-3p	-0.135038667	0.037976773
miR-133b	2.550755896	0.002000492	miR-124-5p	-0.150265115	0.014264653
miR-1	2.042613538	0.002175576	miR-152-5p	-0.153274206	0.026760596
miR-432-5p	1.712953938	0.00325307	miR-148b-5p	-0.157479067	0.046673613
miR-127-3p	1.582431208	0.009947575	miR-892c-5p	-0.165154752	0.025932532
miR-487b-3p	1.346276042	0.008021074	miR-7157-5p	-0.165606596	0.036680516
miR-379-5p	1.290484083	0.024513342	miR-548y	-0.170947563	0.013262723
miR-128-3p	1.283140725	0.008248224	miR-6874-3p	-0.171171763	0.035147621
miR-574-3p	1.267197938	0.008428647	miR-6842-3p	-0.17531471	0.049442142
miR-214-5p	1.250202563	0.002678028	miR-1178-3p	-0.177753633	0.030239967
miR-214-3p	1.207804667	0.00253844	miR-6841-5p	-0.178974875	0.022469181
miR-139-5p	1.123274729	0.038869068	miR-942-5p	-0.180317296	0.021624626
miR-30a-3p	1.053670833	0.033922023	miR-7162-5p	-0.186044785	0.020693424
miR-378a-5p	0.996780229	0.012667455	miR-5696	-0.187543352	0.016772328
miR-134-5p	0.97036075	0.045570426	miR-4524b-5p	-0.191991521	0.011864388
miR-30a-5p	0.970236771	0.047141293	miR-186-3p	-0.198635985	0.017958622
miR-199a-5p	0.960964542	0.02302412	miR-515-3p	-0.202708838	0.021229225
miR-199b-5p	0.925391	0.004874309	miR-552-5p	-0.212321194	0.046456044
miR-381-3p	0.867007583	0.017132591	miR-4728-3p	-0.215962854	0.049943014
miR-199a-3p	0.832960417	0.019620597	miR-4766-3p	-0.225639044	0.002129236
miR-199b-3p	0.832960417	0.019620597	miR-3116	-0.235211521	0.01951861
miR-502-3p	0.802774813	0.019825633	miR-5689	-0.242039396	0.020767357
miR-3607-5p	0.780446417	0.01060407	miR-6841-3p	-0.248132813	0.006694503
miR-501-3p	0.760595271	0.024352129	miR-3613-3p	-0.376103292	0.012862923
miR-193b-5p	0.725055	0.026681622	miR-4797-5p	-0.376907313	0.041881834
miR-500a-3p	0.716676604	0.044001605	miR-4668-5p	-0.442822667	0.004647247
miR-140-5p	0.700445521	0.033772088	miR-6765-3p	-0.584886083	0.018241381
miR-6840-3p	0.693144125	0.025623243			
miR-489-3p	0.674653021	0.017906769			
miR-485-5p	0.658141792	0.001879175			
miR-628-3p	0.624381604	0.043612422			
miR-133a-5p	0.599706271	0.017000174			
miR-154-5p	0.596707458	0.041246393			
miR-361-5p	0.595657521	0.038531595			
miR-411-5p	0.582192167	0.01905537			
miR-30c-5p	0.570867646	0.015735985			
miR-885-5p	0.56471375	0.004439295			
miR-299-3p	0.498757333	0.021240401			



miR-4269	0.487424708	0.049967789
miR-637	0.484045375	0.040818727
miR-550a-5p	0.482005896	0.040181153
miR-139-3p	0.480408062	0.015934914
miR-6831-5p	0.433833958	0.033683806
miR-557	0.433099063	0.046008549
miR-1287-5p	0.416561292	0.023195932
miR-3163	0.415282833	0.042676901
miR-3616-3p	0.413963667	0.028098484
miR-3065-5p	0.413087392	0.033793509
miR-6856-5p	0.405243208	0.008135754
miR-1913	0.397463208	0.024896953
miR-4731-5p	0.386975292	0.043641203
miR-181c-3p	0.38298575	0.035771924
miR-3935	0.362447746	0.012172413
miR-338-5p	0.340955271	0.042310037
miR-154-3p	0.320754854	0.048542172
miR-3126-3p	0.29963475	0.023515526
miR-5000-3p	0.294493187	0.012602142
miR-3181	0.291882208	0.028858209
miR-758-3p	0.290626488	0.012408712
miR-4647	0.263109375	0.033787765
miR-551b-3p	0.260901333	0.031977193
miR-99a-3p	0.254875187	0.029671353
miR-381-5p	0.249215917	0.013689028
miR-6882-5p	0.248042042	0.011148061
miR-101-3p	0.241791667	0.014683818
miR-132-5p	0.240817683	0.015885576
miR-5583-5p	0.237721171	0.032783286
miR-6720-3p	0.233733458	0.026849362
miR-5705	0.2332455	0.028280566
miR-4664-3p	0.21011125	0.049049319
miR-588	0.208866962	0.003196278
miR-106a-3p	0.20822225	0.002515384
miR-380-5p	0.18653185	0.008281554
miR-4432	0.180503125	0.042354707
miR-3183	0.17795345	0.040054851
miR-4757-3p	0.167402313	0.04940596
miR-98-3p	0.166748021	0.048159465
miR-548ao-3p	0.1622999	0.03599885
miR-4282	0.144956904	0.034166421

#### **8.4.2 Análisis de datos de RNAseq (Pacientes TCGA)**

Se utilizó la base de datos de TCGA para buscar y descargar los datos de número de lecturas por microRNA maduro (counts) de pacientes con cáncer de cavidad oral recurrentes (32 casos) y no recurrentes (33 casos). Con el fin de determinar los valores netos de expresión, se realizó la suma de los “counts” y la normalización de los datos de RNAseq usando el paquete *DESeq2* (Differential gene expression analysis based on the negative binomial distribution), del repositorio Bioconductor del software R.



### 8.4.2.1 Análisis de expresión diferencial (Pacientes TCGA)

Para hacer el análisis de expresión diferencial entre pacientes recurrentes y no recurrentes, se utilizó el algoritmo *DESeq2*, el cual estima la dependencia de la varianza promedio de los “counts” de ensayos de secuenciación, y permite evaluar expresión diferencial con base en un modelo que utiliza la distribución binomial negativa.

Este análisis permitió determinar los microRNAs que están expresados diferencialmente y con qué valor de significancia estadística. Finalmente, se filtraron aquellos microRNAs que tuvieran un valor p-value < 0.05 obteniendo 194 microRNAs expresados diferencialmente de forma significativa (Tabla 6).

**Tabla 6:** Resultados del análisis *DESeq2*. microRNAs diferencialmente expresados entre los grupos de recurrencia y no recurrencia con p-value < 0.05.

microRNAs aumentados			microRNAs disminuidos		
MicroRNAs	logFC	P.Value	MicroRNAs	logFC	P.Value
hsa-miR-211-5p	3.314996799	0.026056249	hsa-miR-15b-5p	-0.322081281	0.046840721
hsa-miR-1911-5p	2.311841806	0.023091796	hsa-miR-30e-3p	-0.33253066	0.029755514
hsa-miR-499a-3p	2.165817381	0.007515024	hsa-let-7a-3p	-0.379126072	0.020077818
hsa-miR-3664-5p	2.110222465	0.016174222	hsa-miR-125a-3p	-0.392520135	0.049464037
hsa-miR-381-5p	1.892662087	0.000188224	hsa-miR-320b	-0.414632757	0.041849874
hsa-miR-653-5p	1.472564843	2.64652E-05	hsa-miR-92b-3p	-0.437903054	0.012275857
hsa-miR-653-3p	1.398456972	0.032530408	hsa-miR-24-3p	-0.4531237	0.001076256
hsa-miR-577	1.382298845	0.023281958	hsa-miR-320a	-0.462470333	0.012296493
hsa-miR-1	1.362856998	0.027769398	hsa-miR-193a-5p	-0.48234568	0.010234178
hsa-miR-204-5p	1.199512072	0.011304146	hsa-miR-27a-3p	-0.489539847	0.001353365
hsa-miR-3200-3p	1.109339011	0.000581932	hsa-miR-200b-5p	-0.489833645	0.042293355
hsa-miR-551b-3p	1.105690507	0.023586701	hsa-miR-1262	-0.491956716	0.03613934
hsa-miR-6503-3p	1.098596697	0.035019368	hsa-miR-3677-3p	-0.516273721	0.044810808
hsa-miR-589-3p	1.059297737	0.000661179	hsa-miR-330-5p	-0.553332446	0.001084034
hsa-miR-338-3p	1.021443961	8.40357E-06	hsa-miR-942-3p	-0.554849013	0.039968006
hsa-miR-3607-3p	1.012379777	0.006641189	hsa-miR-424-3p	-0.617879016	0.023082654
hsa-miR-675-3p	0.974997383	0.031969824	hsa-miR-6892-5p	-0.619957861	0.016083696
hsa-miR-548e-3p	0.956804822	0.003455893	hsa-miR-7-5p	-0.638004016	0.045978646
hsa-miR-190b	0.951178922	0.012049439	hsa-miR-135b-5p	-0.641928663	0.008817127
hsa-miR-6503-5p	0.931126716	0.045950755	hsa-miR-6842-3p	-0.677542513	0.000729651
hsa-miR-184	0.902557444	0.042991004	hsa-miR-193b-5p	-0.692315256	0.000384744
hsa-miR-628-5p	0.86889833	0.00601777	hsa-miR-320c	-0.734129181	0.006848056
hsa-miR-539-5p	0.857945697	0.006821568	hsa-miR-584-3p	-0.754446364	0.025039194
hsa-miR-362-5p	0.85752636	0.000545888	hsa-miR-143-3p	-0.800551612	0.002407874
hsa-miR-501-5p	0.795010611	0.000451205	hsa-miR-135b-3p	-0.812005362	0.003233825
hsa-miR-4766-3p	0.791344195	0.048172036	hsa-miR-5001-5p	-0.826437333	0.018688938
hsa-miR-143-5p	0.790171255	0.005182539	hsa-miR-3117-3p	-0.841038837	0.047060574
hsa-miR-1287-3p	0.75477431	0.005541953	hsa-miR-144-3p	-0.849307681	0.023229276
hsa-miR-99a-3p	0.748369677	0.017161967	hsa-miR-3677-5p	-0.902352785	0.003202203
hsa-miR-196b-5p	0.745782429	0.023531862	hsa-miR-3614-5p	-0.906128856	0.005362128
hsa-miR-4668-3p	0.734268087	0.005389229	hsa-miR-5579-3p	-0.949017594	0.012150158
hsa-miR-616-5p	0.714650477	0.024060437	hsa-miR-6125	-0.989633626	0.009200869
hsa-miR-339-5p	0.712438319	0.000628669	hsa-miR-3917	-1.045894938	0.000323425
hsa-miR-136-5p	0.664873032	0.015907357	hsa-miR-320d	-1.049509412	0.002609198
hsa-let-7a-2-3p	0.655163028	0.036409783	hsa-miR-3157-3p	-1.081689905	0.038215705
hsa-miR-579-5p	0.653839814	0.042478975	hsa-miR-4484	-1.084568801	0.020949063
hsa-miR-377-3p	0.634821347	0.046320022	hsa-miR-4732-3p	-1.154963476	0.016271345



hsa-miR-409-5p	0.612300523	0.011524475	hsa-miR-3129-5p	-1.189251846	0.036337787
hsa-miR-376b-3p	0.61056138	0.047592668	hsa-miR-4442	-1.219786447	0.015911471
hsa-miR-337-3p	0.609780398	0.034175918	hsa-miR-6870-3p	-1.308625553	0.046765849
hsa-miR-29b-2-5p	0.604650597	0.00022371	hsa-miR-7846-3p	-1.318090266	0.011554286
hsa-miR-532-5p	0.589714938	8.59584E-05	hsa-miR-556-3p	-1.438160956	0.032643191
hsa-miR-500a-3p	0.572288062	9.48713E-05	hsa-miR-4443	-1.44577981	0.003110667
hsa-miR-660-5p	0.568588045	0.002854598	hsa-miR-4791	-1.536702754	0.00083192
hsa-miR-4661-5p	0.527369601	0.01256466	hsa-miR-556-5p	-1.559205711	0.019915743
hsa-miR-29c-5p	0.527122011	0.00743365	hsa-miR-221-5p	-1.71954946	4.07738E-07
hsa-miR-148a-3p	0.503875954	0.018029487	hsa-miR-7704	-1.768943215	0.000535327
hsa-miR-328-3p	0.496249549	0.007424407			
hsa-miR-127-5p	0.49359488	0.036314676			
hsa-miR-148b-5p	0.490204656	0.013026128			
hsa-miR-30a-5p	0.458336415	0.030878833			
hsa-miR-500b-5p	0.45287581	0.024677135			
hsa-miR-500a-5p	0.449483281	0.025726855			
hsa-miR-139-5p	0.444141969	0.036591355			
hsa-miR-589-5p	0.436380182	0.011130401			
hsa-miR-629-3p	0.434648627	0.027892978			
hsa-miR-501-3p	0.425927675	0.006451321			
hsa-miR-93-5p	0.346230056	0.041597847			
hsa-miR-576-5p	0.332866527	0.046868989			

Al comparar los resultados de los análisis de expresión diferencial de los pacientes del INCan con los de los pacientes de TCGA, se encontraron 9 microRNAs compartidos entre ambas cohortes de estudio, 8 aumentados y 1 disminuido en los pacientes recurrentes con respecto a los no recurrentes (Tabla 7).

**Tabla 7:** microRNAs con  $p$ -value  $< 0.05$ , en el análisis de expresión diferencial, compartidos entre los pacientes del INCan y TCGA.

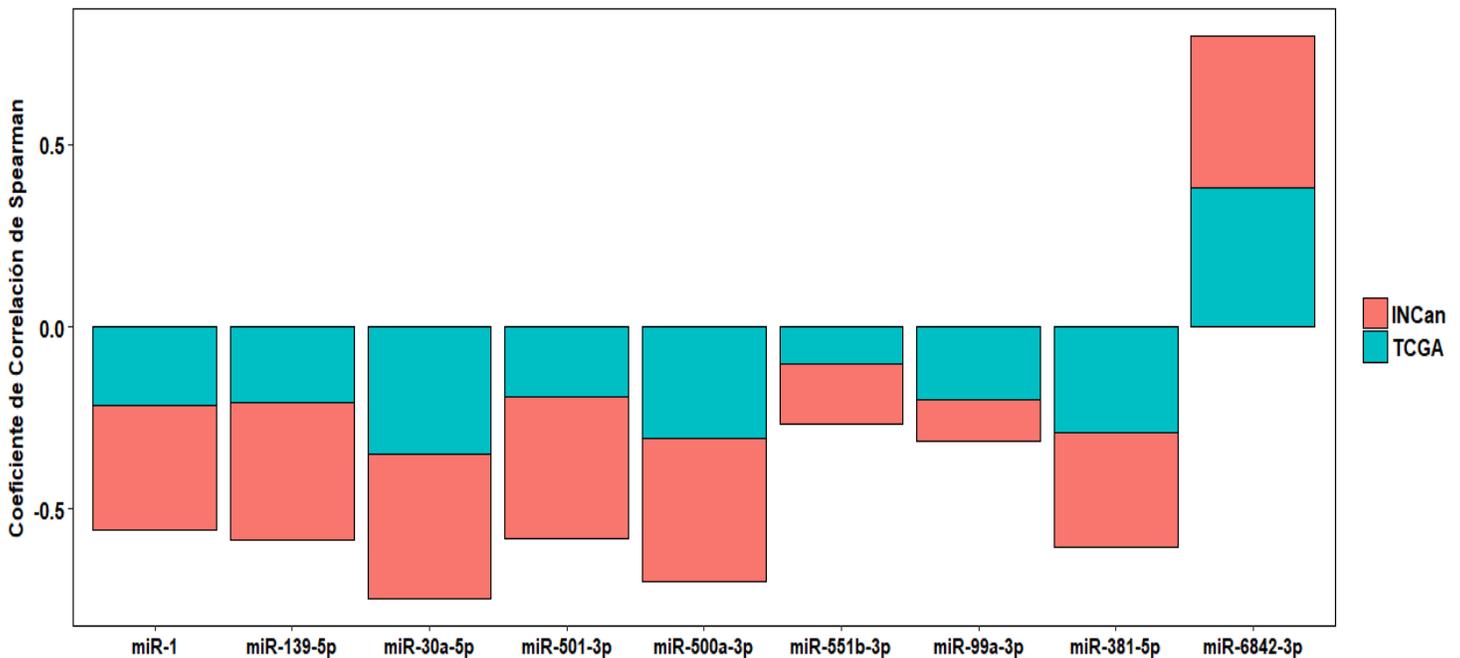
INCan			TCGA		
microRNA	LogFC	pVal	microRNA	LogFC	pVal
miR-1	2.04261354	0.00217558	miR-1	1.362857	0.0277694
miR-139-5p	1.12327473	0.03886907	miR-139-5p	0.44414197	0.03659136
miR-30a-5p	0.97023677	0.04714129	miR-30a-5p	0.45833641	0.03087883
miR-501-3p	0.76059527	0.02435213	miR-501-3p	0.42592768	0.00645132
miR-500a-3p	0.7166766	0.04400161	miR-500a-3p	0.57228	0.00009487
miR-551b-3p	0.26090133	0.03197719	miR-551b-3p	1.10569051	0.0235867
miR-99a-3p	0.25487519	0.02967135	miR-99a-3p	0.74836968	0.01716197
miR-381-5p	0.24921592	0.01368903	miR-381-5p	1.89266209	0.00018822
miR-6842-3p	-0.17531471	0.04944214	miR-6842-3p	-0.67754251	0.00072965



### **8.4.3 Análisis de correlación de Spearman**

Una vez realizados los análisis de expresión diferencial para ambas cohortes de estudio, se realizaron análisis de correlación de Spearman entre el nivel de expresión normalizado de los microRNAs maduros y el tiempo libre de recurrencia de cada paciente. Esto con el fin de identificar a los microRNAs que aumentan o disminuyen su expresión conforme transcurre el tiempo.

Se filtraron los microRNAs con  $p$ -value  $< 0.05$  y se compararon con los resultados de los análisis de expresión diferencial. Se esperaba que los microRNAs aumentados en los pacientes recurrentes, tuvieran una correlación negativa con el tiempo libre de recurrencia del paciente, mientras que los microRNAs disminuidos, tuvieran una correlación positiva con el tiempo libre de recurrencia. En la figura 13 se observa el coeficiente de correlación de Spearman con el comportamiento esperado, para los 9 microRNAs compartidos entre las cohortes de estudio en el análisis de expresión diferencial (Tabla 7).



**Figura 13.** Coeficiente de correlación de Spearman de los microRNAs compartidos entre las cohortes de estudio en el análisis de expresión diferencial. Se muestran 8 microRNAs negativamente correlacionados y uno positivamente correlacionado con el tiempo libre de recurrencia.

### **8.4.4 Asociación de los microRNAs seleccionados con recurrencia**

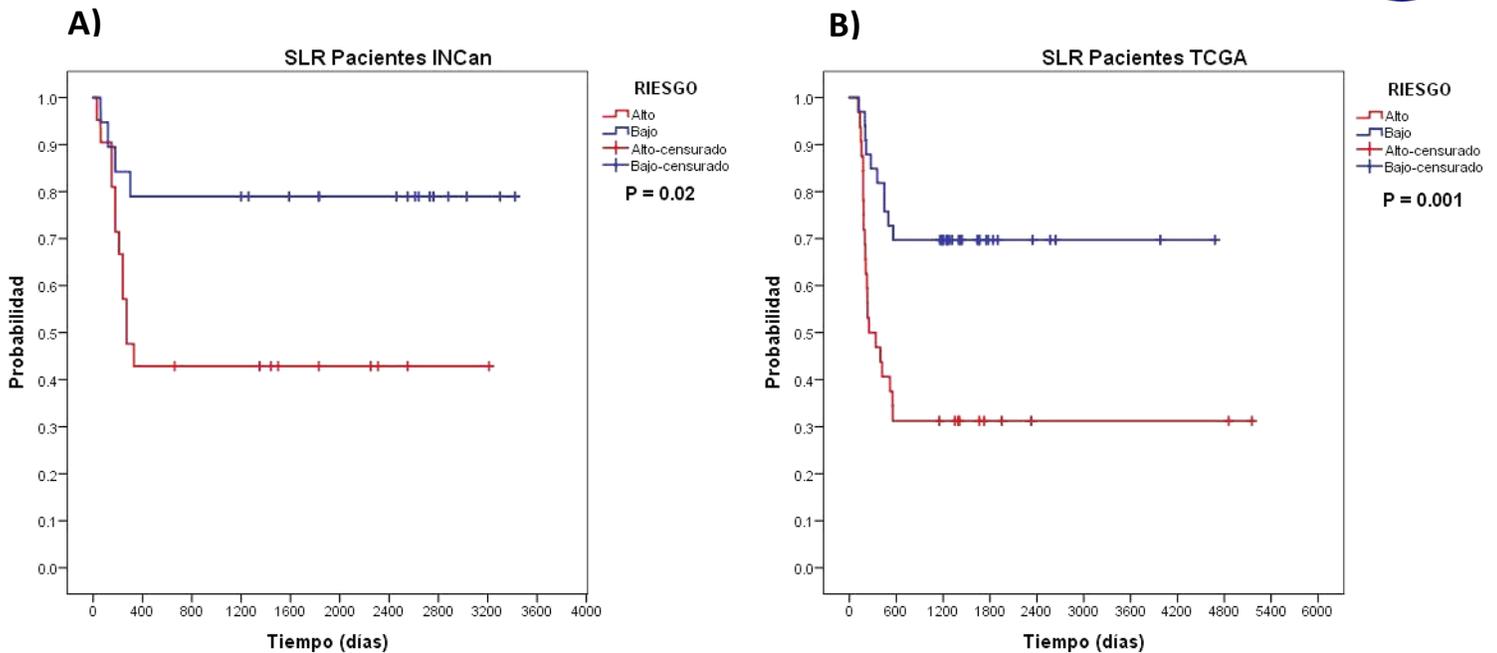
#### **8.4.4.1 Score de riesgo para los pacientes, basado en la presencia de la firma de microRNAs**

Se realizó un análisis univariado de regresión de Cox usando el software *SPSS* para obtener el hazard ratio que aporta cada microRNA al evento recurrencia en cada paciente de ambas cohortes (Tabla 8). Con este dato, más el nivel de expresión de cada microRNA, se calculó un score de riesgo para cada paciente.

**Tabla 8:** Resultados del análisis univariado de regresión de Cox. A) Pacientes INCan. B) Pacientes TCGA

A) INCan			B) TCGA		
microRNA	p-val	HR	microRNA	p-val	HR
miR-1	0.006	1.304	miR-1	0.26	1.227
miR-139-5p	0.042	1.319	miR-139-5p	0.091	2.164
miR-30a-5p	0.053	1.41	miR-30a-5p	0.033	5.734
miR-501-3p	0.034	1.73	miR-501-3p	0.009	10.705
miR-500a-3p	0.078	1.587	miR-500a-3p	0.000	37.684
miR-551b-3p	0.035	3.882	miR-551b-3p	0.317	1.564
miR-99a-3p	0.04	3.568	miR-99a-3p	0.025	2.909
miR-381-5p	0.011	6.417	miR-381-5p	0.022	2.224
miR-6842-3p	0.04	0.073	miR-6842-3p	0.002	0.109

Los pacientes fueron divididos en Alto y Bajo riesgo, de acuerdo al score obtenido, usando la mediana como punto de corte. Una vez determinados los score de riesgo de cada paciente, se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier para determinar cómo la firma de expresión de microRNAs impacta en la recurrencia (Fig. 14 A y B). Se observa que aquellos pacientes con un riesgo alto de acuerdo a la presencia de la firma de expresión, tienden a recurrir de forma temprana, respecto a los pacientes con riesgo bajo.



**Figura 14.** Sobrevida libre de recurrencia (SLR). A) Pacientes del INCan, B) Pacientes TCGA. Se muestran en rojo los pacientes recurrentes y en azul los no recurrentes. Los datos censurados aparecen como cruces. Se observa que los pacientes con riesgo alto de acuerdo a la presencia de la firma de expresión, recurren más rápido que los pacientes con riesgo bajo ( $p < 0.05$ ).

#### **8.4.4.2 Análisis multivariado de regresión de Cox (pacientes INCan)**

Con el fin de determinar si la firma de expresión de microRNAs es lo suficientemente robusta para predecir la recurrencia en los pacientes del INCan, independientemente de otros factores clínicamente asociados a recurrencia, se realizó un modelo multivariado. En la tabla 9 se observa que ninguno de los factores tradicionales está asociado a un mayor riesgo de desarrollar recurrencia (bajo poder predictivo); sin embargo, el que los pacientes sean positivos a la firma de microRNAs se asocia a un riesgo significativo para el desarrollo de recurrencia.



**Tabla 9.** Resultados del análisis multivariado de regresión de Cox para la firma de microRNAs y los factores clínico-patológico tradicionales asociados a recurrencia

Variables asociadas a la recurrencia	Hazard Ratio	95% IC	Pval
<b>Bordes libres de neoplasia</b>	0.742	0.164-3.364	0.69
<b>Grado de diferenciación del tumor</b>			
-Carcinoma epidermoide bien diferenciado	2.65	0.255-27.748	0.41
-Carcinoma epidermoide moderadamente diferenciado	3.69	0.421-32.327	0.23
<b>Estadio clínico</b>			
-I	0.65	0.05-7.9	0.73
-II	2.26	0.32-15.54	0.40
-III	1.07	0.177-6.51	0.93
-IVA	2.93	0.49-17.57	0.23
-IVB	1.88	0.125-28.39	0.64
<b>Firma de microRNAs</b>	<b>3.69</b>	<b>1.10-12.36</b>	<b>0.03</b>

### **8.5 Obtención de los blancos validados de los microRNAs de la firma**

Una vez que se estableció la firma de microRNAs asociada a recurrencia: miR-1, miR-139-5p, miR-30a-5p, miR-501-3p, miR-500a-3p, miR-551b-3p, miR-99a-3p, miR-381-5p aumentados, y miR-6842-3p disminuido en el grupo de recurrencia vs el grupo de no recurrencia; se procedió a buscar los RNAm blanco regulados por estos, previamente validados experimentalmente. Se encontraron 1383 RNAm blanco validados experimentalmente, algunos de los cuales se muestran en la tabla 10.



**Tabla 10.** Algunos RNAm blanco validados de los microRNAs de la firma. Los blancos de los microRNAs aumentados se muestran en rojo y del microRNA disminuido en azul.

Firma de microRNAs		RNAm blanco validados						
microRNAs aumentados	miR-1	ABCA5	ABL2	ACTB	ACVR2B	ADCY6	AFF4	ALCAM
	miR-139-5p	IGF1R	FOS	TGS1	RPS26	MCL1	CXCR4	JUN
	miR-30a-5p	BDNF	NOTCH1	BECN1	TNRC6A	HNRNPM	ELMOD2	TNFRSF10B
	miR-501-3p	UBE2H	FAM219B	FDXR	MCM2	MCM4	DENND4B	PEG10
	miR-500a-3p	CCDC47	KLHL15	TRIM49C	FDXR	DENND4B	CHMP2A	SOAT1
	miR-551b-3p	KIAA1671	MCMBP	MAP4	MAP3K21	REXO1	SELENOS	PDE4C
	miR-99a-3p	CLTC	POLR2E	ARF5	WIPF1	AGTPBP1	GOLGA6L4	GOLGA6L10
miR-381-5p	RALGAPB	IFNAR1	YWHAZ	SLC36A1	DAZAP2	CABLES1	ZNF607	
microRNA disminuido	miR-6842-3p	RAB5B	DNAJB9	UBN2	ARSK	AKAP1	ILK	SUPT16H

### **8.6 Niveles de expresión de los RNAm blanco en los pacientes de TCGA**

Una vez que se identificaron 1383 RNAm blanco validados experimentalmente, se hizo un script en R para filtrar aquellos que son regulados por 2 o más de los microRNAs de la firma, para posteriormente determinar su nivel de expresión en los datos de RNAseq de los pacientes de TCGA. De estos se encontraron 54 RNAm blanco compartidos entre algunos de los microRNAs aumentados de la firma, y 85 RNAm blanco del microRNA disminuido de la firma.

Usando los “counts” de estos RNAm blanco, se realizó un análisis de expresión diferencial entre los pacientes recurrentes y no recurrentes de TCGA (*DESeq2*), para determinar si los blancos validados seleccionados se encontraban aumentados o disminuidos. Se esperaba que los blancos de los microRNAs aumentados de la firma, estuvieran disminuidos y lo contrario para los blancos del microRNA disminuido. Se encontraron 29 blancos disminuidos, regulados por algunos de los microRNAs aumentados de la firma, y 53 blancos aumentados regulados por el microRNA disminuido de la firma (Tabla 11).



**Tabla 11.** Blancos validados, aumentados o disminuidos en el grupo de recurrencia vs el grupo de no recurrencia de los pacientes de TCGA. A) Blancos de los microRNAs aumentados de la firma. B) Blancos del microRNA disminuidos de la firma.

A) RNAm blanco disminuidos	B) RNAm blanco aumentados
IGF1R	DNAJB9
JUN	UBN2
NOTCH1	ARSK
ROCK2	AKAP1
LCOR	PODXL
TNRC6A	MRVI1
UBE2H	GJA5
FDXR	ORC4
PEG10	MAPK8IP3
ZBTB43	RTL8A
NAA30	HNRNPF
NCAPG2	SV2B
SLC7A11	ADAP1
ELAVL2	IL5
KIAA1671	THOC5
MAP4	CEP89
REXO1	L2HGDH
SRPK1	VAV3
MRE11	C9orf62
YWHAZ	LACTB
PTGFRN	C10orf67
IBA57	MAGI3
TNFAIP2	TIAL1
KLF10	GDE1
CAND1	KLHL40
FSCN1	ZNF551
MET	STX7
PIK3CD	MSH5
AGBL5	CEP135
	PTDSS2
	PTGIS
	INMT
	ZNF284
	PEX2
	TAF1
	SLC5A5
	HNRNPA1L2
	PRKCA
	PLEKHA8
	PCSK6
	FKBP15
	ALDH6A1
	ZNF24
	TMEM184A
	C1orf52
	RAD50
	IL7R
	CBX8
	CENPO
	GTF3C1
	PABPN1
	POLR2E
	NAA10



## **9. DISCUSIÓN**

La recurrencia es un evento común y la principal causa de las bajas tasas de supervivencia en pacientes con cáncer de cavidad oral (Leemans *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2004; Jemal, *et al.*, 2011). En la clínica se utilizan de forma rutinaria algunos factores para pronosticar la recurrencia, como son, el estadio TNM, el grado histológico y los bordes libres de enfermedad; sin embargo, su capacidad predictiva es limitada, habiendo pacientes que aun cuando no presentan ninguno de estos factores de riesgo, recurren. Por tanto, la identificación de firmas de expresión de microRNAs, representa una oportunidad para determinar posibles biomarcadores, que permitan predecir adecuadamente la recurrencia en estos pacientes y ayudar a definir la estrategia terapéutica más apropiada después de la cirugía.

El objetivo de este trabajo fue identificar una firma de expresión de microRNAs asociada a recurrencia en pacientes con cáncer de cavidad oral. Para esto, se analizaron los perfiles de expresión de microRNAs de dos cohortes distintas, pacientes del INCan y de TCGA, los cuales fueron obtenidos mediante microarreglos y RNAseq, respectivamente. Después se compararon los resultados de ambas cohortes para definir la firma.

Se estableció la firma con base en la comparación de los resultados del análisis de expresión diferencial y correlaciones, de los pacientes del INCan y de TCGA, obteniendo 8 microRNAs que están aumentados en los pacientes recurrentes vs los no recurrentes (Tabla 7) y cuyo nivel de expresión está negativamente correlacionado con el tiempo libre de recurrencia (Fig. 13), así como 1 microRNA que está disminuido en los pacientes recurrentes vs los no recurrentes (Tabla 7) y cuyo nivel de expresión está positivamente correlacionado con el tiempo libre de recurrencia (Fig. 13), esto para ambas cohortes de estudio. Esto podría indicar que los 8 microRNAs aumentados (miR-1, miR-139-5p, miR-30a-5p, miR-501-3p, miR-500a-3p, miR-551b-3p, miR-99a-3p y miR-381-5p) incrementarían el riesgo de desarrollar recurrencia, mientras que el microRNA disminuido (miR-6842-3p) podría ser protector. Para evaluar esto, se realizó un análisis univariado de regresión de Cox para cada microRNA de la firma,



encontrando que efectivamente miR-1, miR-139-5p, miR-501-3p, miR-551b-3p, miR-99a-3p y miR-381-5p, incrementan el riesgo de desarrollar recurrencia en los pacientes del INCan (HR >1, p<0.05), y que miR-139-5p, miR-30a-5p, miR-501-3p, miR-500a-3p, miR-99a-3p y miR-381-5p, incrementan el riesgo de desarrollar recurrencia en los pacientes de TCGA (HR >1, p<0.05); mientras que miR-6842-3p, funciona como microRNA protector para ambas cohortes (HR < 1, p<0.05) (Tabla 8).

Con estos datos, más el valor de expresión de cada microRNA, se calculó un score de riesgo para cada paciente, que fue utilizado para realizar curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Con esto se determinó que los pacientes de ambas cohortes de estudio con “riesgo alto” recurren de forma temprana, respecto a los pacientes con “riesgo bajo” (Fig. 14A y 14B).

Posteriormente se realizó un análisis multivariado de regresión de Cox, que permitió determinar que la firma de microRNAs es un buen factor predictor, a diferencia de otras variables clínicamente asociadas a recurrencia (Tabla 9).

Cabe puntualizar, que los microRNAs identificados en este estudio no han sido reportados en trabajos previos realizados en otros tipos de cáncer, donde se han asociado firmas de expresión de microRNAs con recurrencia (Sung-Liang, *et al.*, 2008; Santosh, *et al.*, 2010; Lu, *et al.*, 2012; Zhong-Bo, *et al.*, 2012; Pérez-Rivas, *et al.*, 2014), ni siquiera aquellos realizados directamente en pacientes con cáncer de cabeza y cuello (Childs, *et al.*, 2009; Ganci, *et al.*, 2013), ni de cavidad oral (Ganci, *et al.*, 2015, Dey Ghosh, *et al.*, 2016; Yan, *et al.*, 2017; Ries, *et al.*, 2017).

No obstante, hasta cierto punto esto era esperado, debido primeramente a que el perfil de expresión de microRNAs es altamente variable entre tejidos (Ludwig, *et al.*, 2016), y aunque sean muestras de cabeza y cuello o de cavidad oral, los subsitios anatómicos fueron variados, aunado al hecho de que en algunos casos las firmas fueron obtenidas a partir de la comparación de muestras de tejido tumoral con tejido sano, y después se hicieron asociaciones estadísticas con la recurrencia (Childs, *et al.*, 2009; Ganci, *et al.*, 2013, Ganci, *et al.*, 2015). Por tanto, los microRNAs reportados están más asociados con



carcinogénesis (como la baja expresión de let-7, o la sobre expresión de miR-21 en tumores), que directamente a recurrencia. Mientras que en este estudio, al compararse muestras de tumores de pacientes que recurrieron de forma temprana, con los tumores de pacientes que no recurrieron en periodos largos de tiempo, se eliminan gran parte de los microRNAs asociados a carcinogénesis, y se espera que los diferencialmente expresados, puedan definir mejor el fenotipo recurrente, más allá de una asociación estadística. Por otro lado, en los estudios donde se compararon los perfiles de microRNAs de pacientes que recurrieron y pacientes que no recurrieron, tal y como en este trabajo, las muestras provenían ya sea de plasma (Yan, *et al.*, 2017) o de sangre total (Ries, *et al.*, 2017), y normalmente hay baja asociación entre los microRNAs encontrados en un tumor y aquellos microRNAs circulantes; lo cual, puede ser debido, por ejemplo, a que el tumor selectivamente exporta microRNAs supresores (Triozzi, *et al.*, 2016; Qattan, *et al.*, 2017)

Como ya se ha mencionado, en la firma hay 8 microRNAs que se encuentran aumentados en los pacientes recurrentes vs los no recurrentes, los cuales incrementan el riesgo de desarrollar recurrencia, y por tanto podrían tener un rol en la agresividad del tumor. Efectivamente algunos de estos han sido previamente asociados con un peor pronóstico o un aumento de la agresividad de algunos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer de cabeza y cuello.

Por ejemplo, se ha descrito que una alta expresión de **miR-551b-3p** se asocia con un mayor riesgo de desarrollar metástasis y una menor supervivencia en pacientes con cáncer de cabeza y cuello, además de que este microRNA promueve la proliferación, la migración y la invasión in vitro, en parte debido a la regulación de GLIPR2 modulando la autofagia (Narasimha, *et al.*, 2015). En otro estudio en cáncer gástrico, se determinó que la expresión de este microRNA es mayor en tejido tumoral que en muestras de tejido sano y su expresión correlaciona con el grado de diferenciación del tumor (entre menos diferenciado, mayor expresión de este microRNA), por lo que puede ser un factor importante en el desarrollo, invasión y metástasis de este tipo de cáncer (Zhaofeng, *et al.*, 2015). Del mismo modo en un estudio realizado en cáncer de ovario se observó que este microRNA está asociado a un peor pronóstico en pacientes con este



tipo de cáncer, aunado a que participa en la resistencia a la apoptosis e incrementa la supervivencia y la proliferación de las células tumorales *in vitro* e *in vivo*, lo cual es debido, de forma interesante, a que promueve la transcripción de STAT3, en vez de disminuir los niveles de su mensajero; esto al unirse de forma complementaria a secuencias en el promotor de STAT3, lo que promueve la transcripción a través del reclutamiento de la RNAPolII y el factor de transcripción TWIST1 (Chaluvally-Raghavan, *et al.*, 2016).

Por otro lado, se ha reportado que una baja expresión de **miR-501-3p** en cáncer de páncreas correlaciona con un menor riesgo de desarrollar recurrencia, lo que sería similar a lo reportado en este estudio, donde observamos que una alta expresión de este microRNA incrementa el riesgo de desarrollar recurrencia en cáncer de cavidad oral. También se reportó que la sobreexpresión de este microRNA incrementa la invasión *in vitro*, y la metástasis *in vivo* en cáncer de páncreas (Ling, *et al.*, 2017). Además, en otro estudio se observó una mayor expresión de este microRNA en cáncer de mama triple negativo (considerado altamente agresivo), comparado con tejido sano adyacente (Chang, *et al.*, 2015).

Por su parte, se ha demostrado que **miR-500a-3p** puede tener un papel muy importante en la progresión y agresividad del cáncer de hígado. Por ejemplo, su sobreexpresión se ha asociado con un incremento en la invasión y migración de líneas celulares de cáncer de hígado (Guo, *et al.*, 2017). Asimismo, una alta expresión correlaciona con una menor supervivencia y mayor riesgo de recurrencia en pacientes con este tipo de cáncer, además de que promueve características de *cancer stem cells in vitro* al regular múltiples inhibidores de la vía de JAK/STAT3 (Jiang, *et al.*, 2017). Por último, se ha reportado que la expresión de este microRNA es significativamente mayor en pacientes que desarrollaron metástasis que en aquellos que no, y que puede promover la proliferación, migración y el crecimiento independiente de anclaje en parte debido a la activación de la vía AKT/mTOR al silenciar a PTEN (Zhao, *et al.*, 2017).

Por otro lado, de forma interesante miR-1, miR-139-5p, miR-99a-3p y miR-30a-5p han sido previamente caracterizados como supresores tumorales, lo que contrastaría con



nuestros resultados; sin embargo en algunos trabajos también se ha visto su potencial como promotores de la progresión del cáncer.

En este sentido, **miR-1** ha sido ampliamente caracterizado como un supresor en diversos tumores (Liu, *et al.*, 2017; Xu, *et al.*, 2014; Xie, *et al.*, 2018); sin embargo en algunos trabajos se ha visto su potencial rol como promotor de la progresión del cáncer. Por ejemplo, en cáncer gástrico miR-1 se asoció con una mayor incidencia de metástasis (Huang, *et al.*, 2014), mientras que en cáncer de ovario y renal se observó que incrementa la proliferación celular (Ahrend, *et al.*, 2017), además de que su expresión está incrementada en tumores recurrentes vs tumores primarios de ovario (Stope, *et al.*, 2014).

A su vez, al igual que miR-1, **miR-139-5p** también ha sido propuesto como un supresor de tumores en algunos tipos de cáncer como de esófago (Liu, *et al.*, 2013), además que se ha visto que inhibe la metástasis en cáncer de mama (Krishnan, *et al.*, 2013), y promueve su radiosensibilidad (Pajic, *et al.*, 2018). Esto podría diferir con nuestros hallazgos, no obstante, en los trabajos donde fue catalogado como supresor se realizaron comparaciones de tejido sano y tumoral, mientras que en el presente estudio fueron comparados tumores de pacientes recurrentes vs tumores de pacientes no recurrentes. En este sentido, Miyoshi y colaboradores (2017), realizaron un estudio parecido, en el que analizaron la asociación de algunos microRNAs (incluyendo miR-139-5p) con recurrencia de cáncer de colon, comparando tejido tumoral de pacientes que sufrieron o no recurrencia de la enfermedad, encontrando que la sobreexpresión de miR-139-5p correlaciona con una recurrencia temprana en los pacientes, además de que su expresión está aumentada en tumores metastásicos vs tumores primarios y su sobreexpresión incrementa la metástasis en un modelo murino de cáncer de colon (Miyoshi, *et al.*, 2017).

Por su parte, **miR-99a-3p**, se asoció a la disminución de la proliferación y un incremento en la apoptosis de líneas celulares de cáncer de pulmón, esto debido a la regulación del factor de transcripción E2F2. Además se reportó que este microRNA previene la transición epitelio-mesénquima y reprime el potencial tumorigénico de



*cancer stem cells* (Feliciano, *et al.*, 2017). Mientras que en otro estudio se reportó que la expresión de este microRNA en cáncer de hígado es baja en tumores altamente indiferenciados (más agresivos), y esta baja expresión correlaciona con una sobrevida pobre en los pacientes (Zhang, *et al.*, 2014), por tanto resulta ser un microRNA protector. Por otro lado, de forma contrastante, se vio que la sobre expresión de este microRNA está relacionada con una mayor sensibilidad a la quimioterapia en pacientes con cáncer colorectal (Molina-Pinelo, *et al.*, 2014), mientras que en otro estudio reportaron que la expresión de este microRNA está incrementada en células de cáncer de hígado resistentes a cisplatino comparada con células no resistentes (Zhang, *et al.*, 2016), por lo que este microRNA podría promover el fenotipo maligno característico de las células quimioresistentes.

En el caso de **miR-381-5p**, este también ha sido descrito como supresor y promotor tumoral. Su expresión está desregulada en distintos tipos de cáncer; por ejemplo está altamente disminuido y reprime el fenotipo maligno en cáncer de pulmón (Rothschild, *et al.*, 2012), y de ovario (Xia, *et al.*, 2016), entre otros, sugiriendo que funciona como un microRNA supresor de tumores. Sin embargo, por el contrario, en otros estudios se encontró una expresión elevada en glioma (Tang, *et al.*, 2011) y osteosarcoma (Yunchao, *et al.*, 2016), y su silenciamiento inhibe el crecimiento del glioma (Tang, *et al.*, 2011) o incrementa su sensibilidad a agentes quimioterapéuticos (Yunchao, *et al.*, 2016).

Por lo anterior, se puede concluir que el rol funcional de estos microRNAs puede variar de acuerdo a los distintos tipos de cáncer.

Por otra parte, **miR-30a-5p** a diferencia de los microRNAs anteriores, sólo ha sido descrito como supresor en otros tipos de cáncer hasta ahora, como de mama (Li, *et al.*, 2016), hígado (Huang, *et al.*, 2016), colorectal (Wei, *et al.*, 2016), estómago (Liu, *et al.*, 2017), entre otros; sin embargo, no se puede descartar su potencial como promotor de agresividad en cáncer de cavidad oral, lo cual requiere ser estudiado.



Finalmente, en la firma también se encontró un microRNA que posiblemente funciona como protector, el **miR-6842-3p**, pues disminuye el riesgo de desarrollar recurrencia en cáncer de cavidad oral; no obstante poco o nada ha sido descrito sobre el papel de este microRNA en cáncer.

Dada esta función dual que tienen algunos de estos microRNAs como oncomirs o supresormirs, aunado al hecho de que la mayoría de lo que se ha descrito de estos ha sido para otros tipos de cáncer, y que no existe información sobre miR-6842-3p en cáncer, es importante continuar profundizando en el conocimiento de su función, para determinar el papel que podrían tener en la progresión del cáncer de cavidad oral, ya sea cada uno por separado, o en su conjunto constituyendo una firma.

Por último, en la parte final de este estudio se determinaron los RNAm blanco validados previamente de los microRNAs de la firma. Posteriormente se filtraron los RNAm blanco que son regulados por 2 o más microRNAs de la firma y se realizó un análisis de expresión diferencial entre los pacientes recurrentes vs los no recurrentes de TCGA.

De los RNAm blanco encontrados disminuidos en los pacientes recurrentes, 29 son blanco de los microRNAs aumentados de la firma (Tabla 11), lo que corresponde con lo esperado, a mayor expresión del microRNA, menor expresión de su blanco. Algunos de estos blancos disminuidos han sido previamente descritos como genes que pueden suprimir el desarrollo tumoral, o que al ser abatidos incrementan el fenotipo maligno de las células, como son NOTCH1 (Zhang, *et al.*, 2016), LCOR (Jalaguier, *et al.*, 2017), TNRC6A (Kim, *et al.*, 2010), FDXR (Hwang, *et al.*, 2001) y KLF10 (Weng, *et al.*, 2017), lo que concuerda con lo previamente reportado, pues en otros estudios, los blancos de los microRNAs de las firmas asociadas a recurrencia en cáncer de cabeza y cuello corresponden a genes supresores de tumores como PTEN, P53, FOXO, WWOX, entre otros (Ganci, *et al.*, 2013; Ganci, *et al.*, 2015; Dey Ghosh, *et al.*, 2016).

No obstante, de forma interesante se observó que algunos de los RNAm disminuidos en los pacientes recurrentes han sido reportados como promotores del fenotipo maligno, como es el caso de IGF1R (Farabaugh, *et al.*, 2015), JUN (Xia, *et al.*, 2013), ROCK2



(Huang, *et al.*, 2014), PEG10 (Akamatsu, *et al.*, 2015), NAA30 (Mughal, *et al.*, 2015), NCAPG2 (Zhan, *et al.*, 2017) y MAP4 (Jiang, *et al.*, 2016), lo cual resulta un tanto contradictorio, ya que se esperaría que los tumores recurrentes tengan alta expresión de oncogenes; sin embargo esto podría deberse a que podrían no ser blancos verdaderos de estos microRNAs, y que los microRNAs no son el único método de regulación génica que utiliza la célula, y existen mecanismos de compensación celular que impedirían que hayan múltiples oncogenes expresándose al mismo tiempo.

Finalmente, dado que sólo se encontró un microRNA disminuido en la firma (miR-6842-3p), sus blancos validados se buscaron aparte. Se encontraron 85 blancos validados para este microRNA, de los cuales 53 tienen un nivel de expresión mayor en los pacientes recurrentes vs no recurrentes de TCGA (Tabla 11), lo que corresponde con lo esperado, a menor expresión del microRNA, mayor expresión de su blanco. Algunos de estos blancos aumentados han sido previamente descritos como genes que promueven el desarrollo tumoral y/o el fenotipo maligno, como por ejemplo, DNAJB9 (Lee, *et al.*, 2015), IL5 (Zaynagetdinov, *et al.*, 2015), VAV3 (Uen, *et al.*, 2015), NAA10 (Gromyko, *et al.*, 2010), e incluso, algunos de estos han sido reportados en cáncer de cavidad oral, como PODXL (Lin, *et al.*, 2014).

Esto concuerda con lo previamente reportado, pues en otros estudios, los blancos de los microRNAs disminuidos de las firmas asociadas a recurrencia en cáncer de cabeza y cuello corresponden a oncogenes como RAS, C-MYC, VEGFA, entre otros (Childs, *et al.*, 2009); sin embargo, también se esperaba que se encontraran aumentados algunos blancos que incrementan la resistencia al tratamiento (Dey Ghosh, *et al.*, 2016), pero esto no ocurrió.

Es importante continuar investigando la función que podrían tener estos blancos en el desarrollo y la progresión del cáncer de cavidad oral, así como dilucidar el efecto que tendría el sobre expresar o inhibir los microRNAs de la firma sobre ellos y sobre el fenotipo maligno de células de cáncer de cavidad oral.



Aunque los microRNAs todavía se encuentran en la fase inicial de descubrimiento como biomarcadores "ideales" en cáncer, es necesario explorar a fondo su potencial valor en el diagnóstico y pronóstico clínico de la enfermedad.

Determinar con precisión el nivel de expresión de los microRNAs en un tipo específico de célula, tejido o fluido corporal es un paso esencial hacia el establecimiento de firmas de microRNAs como biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico en la clínica. Además, el procesamiento de datos, la optimización y la estandarización de métodos analíticos, incluido el procesamiento previo, la detección y la normalización, son necesarios para minimizar las variaciones experimentales o técnicas y asegurar que los resultados, tanto positivos como negativos, sean confiables. A su vez, se deben minimizar los efectos de lote que se dan por los diferentes laboratorios para mejorar las perspectivas de la utilidad de estos en la investigación clínica. A pesar del potencial de los microRNAs como biomarcadores, algunos identificados tienen, en muchos casos, una especificidad diagnóstica y una reproducibilidad deficientes.

Los principales desafíos en el uso de firmas de microRNAs en el diagnóstico y pronóstico son el descubrimiento de microRNAs que se puedan usar consistentemente como biomarcadores "ideales" específicos y confiables en los distintos tipos de cáncer, en una amplia gama de pacientes y el desarrollo de métodos de detección simples y económicos.



## **10. CONCLUSIONES**

- ✓ No existe asociación entre los factores clínico-patológico tradicionales con la recurrencia de la enfermedad en los pacientes del INCan.
- ✓ Las cohortes de estudio (INCan y TCGA) comparten 9 microRNAs diferencialmente expresados: miR-1, miR-139-5p, miR-30a-5p, miR-501-3p, miR-500a-3p, miR-551b-3p, miR-99a-3p, miR-381-5p aumentados, y miR-6842-3p disminuido en el grupo de recurrencia vs el grupo de no recurrencia.
- ✓ Los 8 microRNAs aumentados en el grupo de recurrencia, correlacionan negativamente, y el microRNA disminuido, correlaciona positivamente con el tiempo libre de recurrencia.
- ✓ Los pacientes con un “riesgo alto” de acuerdo a la presencia de la firma de expresión de los 9 microRNAs, tienden a recurrir de forma temprana, respecto a los pacientes con “riesgo bajo”.
- ✓ La firma de expresión aumenta significativamente el riesgo de desarrollar recurrencia, independientemente de los factores clínico-patológico tradicionales en los pacientes del INCan, por lo que es un buen factor predictor.
- ✓ Los microRNAs de la firma regulan 1383 RNAm validados experimentalmente.
- ✓ Los microRNAs aumentados de la firma, comparten 54 de los blancos validados, de los cuales 29 tienen un nivel de expresión menor en los pacientes recurrentes vs no recurrentes de TCGA. Mientras que el microRNA disminuido de la firma tiene 85 blancos validados, de los cuales 53 tienen un nivel de expresión mayor en los pacientes recurrentes vs no recurrentes de TCGA.



## **11. PERSPECTIVAS**

- a) Validar los resultados del análisis de microarreglos en los pacientes del INCan mediante qRT-PCR.
- b) Determinar el nivel de expresión de los blancos de los microRNAs de la firma a nivel de RNAm y proteína en los pacientes del INCan.
- c) Analizar la función biológica de los microRNAs de la firma y de sus blancos en líneas celulares, en procesos relacionados con cáncer.



## **12. REFERENCIAS**

1. Ahrend H., A. Kaul, S. Ziegler, L. Brandenburg, U. Zimmermann, A. Mustea, M. Burchardt, P. Ziegler, M. B. Stope. 2017. **MicroRNA-1 and MicroRNA-21 Individually Regulate Cellular Growth of Non-malignant and Malignant Renal Cells.** *In vivo.* 31(4): 625–630.
2. Akamatsu S., A. W. Wyatt, D. Lin, S. Lysakowski, F. Zhang, S. Kim, C. Tse, K. Wang, F. Mo, A. Haegert, S. Brahmhatt, R. Bell, H. Adomat, Y. Kawai, H. Xue, X. Dong, L. Fazli, H. Tsai, T. L. Lotan, M. Kossai, J. M. Mosquera. 2015. **The Placental Gene PEG10 Promotes Progression of Neuroendocrine Prostate Cancer.** *Cell Rep.* 12(6):922-36.
3. Ambros V. 2004. **The functions of animal microRNAs.** *Nature.* 431(7006):350-5.
4. American Society of Clinical Oncology (ASCO). 2016. <https://www.asco.org> (Consultado Abril de 2016).
5. American Cancer Society (ACS). 2016. **Cancer Facts & Figures.** Atlanta: American Cancer Society.
6. American Cancer Society (ACS). 2013. **Living With Uncertainty: The Fear of Cancer Recurrence.** Atlanta: American Cancer Society.
7. Avissar, M., B. C. Christensen, K. T. Kelsey, C. J. Marsit, C.J. 2009 **microRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma.** *Clin. Cancer Res.* 15: 2850–2855.
8. Bartel D. P. 2004. **MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function.** *Cell.* 116(2):281-97.
9. Bartel D. P. 2009. **MicroRNAs: target recognition and regulatory functions.** *Cell.* 136(2):215-33.
10. Borchert G. M., W. Lanier, B. L. Davidson. 2006. **RNA polymerase III transcribes human microRNAs.** *Nat Struct Mol Biol.* 13(12):1097-101.
11. Bott A., Erdem N., Lerrer S., Hotz-Wagenblatt A., Breunig C., Abnaof K., Wörner A., Wilhelm H., Münstermann E., Ben-Baruch A., Wiemann S. 2017. **microRNA-1246 induces pro-inflammatory responses in mesenchymal stem/stromal cells by regulating PKA and PP2A.** *Oncotarget.* 1-18.
12. Cai X., C. H. Hagedorn, B. R. Cullen. 2004. **Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs.** *RNA.* 10(12):1957-66.



13. Cao, P., L. Zhou, J. Zhang, F. Zheng, H. Wang, D. Ma, J. Tian. 2013. **Comprehensive expression profiling of microRNAs in laryngeal squamous cell carcinoma.** *Head and Neck.* 35: 720–728.
14. Carvalho, L. A., Nobuko, N. I., Califano, J. A., Kowalski L. P. 2004. **Trends in incidence and prognosis for head and neck cancer in the United States: A site-specific analysis of the SEER database.** *Int Jour of Can.* 114: 806-816.
15. Castellsagué X., L. Alemany, M. Quer, G. Halc, B. Quirós, S. Tous, O. Clavero, L. Alòs, T. Biegner, T. Szafarowski, M. Alejo, D. Holzinger, E. Cadena, E. Claros, G. Hall, J. Laco, M. Poljak, M. Benevolo, E. Kasamatsu, H. Mehanna, C. Ndiaye, N. Guimerà, B. Lloveras, X. León, J. C. Ruiz-Cabezas, I. Alvarado-Cabrero, C. S. Kang, J. K. Oh, M. Garcia-Rojo, E. Iljazovic, O. F. Ajayi, F. Duarte, A. Nessa, L. Tinoco, M. A. Duran-Padilla, E. C. Pirog, H. Viarheichyk, H. Morales, V. Costes, A. Félix, M. J V. Germar, M. Mena, A. Ruacan, A. Jain, R. Mehrotra, M. T. Goodman, L. E. Lombardi, A. Ferrera, S. Malami, E. I. Albanesi, P. Dabed, C. Molina, R. López-Revilla, V. Mandys, M. E. González, J. Velasco, I. G. Bravo, W. Quint, M. Pawlita, N. Muñoz, S. Sanjosé, F. X. Bosch. 2016. **HPV Involvement in Head and Neck Cancers: Comprehensive Assessment of Biomarkers in 3680 Patients.** *JNCI J Natl Cancer Inst.* 108(6): 1-12.
16. Cervigne N. K., P. P. Reis, J. Machado, B. Sadikovic, G. Bradley, N. N. Galloni, M. Pintilie, I. Jurisica, B. Perez-Ordóñez, P. Gilbert. 2009. **Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma.** *Hum. Mol. Genet.* 18: 4818–4829.
17. Chaluvally-Raghavan P., K. J. Jeong, S. Pradeep, A. Machado, S. Yu, W. Liu, T. Moss, C. Rodriguez-Aguayo, D. Zhang, P. Ram, J. Liu, Y. Lu, G. Lopez-Berestein, G. A. Calin, A. K. Sood, G. B. Mills. 2016. **Direct upregulation of STAT3 by microRNA-551b-3p deregulates growth and metastasis of ovarian cancer.** *Cell Rep.* 15(7): 1493–1504.
18. Chang, S.S., W. Jiang, I. Smith, L. M. Poeta, S. Begum, C. Glazer, S. Shan, W. Westra, D. Sidransky, J. A. 2008. **microRNA alterations in head and neck squamous cell carcinoma.** *Int. J. Cancer.* 123: 2791–2797.
19. Chang Y.Y., K. Wen-Hung, J. H. Hung, C. Y. Lee, Y. H. Lee, Y. C. Chang, W. C. Lin, C. Y. Shen, C. S. Huang, F. J. Hsieh, L. C. Lai, M. H. Tsai, K. J. Chang, E. Y. Chuang. 2015. **Deregulated microRNAs in triple-negative breast cancer revealed by deep sequencing.** *Mol Cancer.* 14:36.
20. Chaturvedi A. K, E. A. Engels, R. M. Pfeiffer, B. Y. Hernandez, W. Xiao, E. Kim, B. Jiang, M. T. Goodman, M. Sibug-Saber, W. Cozen, L. Liu, C. F. Lynch, N. Wentzensen, R. C. Jordan, S. Altekruse, W. F. Anderson, P. S. Rosenberg, M. L. Gillison. 2011. **Human papillomavirus and rising oropharyngeal cancer incidence in the United States.** *J Clin Oncol.* 29(32):4294-301.



21. Cheerla N., O. Gevaert. 2017. **MicroRNA based Pan-Cancer Diagnosis and Treatment Recommendation.** *BMC Bioinf.* 18: 32.
22. Childs G., M. Fazzari, G. Kung, N. Kawachi, M. Brandwein-Gensler, M. McLemore, Q. Chen, R.D. Burk, R. V. Smith, M. B. Prystowsky, T. J. Belbin, N. F. Schlecht. 2009. **Low-Level Expression of MicroRNAs let-7d and miR-205 Are Prognostic Markers of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma.** *The Amer Jour of Path.* 174 (3): 736-745.
23. Citron F.m J. Armenia, G. Franchin, J. Polesel, R. Talamini, S. D'Andrea, S. Sulfaro, C. M. Croce, W. Klement, D. Otasek, C. Pastrello, T. Tokar, I. Jurisica, D. French, R. Bomben E. Vaccher, D. Serraino, B. Belletti, A. Vecchione, L. Barzan, G. Baldassarre. 2017. **An Integrated Approach Identifies Mediators of Local Recurrence in Head and Neck Squamous Carcinoma.** *Clin Can Res.* 23: 3769-3780.
24. Courthod G., P. Franco, L. Palermo, S. Pisconti, G. Numico. 2014. **The Role of microRNA in Head and Neck Cancer: Current Knowledge and Perspectives.** *Molecules.* 19: 5704-5716.
25. Cuiffo B. G. y A. E. Karnoub . 2015. **Silencing FOXP2 in breast cancer cells promotes cancer stem cell traits and metastasis.** *Mol Cell Oncol.* 3:3, e1019022.
26. Dey Ghosh, R., S. Ghuwalewala, P. Das, S. Mandlo, S. A. Kayum, J. Chakraborty, S. Sarkar, S. Chakrabarti, C. Kumar, S. Roychoudhury. 2016. **MicroRNA profiling of cisplatin resistant oral squamous cell carcinoma cell lines enriched with cancer-stem-cell-like and epithelial-mesenchymal transition-type features.** *Scie Rep.* 6: 1 - 15.
27. Doorbar J., N. Egawa, H. Griffin, C. Kranjec, I. Murakami. 2015. **Human papillomavirus molecular biology and disease association.** *Rev Med Vir.* 25:2-23.
28. Dvinge H., A. Git, S. Gräf, M. Salmon-Divon, C. Curtis, A. Sottoriva, Y. Zhao, M. Hirst, J. Armisen, E. A. Miska, S. Chin, E. Provenzano, G. Turashvili, A. Green, I. Ellis, S. Aparicio, C. Caldas. 2013. **The shaping and functional consequences of the microRNA landscape in breast cancer.** *Nature.* 497:378-382.
29. Esquela-Kerscher A. y F. J. Slack. 2006. **Oncomirs - microRNAs with a role in cancer.** *Nat Rev Cancer.* 6(4):259-69.
30. Fabbri M. 2014. Chapter 1 **Introduction.** Fabbri M. (Ed.). *Non-coding RNAs and Cancer.* Springer. New York. 284p.
31. Farabaugh S. M., D. N. Boone, A. V. Lee. 2015. **Role of IGF1R in Breast Cancer Subtypes, Stemness, and Lineage Differentiation.** *Front Endocrinol.* 6:59.



32. Feliciano A., Y. Garcia-Mayea, L. Jubierre, C. Mir, M. Hummel, J. Castellvi, J. Hernández-Losa, R. Paciucci, I. Sansano, Y. Sun, S. Ramón Y Cajal, H. Kondon, A. Soriano, M. Segura, A. Lyakhovich, M. E. Leonart. 2017. **miR-99a reveals two novel oncogenic proteins E2F2 and EMR2 and represses stemness in lung cancer.** *Cell Death Dis.* 8(10):e3141.
33. Flatmark K., E. Høy, B. Fromm. 2016. **microRNAs as cancer biomarkers.** *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 245:S80-3.
34. Friedman R. C., K. K. Farh, C. B. Burge, D. P. Bartel. 2009. **Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs.** *Genome Res.* 19(1):92-105.
35. Ganci F., A. Sacconi, N. B. Ben-Moshe, V. Manciocco, I. Sperduti, L. Strigaris, R. Covello, M. Benevolo, E. Pescarmona, E. Domany, P. Muti, S. Strano, G. Spriano, G. Fontemaggi, G. Blandino. 2013. **Expression of TP53 mutation-associated microRNAs predicts clinical outcome in head and neck squamous cell carcinoma patients.** *Ann of Onc.* 24: 3082–3088.
36. Ganci F., A. Sacconi, V. Manciocco, I. Sperduti, P. Battaglia, R. Covello, P. Muti, S. Strano, G. Spriano, G. Fontemaggi, G. Blandino. 2015. **MicroRNA expression as predictor of local recurrence risk in oral squamous cell carcinoma.** *Head & Neck.* 38: 189-197.
37. Garg A., P. Chaturvedi, P. C. Gupta 2014. **A review of the systemic adverse effects of areca nut or betel nut.** *Indian J Med Paediatr Oncol.* 35: 3-9.
38. Garofalo M. y C. M. Croce. 2013. **MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance.** *Drug Resist Updat.* 16:1-28.
39. Gillison ML1, G. D'Souza, W. Westra, E. Sugar, W. Xiao, S. Begum, R. Viscidi R. 2008. **Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers.** *J Natl Cancer Inst.* 100(6):407-20.
40. González-García R., L. Naval-Gías, L. Román-Romero, J. Sastre-Pérez, F. J. Rodríguez-Campo. 2009. **Local recurrences and second primary tumors from squamous cell carcinoma of the oral cavity: A retrospective analytic study of 500 patients.** *Head & Neck.* 31:1168–1180.
41. Gregory R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch, R. Shiekhattar. 2005. **Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing.** *Cell.* 123(4):631-40.
42. Griffiths-Jones S., K. S. Harpreet, S. van Dongen, A. J. Enright. 2008. **miRBase: tools for microRNA genomics.** *Nucleic Acids Res.* D154–D158.



43. Gromyko D., T. Arnesen, A. Rynningen, J. E. Varhaug, J. R. Lillehaug. 2010. **Depletion of the human N $\alpha$ -terminal acetyltransferase A induces p53-dependent apoptosis and p53-independent growth inhibition.** *Int J Cancer*. 127(12):2777-89.
44. Guo Y., L. Chen, C. Sun, C. Yu. 2017. **MicroRNA-500a promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway.** *Biomed Pharmacother*. 91:13-20.
45. Guo Z., M. Maki, R. Ding, Y. Yang, B. Zhang, L. Xiong. 2014. **Genome-wide survey of tissue-specific microRNA and transcription factor regulatory networks in 12 tissues.** *Sci Rep*. 4: 5150.
46. Haase A. D., L. Jaskiewicz, H. Zhang, S. Lainé, R. Sack, A. Gatignol, W. Filipowicz. 2005. **TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing.** *EMBO Rep*. 6(10):961-7.
47. Hajjari M., Salavaty A., Crea F., Kee Shin Y. 2016. **The potential role of PHF6 as an oncogene: a genotranscriptomic/proteomic meta-analysis.** *Tumour Biol*. 37:5317-25.
48. Hanahan D. y R. A. Weinberg. 2011. **Hallmarks of cancer: The next generation.** *Cell*. 144: 646-674.
49. Hanks T. y K. Gauss 2012. **Pleomorphic adenoma gene-like 2 regulates expression of the p53 family member, p73, and induces cell cycle block and apoptosis in human promonocytic U937 cells.** *Apoptosis*. 17: 236-247.
50. Hayes J., P. P. Peruzzi, S. Lawler. 2014. **MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy.** *Trends in Mol Med*. 20 (8): 460-469.
51. Hong C. F., S. Y. Lin, Y. T. Chou., C. W. Wu. 2016. **MicroRNA-7 Compromises p53 Protein-dependent Apoptosis by Controlling the Expression of the Chromatin Remodeling Factor SMARCD1.** *JBC*. 291, 1877-1889.
52. Huang D., H. Wang, H. Liu, H. Li, S. Ge, M. Bai, T. Deng, G. Yao, Y. Ba. 2014. **miRNA27a is a biomarker for predicting chemosensitivity and prognosis in metastatic or recurrent gastric cancer.** *J Cell Biochem*. 115:549-556.
53. Huang D., X. Du, R. Yuan, L. Chen, T. Liu, C. Wen, M. Huang, M. Li, L. Hao, J. Shao. 2014. **Rock2 promotes the invasion and metastasis of hepatocellular carcinoma by modifying MMP2 ubiquitination and degradation.** *Biochem Biophys Res Commun*. 453(1):49-56.



54. Huang W. T., Z. Chen, R. He, Y. Wu, S. Yin, X. Liang, G. Chen, H. Yang, Z. Peng, L. Yang. 2016. **Clinicopathological role of miR-30a-5p in hepatocellular carcinoma tissues and prediction of its function with bioinformatics analysis.** *Onco Targets Ther.* 9: 5061–5071.
55. Hui A.B.Y., M. Lenarduzzi, T. Krushel, L. Waldron, M. Pintilie, W. Shi, B. Perez-Ordonez, I. Jurisica, B. O'sullivan, J. Waldrom. 2009. **Comprehensive microRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas.** *Clin. Cancer Res.* 16:1129–1139.
56. Hummel R., Hussey D. J., J. Haier. 2010. **MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types.** *Eur J Cancer.* 46(2):298-311
57. Huntzinger E. y E. Izaurralde 2011. **Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay.** *Nat Rev Genet.* 12: 99–110.
58. Huo D., W. M. Clayton, T. F. Yoshimatsu, J. Chen, O. I. Olopade. 2016. **Identification of a circulating MicroRNA signature to distinguish recurrence in breast cancer patients.** *Oncotarget.* 7(34): 55231–55248.
59. Hutvagner G., P. D. Zamore. 2002. **A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex.** *Science.* 297(5589):2056-60.
60. Hwang P. M., F. Bunz, J. Yu, C. Rago, T. A. Chan, M. P. Murphy, G. F. Kelso, R. A. Smith, K. W. Kinzler, B. Vogelstein. 2001. **Ferredoxin reductase affects p53-dependent, 5-fluorouracil-induced apoptosis in colorectal cancer cells.** *Nat Med.* 7(10):1111-7.
61. IARC. 2012. Globocan 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. <http://globocan.iarc.fr> (Consultado Abril de 2016).
62. Jalaguier S., C. Teyssier, N. Achour , A. Lucas, S. Bonnet, C. Rodriguez, N. Elarouci, M. Lapierre , V. Cavallès. 2017. **Complex regulation of LCoR signaling in breast cancer cells.** *Oncogene.* 36(33):4790-4801.
63. Jemal A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward, D. Forman. 2011. **Global cancer statistics.** *Cancer J Clin.* 61:69–90.
64. Jiang C., J. Long, B. Liu, M. Xu, W. Wang, X. Xie, X. Wang, M. Kuang. 2017. **miR-500a-3p promotes cancer stem cells properties via STAT3 pathway in human hepatocellular carcinoma.** *J Exp Clin Cancer Res.* 36(1):99.
65. Jiang Y. Y., L. Shang, Z. Z. Shi, T. T. Zhang, S. Ma, C. C. Lu, Y. Zhang, J. J. Hao, C. Shi, F. Shi, X. Xu, Y. Cai, X. M. Jia, Q. M. Zhan, M. R. Wang. 2016. **Microtubule-associated protein 4 is an important regulator of cell invasion/migration and a potential**



- therapeutic target in esophageal squamous cell carcinoma.** *Oncogene*. 35(37):4846-56.
66. Jinlong Y., G. Park, J. Eun, J. Young, T. H. Kim, Y. J. Kim, S. H. Lee, H. Yoo, J. H. Kim, J. Bae. 2014. **CPEB1 modulates differentiation of glioma stem cells via downregulation of HES1 and SIRT1 expression.** *Oncotarget*. 5: 6756-6769.
67. Keck M., Z. Zuo, A. Khattri, T. P. Striker, C. D. Brown, M. Imanguli, D. Rieke, K. Endhardt, P. Fang, J. Bragelmann, R. DeBoer, M. El-Dinali, S. Aktolga, Z. Lei, P. Tan, S. G. Rozen, R. Salgia, R. R. Weichselbaum, M. W. Lingen, M. D. Story, K. K. Ang, E. E. W. Cohen, K. P. White, E. E. Vokes, T. Y. Seiwert. 2015. **Integrative Analysis of Head and Neck Cancer Identifies Two Biologically Distinct HPV and Three Non-HPV Subtypes.** *Clin Can Res*. 21(4): 870-881.
68. Kim M. S., J. E. Oh, Y. R. Kim, S. W. Park, M. R. Kang, S. S. Kim, C. H. Ahn, N. J. Yoo, S. H. Lee. 2010. **Somatic mutations and losses of expression of microRNA regulation-related genes AGO2 and TNRC6A in gastric and colorectal cancers.** *J Pathol*. 221(2):139-46.
69. Kim T. M., W. Huang, R. Park, P. J. Park, M. D. Johnson. 2011. **A developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by MicroRNAs.** *Cancer Res*. 71(9):3387-99.
70. Krishnan K., A. L. Steptoe, H. C. Martin, D. R. Pattabiraman, K. Nones, N. Waddell, M. Mariasegaram, P. T. Simpson, S. R. Lakhani, A. Vlassov, S. M. Grimmond, N. Cloonan. 2013. **miR-139-5p is a regulator of metastatic pathways in breast cancer.** *RNA*. 19(12):1767-80.
71. Lajer C. B., C. Nielsen, L. Friis-Hansen, B. Norrild, R. Borup, E. Garnaes, M. Rossing, L. Specht, M. H. Therkildsen, B. Nauntofte. 2011. **Different microRNA signatures of oral and pharyngeal squamous cell carcinomas: A prospective translational study.** *Br. J. Cancer*. 104: 830-840.
72. Landgraf P., M. Rusu, R. Sheridan, A. Sewer, N. Iovino, A. Aravin, S. Pfeffer, A. Rice, A. O. Kamphorst, M. Landthaler, C. Lin, N. D. Socci, L. Hermida, V. Fulci, S. Chiaretti, R. Foà, J. Schliwka, U. Fuchs, A. Novosel, R. U. Müller, B. Schermer, U. Bissels, J. Inman, Q. Phan, M. Chien, D. B. Weir, R. Choksi, G. De Vita, D. Frezzetti, H. I. Trompeter, V. Hornung, G. Teng, G. Hartmann, M. Palkovits, R. Di Lauro, P. Wernet, G. Macino, C. E. Rogler, J. W. Nagle, J. Ju, F. N. Papavasiliou, T. Benzing, P. Lichter, W. Tam, M. J. Brownstein, A. Bosio, A. Borkhardt, J. J. Russo, C. Sander, M. Zavolan, T. Tuschl. 2007. **A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing.** *Cell*. 129(7):1401-14.
73. Lee H. J., J. M. Kim, K. H. Kim, J. I. Heo, S. J. Kwak, J. A. Han. 2015. **Genotoxic stress/p53-induced DNAJB9 inhibits the pro-apoptotic function of p53.** *Cell Death Differ*. 22(1): 86-95.



74. Lee R. C., R. L. Feinbaum, V. Ambros.1993. **The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14.** *Cell*. 75(5):843-54.
75. Lee Y., I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh, V. N. Kim. 2006. **The role of PACT in the RNA silencing pathway.** *Embo J*. 25(3):522-32.
76. Lee Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim, V. N. Kim. 2003. **The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing.** *Nature*. 425(6956):415-9.
77. Lee Y., M. Kim, J. Han, K. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, V. N. Kim. 2004. **MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II.** *EMBO J*. 23(20): 4051–4060.
78. Leemans C. R., J. Boudewijn, M. Braakhuis, R. H. Brakenhoff. 2011. **The molecular biology of head and neck cancer.** *Nat Revs Can*. 11: 9-22.
79. Leemans C. R., R. Tiwari, J. J. Nauta, I. Van der Waal, G. B. Snow. 1994. **Recurrence at the primary site in head and neck cancer and the significance of neck lymph node metastases as a prognostic factor.** *Cancer*. 73 (1) :187-190.
80. Li W., C. Liu, C. Zhao, L. Zhai, S. Lu. 2016. **Downregulation of  $\beta 3$  integrin by miR-30a-5p modulates cell adhesion and invasion by interrupting Erk/Ets-1 network in triple-negative breast cancer.** *Int J Oncol*. 48(3):1155-64.
81. Lin C. W., M. S. Sun, H. C. Wu. 2014. **Podocalyxin-like 1 is associated with tumor aggressiveness and metastatic gene expression in human oral squamous cell carcinoma.** *Int J Oncol*. 45(2):710-8.
82. Lin S. y R. I. Gregory. 2015. **MicroRNA biogenesis pathways in cancer.** *Nat Revs Can*. 15: 321-333.
83. Ling Q., X. Xu, P. Ye, H. Xie, F. Gao, Q. Hu, Z. Liu, X. Wei, C. Röder, A. Trauzold, H. Kalthoff, S. Zheng. 2017. **The prognostic relevance of primary tumor location in patients undergoing resection for pancreatic ductal adenocarcinoma.** *Oncotarget*. 8(9):15159-15167.
84. Liu C., S. Zhang, Q. Wang, X. Zhang. 2017. **Tumor suppressor miR-1 inhibits tumor growth and metastasis by simultaneously targeting multiple genes.** *Oncotarget*. 8(26):42043-42060.
85. Liu J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor, G. J. Hannon. 2004. **Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi.** *Science*. 305(5689):1437-41.



86. Liu R, M. Yang, Y. Meng, J. Liao, J. Sheng, Y. Pu, L. Yin, S. J. Kim. 2013. **Tumor-suppressive function of miR-139-5p in esophageal squamous cell carcinoma.** *Plos one.* 8(10):e77068.
87. Liu X., Q. Ji, C. Zhang, X. Liu, Y. Liu, N. Liu, H. Sui, L. Zhou, S. Wang, Q. Li. 2017. **miR-30a acts as a tumor suppressor by double-targeting COX-2 and BCL9 in H. pylori gastric cancer models.** *Sci Rep.* 7: 7113.
88. Liu Y., Z. Liu, M. Liu, L. Zhang. 2016. **Profiling of MicroRNA Expression in Head and Neck Cancer.** *MOJ Cell Science & Report.* 3(2): 53-59.
89. Liyasova M., K. Ma, S. Lipkowitz. 2015. **Molecular Pathways: Cbl Proteins in Tumorigenesis and Antitumor Immunity—Opportunities for Cancer Treatment.** *Clin Can Res.* 21: 1789-1794.
90. Lu J., G. Getz, E. Miska, E. Alzarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. Ebert, R. Mak, A. Ferrando, J. Downing, T. Jacks, R. Horvitz, T. Golub. 2005. **MicroRNA expression profiles classify human cancers.** *Nature.* 435: 834-838.
91. Lu Y., R. Govindan, L. Wang, P. Y. Liu, B. Goodgame, W. Wen, A. Sezhiyan, J. Pfeifer, Y. F. Li, X. Hua, Y. Wang, P. Yang, M. You. 2012. **MicroRNA profiling and prediction of recurrence/relapse-free survival in stage I lung cancer.** *Carcinogenesis.* 33(5):1046-1054.
92. Ludwig N., P. Leidinger, K. Becker, C. Backes, T. Fehlmann, C. Pallasch, S. Rheinheimer, B. Meder, C. Stähler, E. Meese, A. Keller. 2016. **Distribution of miRNA expression across human tissues.** *Nucleic Acids Res.* 44(8): 3865–3877.
93. MacRae I. J., E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson, J. A. Doudna. 2008. **In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex.** *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(2):512-7.
94. Meister G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng, T. Tuschl. 2004. **Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs.** *Mol Cell.* 15(2):185-97.
95. Melo C. A. y S. A. Melo. 2014. Chapter 2 **Biogenesis and Physiology of MicroRNAs.** Fabbri M. (Ed.). *Non-coding RNAs and Cancer.* Springer. New York. 284p.
96. Minju H. y V. N. Kim. 2014. **Regulation of microRNA biogenesis.** *Nat Revs Mol Cell Biol.* 15: 509–524.
97. miRBase 20. 2014. <http://www.mirbase.org/index.shtml> (Consultado Abril de 2016).
98. Mirghani H., N. Ugolin, C. Ory, M. Goislard, M. Lefevre, S. Baulande, P. Hofman, J. Lacau, S. Guily, S. Chevillard, R. Lacave. 2016. **Comparative analysis of micro-**



- RNAs in human papillomavirus-positive versus -negative oropharyngeal cancers.** *Head & Neck.* 38:1634-1642.
99. Miyoshi J., S. Toden, K. Yoshida, Y. Toiyama, S. R. Alberts, M. Kusunoki, F. A. Sinicrope, A. Goel. 2017. **MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer.** *Sci Rep.* 7:43393
100. Mizutani A., T. Furukawa, Y. Adachi, S. Ikehara, S. Taketani. 2002. **A Zinc-finger Protein, PLAGL2, Induces the Expression of a Proapoptotic Protein Nip3, Leading to Cellular Apoptosis.** *JBC.* 277: 15851-15858.
101. Molina-Pinelo S., A. Carnero, F. Rivera, P. Estevez-Garcia, J. M. Bozada, M. L. Limon, M. Benavent, J. Gomez, M. D. Pastor, M. Chaves, R. Suarez, L. Paz-Ares, F. de la Portilla, A. Carranza-Carranza, I. Sevilla, L. Vicioso, R. Garcia-Carbonero. 2014. **MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer.** *BMC Cancer.* 14:656.
102. Mordente A., E. Meucci, G. Ettore, Silvestrini A. 2015. **Cancer Biomarkers Discovery and Validation: State of the Art, Problems and Future Perspectives.** En: Scatena R. (Ed.), *Advances in Cancer Biomarkers. From biochemistry to clinic for a critical revision.* Londres, Inglaterra. Editorial Springer. 372 p.
103. Mughal A. A., Z. Grieg, H. Skjellegrind, A. Fayzullin, M. Lamkhannat, M. Joel, M. S. Ahmed, W. Murrell, E. O. Vik-Mo, I. A. Langmoen, B. Stangeland. 2015. **Knockdown of NAT12/NAA30 reduces tumorigenic features of glioblastoma-initiating cells.** *Mol Cancer.* 14:160
104. Nagaoka K., K. Fujii, H. Zhang, K. Usuda, G. Watanabe, M. Ivshina, J. D. Richter. 2016. **CPEB1 mediates epithelial-to-mesenchyme transition and breast cancer metastasis.** *Oncogene.* 35:2893-2901.
105. Narasimha K., D. Liang-Hao, H. Tae, H. Tang, M. Story. 2015. **miR-551a and miR-551b-3p target GLIPR2 and promote tumor growth in High-Risk Head and Neck Cancer by modulating autophagy.** *bioRxiv* doi: <http://dx.doi.org/10.1101/019406>.
106. National Cancer Institute (NCI). 2016. <http://www.cancer.gov/> (Consultado Abril de 2016).
107. National Center for Biotechnology Information (NCBI). 2017. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1389> (Consultado mayo de 2017).
108. Neerincx M., D. L. Sie, M. A. Van de Wiel, N. C. Van Grieken, J. D. Burggraaf, H. Dekker, P. P. Eijk, B. Ylstra, C. Verhoef, G. A. Meijer, T. E. Buffart, H. M. Verheul. 2015. **MiR expression profiles of paired primary colorectal cancer and metastases by next-generation sequencing.** *Oncogenesis.* 4:e170: 1-9.



109. Pajic M., D. Froio, S. Daly, L. Doculara, E. Millar, P. H. Graham, A. Drury, A. Steinmann, C. E. de Bock, A. Boulghourjian, A. Zaratian, S. Carroll, J. Toohey, S. A. O'Toole, A. L. Harris, F. M. Buffa, H. E. Gee, G. E. Hollway, T. J. Molloy. 2018. **miR-139-5p Modulates Radiotherapy Resistance in Breast Cancer by Repressing Multiple Gene Networks of DNA Repair and ROS Defense.** *Cancer Res.* 78(2):501-515.
110. Pérez-Rivas L. G., J. M. Jerez, R. Carmona, V. de Luque, L. Vicioso, M. G. Claros, E. Viguera, B. Pajares, A. Sánchez, N. Ribelles, E. Alba, J. Lozano. 2014. **A microRNA signature associated with early recurrence in breast cancer.** *Plos One.* 9(3): e91884.
111. Philip D., V. Noronha, A. Joshi, V. Patil, A. Ramaswamy, A. Chougule, K. Prabhash. 2017. **Molecular Biology of Head and Neck Cancers.** *Jour of Head & Neck Phys and Surg.* 4: 16-22.
112. Pichler M. y G. A. Calin. 2015. **MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to their clinical application in patients.** *Br J Cancer.* 113:569-73.
113. Pillai R. S., C. G. Artus, W. Filipowicz. 2004. **Tethering of human Ago proteins to mRNA mimics the miRNA-mediated repression of protein synthesis.** *RNA.* 10(10):1518-25.
114. Qattan A, H. Intabli, W. Alkhayal, C. Eltabache, T. Tweigieri, S. B. Amer. 2017. **Robust expression of tumor suppressor miRNA's let-7 and miR-195 detected in plasma of Saudi female breast cancer patients.** *BMC Cancer.* 17(1):799.
115. Ramdas, L., U. Giri, C. L. Ashorn, K. R. Coombes, A. El-Naggar, K. K. Ang, M. D. Story. 2009. **microRNA expression profiles in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent normal tissue.** *Head & Neck.* 31: 642-654.
116. Rhodus N. L., A. R. Kerr, K. Patel. 2014. **Oral cancer: leukoplakia, premalignancy, and squamous cell carcinoma.** *Dent Clin North Am.* 58(2):315-340.
117. Ries J., C. Baran, F. Wehrhan, M. Weber, F. W. Neukam, A. Krautheim-Zenk, E. Nkenke. 2017. **Prognostic significance of altered miRNA expression in whole blood of OSCC patients.** *Oncol Rep.* 37(6):3467-3474.
118. Ritchie M.E., B. Phipson, D. Wu, Y. Hu, C. W. Law, W. Shi, G. K. Smyth. 2015. **Limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies.** *Nuc Ac Res.* 43(7), pp. e47.
119. Rothschild S. I., M. P. Tschan, R. Jaggi, M. F. Fey, M. Gugger, O. Gautschi. 2012. **MicroRNA-381 represses ID1 and is deregulated in lung adenocarcinoma.** *J Thorac Oncol.* 7(7):1069-77.



120. Santosh K. P, E. Kannisto, S. Knudsen, S. Yendamuri. 2010. **Evaluation of MicroRNA Expression Profiles That May Predict Recurrence of Localized Stage I Non-Small Cell Lung Cancer after Surgical Resection.** *Cancer Res.* 70: 36-45.
121. Scapoli L., A. Palmieri, L. Muzio, F. Pezzetti, C. Rubini, A. Girardi, F. Farinella, M. Mazzotta, F. Carinci. 2010. **MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression.** *Int J Immunopathol Pharmacol.* 23(4):1229-34.
122. Stope M.B, S. Delogu, K. Diesing, G. Klinkmann, M. Evert, D. Koensgen, M. Zygmunt, M. Burchardt, A. Mustea. 2014. **Expression pattern of the microRNA miR-1 in ovarian cancer cell lines and tumor tissue samples implies a loss of miR-1's tumor-suppressor properties.** *RNA Dis.* 1:1-6.
123. Sung-Liang Y., C. Hsuan-Yu, C. Gee-Chen, C. Chih-Yi, C. Huei-Wen, S. Sher, C. Chiou-Ling, Y. Chong-Jen, L. Yung-Chie, C. Han-Shiang, S. Te-Jen, C. Ching-Cheng, L. Han-Ni, H. Qi-Sheng, S. Hsin-Yuan, C. Chun-Chieh, C. Wan-Jiun, L. Chun-Chi, C. Wing-Kai, J. C. Wei, L. Ker-Chau, J.W. C. Jeremy, Y. Pan-Chyr. 2008. **MicroRNA Signature Predicts Survival and Relapse in Lung Cancer.** *Cell.* 13: 48-57.
124. Suh, Y., I. Amelio, T. U. Guerrero, M. Tavassoli. 2014. **Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer.** *Cell Dea and Dis.* 5: 1-12.
125. Tang H., X. Liu, Z. Wang, X. She, X. Zeng, M. Deng, Q. Liao, X. Guo, R. Wang, X. Li, F. Zeng, M. Wu, G. Li. 2011. **Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth.** *Brain Res.* 1390:21-32.
126. Tian T., J. Wang, X. Zhou. 2015. **A review: microRNA detection methods.** *Org Biomol Chem.* 13(8):2226-38.
127. The Cancer Genome Atlas Network (TCGA). 2015. **Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas.** *Nature.* 517(7536): 576-582.
128. Triozzi P. L., S. Achberger, W. Aldrich, J. W. Crabb, Y. Sauntharajah, A. D. Singh. 2016. Association of tumor and plasma microRNA expression with tumor monosomy-3 in patients with uveal melanoma. *Clin Epigenetics.* 8: 80.
129. Uen Y. H., C. L. Fang, Y. C. Hseu, P. C. Shen, H. L. Yang, K. S. Wen, S. T. Hung, L. H. Wang, K. Y. Lin. 2015. **VAV3 oncogene expression in colorectal cancer: clinical aspects and functional characterization.** *Sci Rep.* 5:9360.
130. Villa A., C. Villa, S. Abati. 2011. **Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians.** *Aus Den Jour.* 56:253-256.
131. Wang J., J. Chen, S. Sen. 2016. **MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics.** *J Cell Physiol.* 231(1):25-30.



132. Wang, Z., Y. Li, A. Ahmad, A. Szmi, Kong, D., S. Banerjee, F. H. Sarkar. 2010. **Targeting microRNAs involved in cancer stem cell and EMT regulation: an emerging concept in overcoming drug resistance.** *Drug Resist Updat.* 13:109-118.
133. Wei W., Y. Yang, J. Cai, K. Cui, R. Li X., H. Wang, X. Shang, D. Wei. 2016. **MiR-30a-5p Suppresses Tumor Metastasis of Human Colorectal Cancer by Targeting ITGB3.** *Cell Physiol Biochem.* 39(3):1165-76.
134. Weng C. C., J. R. Hawse, M. Subramaniam, V. H. S. Chang, W. C. Y. Yu, W. C. Hung, L. T. Chen, K. H. Cheng. 2017. **KLF10 loss in the pancreas provokes activation of SDF-1 and induces distant metastases of pancreatic ductal adenocarcinoma in the KrasG12D p53flox/flox model.** *Oncogene.* 36(39):5532-5543.
135. Winter J., S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, S. Diederichs. 2009. **Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation.** *Nat Cell Biol.* 11: 228-234.
136. Wong, T.S., X. B. Liu, B. Y. Wong, R. W. Ng, A. P. Yuen, W. I. Wei. 2008. **Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue.** *Clin. Cancer Res.* 14: 2588-2592.
137. World Health Organization (WHO). 2016. <http://www.who.int/es/> (Consultado Abril de 2016).
138. Xia B., H. Li, S. Yang, T. Liu, G. Lou. 2016. **MiR-381 inhibits epithelial ovarian cancer malignancy via YY1 suppression.** *Tumour Biol.* 37(7):9157-67.
139. Xia Y., W. Yang, W. Bu, H. Ji, X. Zhao, Y. Zheng, X. Lin, Y. Li, Z. Lu. 2013. **Differential regulation of c-Jun protein plays an instrumental role in chemoresistance of cancer cells.** *J Biol Chem.* 288(27):19321-9
140. Xie M., D. A. Dart, T. Guo, X. F. Xing, X. J. Cheng, H. Du, W. G. Jiang, X. Z. Wen, J. F. Ji. 2018. **MicroRNA-1 acts as a tumor suppressor microRNA by inhibiting angiogenesis-related growth factors in human gastric cancer.** *Gastric Cancer.* 21(1):41-54.
141. Xu L., Y. Zhang, H. Wang, G. Zhang, Y. Ding, L. Zhao. 2014. **Tumor suppressor miR-1 restrains epithelial-mesenchymal transition and metastasis of colorectal carcinoma via the MAPK and PI3K/AKT pathway.** *J Transl Med.* 12:244.
142. Yamanoi K., N. Matsumura, S. Murphy, T. Baba, K. Abiko, J. Hamanishi, K. Yamaguchi, M. Koshiyama, I. Konishi, M. Mandai. 2016. **Suppression of ABHD2, identified through a functional genomics screen, causes anoikis resistance, chemoresistance and poor prognosis in ovarian cancer.** *Oncotarget.* 7: 47620-47636.



143. Yan X., H. Zhou, T. Zhang, P. Xu, S. Zhang, W. Huang, Yang L., Gu X., Ni R., Zhang T. 2015. **Downregulation of FOXP2 promoter human hepatocellular carcinoma cell invasion.** *Tumour Biol.* 36: 9611-9619.
144. Yan Y., X. Wang, M. T. Venø, V. Bakholdt, J. A. Sørensen, A. Krogdahl, Z. Sun, S. Gao, J. Kjems. 2017. **Circulating miRNAs as biomarkers for oral squamous cell carcinoma recurrence in operated patients.** *Oncotarget.* 8(5): 8206–8214.
145. Yi R. Y. Qin, I. G. Macara, B. R. Cullen. 2003. **Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs.** *Genes Dev.* 17(24): 3011–3016.
146. Yunchao L., C. Zhao, Z. Yu, J. Chen X. She, P. Li, C. Liu, Y. Zhang, J. Feng, H. Fu, B. Wang, L. Kuang, L. Li, G. Lu, M. Wu. 2016. **Low expression of miR-381 is a favorite prognosis factor and enhances the chemosensitivity of osteosarcoma.** *Oncotarget.* 7(42): 68585–68596.
147. Zaynagetdinov R., T. P. Sherrill, L. A. Gleaves, A. G. McLoed, J. A. Saxon, A. C. Habermann, L. Connelly, D. Dulek, R. S. Peebles, B. Fingleton, F. E. Yull, G. T. Stathopoulos, T. S. Blackwell. 2015. **Interleukin-5 facilitates lung metastasis by modulating the immune microenvironment.** *Cancer Res.* 75(8):1624-1634.
148. Zhan P., G. M. Xi, B. Zhang, Y. Wu, H. B. Liu, Y. F. Liu, W. J. Xu, Q. Zhu, F. Cai, Z. J. Zhou, Y. Y. Miu, X. X. Wang, J. J. Jin, Q. Li, T. F. Lv, Y. Song. 2017. **NCAPG2 promotes tumour proliferation by regulating G2/M phase and associates with poor prognosis in lung adenocarcinoma.** *J Cell Mol Med.* 21(4):665-676.
149. Zhang J., H. Jin, H. Liu, S. Lv, B. Wang, R. Wang, H. Liu, M. Ding, Y. Yang, L. Li, J. Zhang, S. Fu, D. Xie, M. Wu, W. Zhou, Q. Qian. 2014. **MiRNA-99a directly regulates AGO2 through translational repression in hepatocellular carcinoma.** *Oncogenesis.* 3:e97.
150. Zhang M., S. Biswas, X. Qin, W. Gong, W. Deng, H. Yu. 2016. **Does Notch play a tumor suppressor role across diverse squamous cell carcinomas?.** *Cancer Med.* 5(8): 2048–2060.
151. Zhang Y., W. Xu, P. Ni, A. Li, J. Zhou, S. Xu. 2016. **MiR-99a and MiR-491 Regulate Cisplatin Resistance in Human Gastric Cancer Cells by Targeting CAPNS1.** *Int J Biol Sci.* 12(12):1437-1447.
152. Zhao Y, Y. Wang, Y. Wang. 2017. **Up-regulated miR-500a enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing PTEN expression.** *Biosci Rep.* 37: 1-8.
153. Zhaofeng C., X. Liu, Z. Hu, Y. Wang, M. Liu, X. Liu, H. Li, R. Li, Q. Guo, Y. Zhou. 2015. **Identification and characterization of tumor suppressor and oncogenic miRNAs in gastric cancer.** *Oncol Lett.* 10(1):329-336.



154. Zhong-Bo H., L. Zhonga, T. Mu-Jian, F. Jun-Wei, T. Hua-Mei, W. Jun-Yi, C. Hong-Yuan, W. Zhao-Wen, Q. Guo-Qiang, P. Zhi-Hai. 2012. **Identification of recurrence-related microRNAs in hepatocellular carcinoma following liver transplantation.** *Mol Onc.* 6: 445-457.