



TESIS DOCTORAL

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE
microARNs EN EL CARCINOMA
ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS. MUESTRAS DE
TEJIDO CONGELADO.**

Autora: Cintia Micaela Chamorro Petronacci
Directores: Mario Pérez-Sayáns García,
Abel García García y María Elena Padín Iruegas

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO
QUIRÚRGICAS
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2016





TESIS DOCTORAL

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE
microARNs EN EL CARCINOMA
ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS. MUESTRAS DE
TEJIDO CONGELADO.**

Autora: Cintia Micaela Chamorro Petronacci
Directores: Mario Pérez-Sayáns García,
Abel García García y María Elena Padín Iruegas

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES
MÉDICO QUIRÚRGICAS
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

SANTIAGO DE COMPOSTELA
2016





TESIS DOCTORAL

**EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE microARNs
EN EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS
ESCAMOSAS. MUESTRAS DE TEJIDO
CONGELADO.**



Fdo.

Cintia Micaela Chamorro Petronacci

DEPARTAMENTO DE CIRUGÍA Y ESPECIALIDADES MÉDICO
QUIRÚRGICAS
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA

FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
SANTIAGO DE COMPOSTELA
2016





UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA
FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA
Departamento de Cirugía y Especialidades Médico Quirúrgicas

D. ABEL GARCÍA GARCÍA, Profesor Titular de Cirugía Oral y Maxilofacial de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela; D. MARIO PÉREZ SAYÁNS GARCÍA, Profesor Asociado del Practicum de Adultos de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela; Dña. M^a ELENA PADÍN IRUEGAS, Profesor Contratado Doctor del Área de Anatomía y Embriología Humana, Departamento de Biología funcional y Ciencia de la Salud de la Universidad de Vigo.

CERTIFICAN

Que la presente Tesis Doctoral titulada "EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MICROARNS EN EL CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS. MUESTRAS DE TEJIDO CONGELADO", ha sido elaborada por Dña. CINTIA MICAELA CHAMORRO PETRONACCI bajo nuestra dirección, hallándose concluida autorizamos su presentación a fin de que pueda ser defendida ante el Tribunal correspondiente.

Y para que así conste, se expide la presente certificación en Santiago de Compostela a 11 de Noviembre de 2016.

Prof. Dr. D. Abel Garcia Garcia

Prof. Dr. D. Mario Pérez Sayáns Garcia

Prof. Dra. Dña. M^a Elena Padin Iruegas



Dedicatória





A mamá, a papá, a Miki y a Chuchi.





Se puede aprovechar la ocasión de la tesis para recuperar el sentido positivo y progresivo del estudio no entendido como una cosecha de nociones, sino como elaboración crítica de una experiencia, como adquisición de una capacidad para localizar los problemas, para afrontarlos con método, para exponerlos siguiendo ciertas técnicas de comunicación.

Umberto Eco





Agradecimientos





Quiero agradecer en primer lugar a la Dra. M^a Elena Padín Iruegas, quien me ha enseñado a no rendirme, a respirar hondo y a tener paciencia y, sobre todo, a disfrutar de la investigación y el laboratorio.

Al Dr. Ureta por su rigor y ternura hacia mi trabajo.

A Xabi por ayudarme en la interpretación de los datos.

A la Dra. Laura Núñez por ayudarme con los conocimientos de biología molecular.

Al Dr. Jorge y la Dra. Susi por el apoyo casi paternal en la clínica.

Al Dr. Chamorro por inspirar mis soluciones.

Al Dr. Máximo, director del Biobanco de Santiago (SERGAS), a Paula y a Lidia por habernos proporcionado las muestras biológicas necesarias para el desarrollo de este trabajo y como no, por cuidar de mis muestras.

A Raquel, María, Elena y Yolanda por acogerme en su grupo y ayudarme tanto en el laboratorio.

A la Dra. Sonia Eirás por su generosidad.

A Inés Quintás por su tiempo y dedicación a mi proyecto.

A Susana, Marga y Nelly por estar conmigo en el laboratorio y abrirme los sábados.

A María, Zuleima, Belinda y Olalla por acompañarme y ayudarme a avanzar.

A Cristina quien ha sido mi apoyo constante en el laboratorio.

A Pancho y a todo el laboratorio de Genómica por dejarme trabajar ahí.

A mis amigas Antía, Marta, Fátima, Mariña, Laura, Gema, Cris, Emma y Jessica por la paciencia que han tenido en mi ausencia.

A mis amigos Jorge, Raúl, Lebo y Alex por enseñarme a tomarme las cosas con humor.

A Alexia y Mateo por todo el legado que me han dejado.

A mi marido por todas las horas de viaje y espera en el CHUS.

A mi madre por ayudarme a dar forma a todo lo trabajado.

A mi hermano por ser mi S.A.T las 24 horas del día.

A mi familia porque siempre me ha animado a perseguir mis sueños.

Y, por supuesto, a los Dres. Mario Pérez-Sayáns y Abel García, sin los cuales no habría sido posible llevar a cabo este trabajo.



Índice





1. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	23
2. INTRODUCCIÓN	29
2.1 CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS (COCE).....	31
2.1.1 <i>Concepto y Clínica</i>	31
2.1.2 <i>Epidemiología</i>	32
2.1.3 <i>Localización</i>	32
2.1.4 <i>Etiología</i>	33
2.1.5 <i>Diagnóstico y clasificación TNM</i>	34
2.1.6 <i>Tratamiento</i>	36
2.1.7 <i>Pronóstico</i>	37
2.1.8 <i>Carcinogénesis</i>	37
2.2 REGULACIÓN POSTRANSCRIPCIONAL	41
2.2.1 <i>Tipos de ARN</i>	41
2.2.2 <i>Identificación de microARNs y perfil de expresión</i>	48
2.2.3 <i>MicroARNs como biomarcadores en el COCE</i>	53
3. MATERIAL Y MÉTODOS	59
3.1 TIPO DE ESTUDIO Y OBTENCIÓN DE LAS MUESTRAS	61
3.2 VARIABLES CLÍNICAS	61
3.2.1 <i>Localización del tumor</i>	61
3.2.2 <i>Diferenciación tumoral</i>	61
3.2.3 <i>TNM y estadio del tumor</i>	61
3.2.4 <i>Consumo de tabaco</i>	62
3.3 EXTRACCIÓN DEL ARN TOTAL DE LA MUESTRA	62
3.3.1 <i>Optimización del Protocolo</i>	63
3.3.2 <i>Protocolo de extracción</i>	64
3.4 MICROARRAY	73
3.4.1 <i>Protocolo de Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit</i>	75
3.4.2 <i>Affymetrix®miRNA 4.1 Array Plate</i>	76
3.5 PROCESAMIENTO DE DATOS	77
3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	82
4. RESULTADOS	85
4.1 DESCRIPTIVO	87
4.1.1 <i>Edad y sexo</i>	87
4.1.2 <i>Consumo de tabaco</i>	87
4.1.3 <i>Localización del tumor</i>	87
4.1.4 <i>Estadíos TNM</i>	87
4.1.5 <i>Distribución de estadíos según sexo</i>	87

4.1.6 Distribución de estadios TNM según localización.....	88
4.1.7 Distribución de estadios TNM y hábito tabáquico	89
4.2 CUALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ARN	90
4.2.1 Concentración de ARN total y RIN de casos y controles.....	95
4.2.2 Asociación entre localización tumoral y RIN	95
4.2.3 Asociación entre localización tumoral y concentración de ARN total	96
4.2.4 Asociación entre RIN y años de congelación de los tumores	97
4.3 PERFIL DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MICROARNs	98
4.3.1 Expresión diferencial de microARNs en muestras de COCE y controles.....	98
4.3.2 Expresión diferencial por estadios (II y IV).....	103
4.3.3 Expresión diferencial mujeres y hombres	112
4.3.4 Expresión diferencial por sexos en las muestras de los controles.....	116
4.3.5 Expresión diferencial COCE en lengua y controles	119
4.4 MICROARNs DESREGULADOS: DIANAS Y MECANISMOS MOLECULARES	123
5. DISCUSIÓN	137
5.1 ESTUDIOS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE MICROARNs.....	139
5.2 INFLUENCIA DEL TIEMPO DE ALMACENAMIENTO SOBRE EL ARN TOTAL EXTRAÍDO	144
5.3 GENES DESREGULADOS	146
5.3.1 MicroARNs desregulados.....	149
5.4 ASOCIACIÓN DE MICROARNs CON LAS VARIABLES TUMORALES.....	169
5.5 DIANAS DE LOS MICROARNs EN EL COCE.....	170
5.6 MECANISMOS MOLECULARES DE LOS MICROARNs DESREGULADOS	173
5.7 APLICACIONES DE LOS MICROARNs	175
6. CONCLUSIONES	179
7. BIBLIOGRAFÍA	183
8. ANEXOS.....	217
8.1 APROBACIÓN DEL COMITÉ DE ÉTICA.	219
8.2 CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS CASOS EN GALLEGO.....	223
8.3 CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS CASOS EN CASTELLANO.....	231
8.4 CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS CONTROLES EN GALLEGO.	239
8.5 CONSENTIMIENTO INFORMADO DE LOS CONTROLES EN CASTELLANO.	247

1. Justificación, hipótesis y objetivos





JUSTIFICACIÓN

El carcinoma oral de células escamosas (COCE) es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral que se origina a partir del epitelio escamoso. La forma clínica del COCE es fácilmente distinguible en estadios avanzados, donde solemos ver una forma ulcerativa de tamaño variable con base rugosa y bordes elevados e indurados. Sin embargo, no es tan fácil de distinguir en estadios primarios donde la lesión suele pasar desapercibida y es muy probable hacer un diagnóstico erróneo. Por ello, aquellas lesiones que no mejoran después de haber eliminado factores irritantes físicos y químicos tras un período de 15 días, deben ser analizadas mediante biopsia y estudio histológico (1).

El COCE es una patología cuyo pronóstico no ha mejorado en los últimos años a pesar de los avances en el conocimiento biológico y tecnológico, lejos de disminuir su aparición, la incidencia de esta patología ha aumentado en los últimos 10 años teniendo en cuenta datos a nivel mundial (2). La supervivencia de los pacientes que padecen estadios avanzados de COCE sigue siendo muy baja. En este marco el conocimiento de la etiología y los factores de riesgo es esencial para prevenir la patología, aunque solamente una fracción de los pacientes expuestos a dichos factores, fumadores, bebedores y portadores del virus del papiloma humano (VPH), llega a desarrollar COCE (3). Esto sugiere que existen otros factores, conocidos o no, que no estamos valorando en la tumorigénesis del cáncer oral.

Un microARN (también conocido como miARN) es un ARN monocatenario no codificante de una longitud normalmente de entre 18 y 24 nucleótidos que posee habilidad para regular la expresión de otros genes a un nivel postranscripcional, es decir a nivel de los ARN mensajeros.

Los microARNs pueden expresarse de manera ubicua, es decir, en todo tipo de tejidos, o expresarse en uno de manera específica (4). Cada microARN puede potencialmente unirse a más de un gen diana y modificar así su expresión. El conocimiento de la interacción específica entre un microARN determinado y la proteína o gen sobre el que actúa, es clave para conocer los procesos o mecanismos moleculares en los que está implicado dicho microARN.

El creciente interés sobre los microARNs se debe a su papel en la regulación génica de procesos biológicos tales como el ciclo, la diferenciación y la apoptosis celular (5). La alteración de la expresión de los microARNs se ha asociado con fenotipos clínicos específicos de tumores tales como recurrencia, desarrollo de metástasis y supervivencia tras la cirugía (6). Conocer por tanto los perfiles de expresión de microARNs de estos procesos ayuda a conocer los genes implicados y abre la puerta a terapias individualizadas y menos invasivas en distintas enfermedades.

Los estudios sobre la expresión diferencial entre tejido sano y canceroso han revelado que determinados microARNs pueden aparecer con una expresión significativamente aumentada en un tejido específico canceroso y disminuido en otro, como es el caso del miR-31, sobre expresado en el COCE e infra expresado en el cáncer gástrico (5).

Existen varios métodos para cuantificar la expresión diferencial de los microARNs como son la reacción en cadena de la polimerasa con transcripción inversa (qRT-PCR), la tecnología de microarrays y las plataformas de secuenciación masiva (RNA-Seq).

El perfil de expresión de los microARNs ha sido estudiado en muchos tipos de tumores malignos y se han descubierto determinados microARNs como posibles biomarcadores del cáncer (7).

Existen varios estudios sobre expresión diferencial en el COCE con resultados dispares y en ocasiones contradictorios (8, 9). La mayoría de los autores coinciden que esta disparidad se debe a la variabilidad en el diseño de los estudios, el tipo de tecnología utilizada y los diferentes tipos de muestras como, por ejemplo, el uso de líneas celulares como fuente de microARNs, que se consideran inapropiadas por las características propias de líneas celulares (7, 10-12). Debido a la dificultad de acceso a muestras de tejido congelado tumoral, algunos estudios engloban muestras de diferentes localizaciones como son faringe, laringe y orales en cáncer de cabeza y cuello sin tener en cuenta que los procesos y mecanismos de carcinogénesis son diferentes (13). Además, obtener ARN de calidad sin que se degrade es complicado, debido a la rápida acción de las RNAsas.

Una circunstancia a tener en cuenta a la hora de comparar estudios de expresión diferencial con microARNs es que el hallazgo de nuevos microARNs es continuo, por lo tanto, con el descubrimiento de nuevos microARNs es necesaria una tecnología actualizada que los mida. El último estudio de expresión diferencial de microARNs en el COCE, en el momento de la redacción de este trabajo, utilizó una tecnología de microarrays (miRCURY LNA™ array) que mide un total de 1168 sondas de miARNs maduros (13). Gracias al avance tecnológico, en este estudio hemos podido medir más de 2500 microARNs con la plataforma de Affymetrix®.

La tendencia terapéutica con microARNs, una vez establecidos los patrones de expresión, vendría caracterizada por la sobre expresión de microARNs supresores de tumores que se expresaran de manera reducida en el COCE o la inhibición de microARNs oncogénicos.

La estabilidad de esta molécula en fluidos corporales, en comparación con otras como el ARN mensajero, y su capacidad para viajar por el torrente sanguíneo en micro vesículas sin ser degradado, hace posibles tratamientos con nano partículas y pruebas diagnósticas menos traumáticas que la técnica de biopsia habitual (14). Actualmente, el uso de microARNs en tratamientos para la leucemia y hepatitis C está en fase experimental (15, 16).

HIPÓTESIS NULA

Existe un patrón de expresión de microARNs diferente en muestras de pacientes con COCE comparadas con muestras de pacientes sanos.

OBJETIVO PRIMARIO

1. Identificar aquellos microARNs que estén desregulados en tejido tumoral de COCE con respecto al tejido control de la mucosa oral usando tejido congelado y la tecnología de microarrays.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

2. Optimizar el protocolo de extracción de ARN total de las muestras congeladas.
3. Determinar cómo afecta el tiempo de congelación a la concentración y calidad del ARN total extraíble de las muestras.
4. Relacionar los microARNs desregulados con características clínicas específicas del COCE.
5. Establecer un patrón de expresión específico de microARNs en pacientes diagnosticados de COCE.
6. Estudiar las vías moleculares más afectadas por la alteración de la expresión de los microARNs.





2.Introducción





2.1 Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)

2.1.1 Concepto y Clínica

El carcinoma oral de células escamosas, a partir de ahora COCE, es la neoplasia maligna más frecuente de la cavidad oral que se origina a partir del epitelio escamoso. Inicialmente se localiza en el propio epitelio, denominándose *in situ* (17). El crecimiento del tumor localizado acaba produciendo metástasis en los ganglios linfáticos cervicales extendiéndose a otros más alejados anatómicamente (18).

El desarrollo del COCE tiene lugar tras un amplio conjunto de alteraciones genéticas y moleculares derivadas de factores medioambientales y predisposición genética del paciente.

Aunque clásicamente se consideraba que el cáncer oral comprendía todas las neoplasias malignas que afecten los labios, la lengua y los tejidos intraorales, incluida la orofaringe, en la última edición de la Clasificación Internacional de Enfermedades (ICD) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), Moore et al., sugieren que las lesiones asentadas en la porción móvil de la lengua, suelo de boca, mucosa yugal, paladar y mucosa del reborde alveolar superior e inferior, deben ser agrupadas bajo la denominación de cáncer oral, y que el cáncer de labio, orofaringe y de glándulas salivales deben ser analizados separadamente (7, 19).

La forma clínica del COCE es fácilmente distinguible en estadios avanzados, donde solemos ver una forma ulcerativa de tamaño variable con base rugosa y bordes elevados e indurados. Sin embargo, no es tan distinguible en estadios primarios donde es muy probable hacer un diagnóstico erróneo. Por ello aquellas lesiones que no mejoren después de haber eliminado factores irritantes físicos y químicos tras un período de 15 días, deben ser analizadas mediante biopsia y estudio histológico (20).

Existen además lesiones que pueden ser potencialmente malignas, como son la eritroplasia, la leucoplasia, la eritroleucoplasia y la fibrosis oral submucosa (21, 22). Éstas son las mayores formas de lesiones pre malignas orales(23), por ello, se recomienda a los pacientes que presentan algunas de estas lesiones estar controlados y visitar al profesional sanitario periódicamente. La fibrosis oral submucosa es una enfermedad crónica caracterizada por un aumento progresivo en la hialinización de la submucosa y debe ser diferenciada de la esclerodermia con manifestación oral (24).

Se estima que entre el 16 y el 26% de los COCEs se desarrollan a partir de lesiones pre malignas, lo cual se presenta frecuentemente como un área de la mucosa roja o blanca. Las características clínicas e histológicas de dichas lesiones no pueden ser usadas para discernir entre aquellas que sean progresivas y las no progresivas (25).

El principal síntoma que expresa el paciente con COCE, y la principal razón que le lleva a acudir al servicio médico, es el dolor en un 40% de los casos, aunque este suele hacerse patente

cuando el tamaño del tumor llega a ser considerable (26). El dolor suele ser más acuciado en tumores que afectan a la lengua y suelo de boca. Otros síntomas son el sangrado, movilidad dental, trismus, parestesia, problemas al respirar, dificultad para tragar, hablar y para utilizar prótesis(26).

2.1.2 Epidemiología

El COCE es uno de los carcinomas más prevalentes a nivel mundial suponiendo el 3-4% de todos los cánceres y el 90% de los cánceres que aparecen en la boca. Afecta más a varones que a mujeres, aunque esta diferencia cada vez es menos marcada debido al aumento de consumo femenino del tabaco y el alcohol, y el riesgo de padecerlo aumenta con la edad. A pesar de los avances técnicos en cirugía y el uso coadyuvante de diferentes tratamientos, el pronóstico general apenas ha mejorado significativamente en los últimos años.

Según el Consejo de Dentistas de España, en nuestro país el número de varones afectados es de entre 1 y 5,2 por cada 100.000 habitantes. El 50% de los casos se diagnostican en fases avanzadas (estadío III o IV) de la enfermedad y la consecuencia es un pronóstico malo con alta mortalidad y morbilidad. Por lo tanto, un factor esencial para mejorar la supervivencia de los pacientes afectados por COCE es la detección precoz. Los programas de detección precoz se llevan a cabo mediante la concienciación de la población, con propaganda de revisiones periódicas, y en la formación actualizada de profesionales cuyo campo de trabajo se centra en la cavidad oral como pueden ser los odontólogos o los cirujanos maxilofaciales. Así, es importante explorar bien todas las partes de la boca en revisiones anuales para poder detectar aquellas lesiones susceptibles de malignizar. Además de una exploración física también es necesaria la palpación de ganglios linfáticos cervicales para descartar masas que puedan representar metástasis.

La incidencia de COCE se ha sextuplicado en la última década teniendo en cuenta datos a nivel mundial (2). África, China y Asia central tienen la mayor incidencia de COCE en el mundo, y en la población negra africana su tasa de incidencia alcanza el 16,3 por 100.000 (27). Un estudio de Liu et al. 2009, analizó los datos recopilados por la Sociedad Americana de Cáncer y puntualizó que los casos nuevos de cáncer de cabeza y cuello habían aumentado un 25% en los últimos 5 años (28).

2.1.3 Localización

Las áreas más comúnmente afectadas por el COCE son el suelo de la boca y la lengua (Figura 1), donde el riesgo de metástasis es mayor que en el reborde alveolar superior o el paladar duro (20). También puede aparecer en la mucosa yugal, mucosa gingival, paladar duro y blando, así como la región retromolar.

La superficie posterior y lateral, así como la cara ventral de la lengua son las zonas más frecuentemente afectadas en los COCEs de localización lingual, mientras que el dorso de la lengua se suele ver afectado más frecuentemente por lesiones crónicas asociadas a liquen plano oral erosivo, lesión de sífilis terciaria o asociadas al consumo de arsénico (29).

El suelo de la boca suele estar más afectado por lesiones ulcerosas de márgenes irregulares e indurados próximos al frenillo lingual y de los conductos de las glándulas submandibulares. La frecuencia de aparición en esta localización es de un tercio de todos los carcinomas orales, habiendo más casos en mujeres que en hombres. En estadios avanzados el carcinoma se extiende en profundidad produciendo la fijación de la lengua (30, 31).



Figura 1. COCE en suelo de boca.

La afectación del COCE en el reborde alveolar es poco frecuente y supone un 5% de todos los carcinomas orales, presentándose como una lesión indolora en la zona posterior mandibular (32).

Las lesiones de COCE en la mucosa yugal suelen ser asintomáticas, preferentemente en la zona posterior, lo que hace necesario descartar una lesión traumática por masticación. La frecuencia de afectación de la mucosa yugal está en torno al 2% de los COCE, aunque este porcentaje varía según la localización geográfica siendo más frecuente en zonas del sudeste asiático donde el hábito de mascar tabaco y nuez de betel suele considerarse un factor de riesgo frecuente entre sus habitantes (33).

2.1.4 Etiología

La etiología del cáncer, hoy en día, sigue siendo desconocida. Los factores etiológicos más comunes estudiados no explican por sí solos el origen del cáncer. Los factores de riesgo más comunes son el alcohol, el tabaco, el virus de Epstein-Barr (15) y el virus del papiloma humano

(VPH) tipo 16 y 18 (26), aunque el VPH se ve más implicado en cáncer de cabeza y cuello especialmente de orofaringe (3).

La luz ultravioleta de la luz solar también es un factor que influye fundamentalmente en el desarrollo de cáncer en el labio inferior. La actividad del p53, una molécula clave en el ciclo celular, se ve afectada como consecuencia de la exposición de dicha luz(34). Por lo tanto, afecta a personas que trabajan en el exterior con exposición solar prolongada. Según el estudio que publica anualmente la *International Agency for Research against Cancer (IARC)*, la frecuencia de cáncer en el labio en hombres de la región de Albacete entre los años 2003-2007 fue de un 2,7%, frente a cualquier otro cáncer oral que no llegó a ser del 1%.

El VPH se une a los receptores de los queratinocitos y una vez dentro crea proteínas E6 y E7 que se unen a las moléculas p53 y Rb respectivamente, deteniendo la división celular (35). Los estudios demuestran que los tumores asociados con VPH son histológicamente diferentes y presentan un mejor pronóstico (36).

El tabaco es un factor de riesgo del cáncer oral que aumenta en pacientes con un consumo combinado de alcohol. El riesgo relativo que presentan los pacientes fumadores con respecto a los pacientes no fumadores de padecer COCE es de 7 veces más alto, aunque el cese del hábito de fumar se pueda reducir a niveles cercanos a los de las personas que nunca han fumado transcurridos 10 años (37).

Se ha demostrado que las partículas que se desprenden del tabaco, nicotina, alquitrán, así como el monóxido de carbono, pueden producir cambios en el ADN y, también se demostró, que el acetaldehído que es el primer metabolito del etanol es carcinogénico (38).

2.1.5 Diagnóstico y clasificación TNM

Las lesiones iniciales del COCE se manifiestan como lesiones planas de coloración blanca o roja, o como úlceras molestas o dolorosas. Sin embargo, esta clínica coincide con otras muchas patologías que no son malignas (30).

Puesto que la clínica no es suficiente para identificar un COCE, el uso de pruebas complementarias se hace casi obligatorio. Las radiografías nos pueden ayudar para identificar inicialmente una lesión posiblemente maligna. La Tomografía Computerizada (TC) y la Resonancia Magnética (RM) se utilizan normalmente para valorar el estado del tumor primario y las adenopatías. El TC suele usarse con contraste previo a la cirugía para limitar las estructuras vasculares y linfáticas. Otra técnica utilizada es la del PET (*Positron Emission Tomography*) que detecta el aumento de la actividad metabólica en el tejido tumoral, concretamente la glucólisis.

La estadificación del cáncer oral es la herramienta más importante para la toma de decisiones en el plan de tratamiento del paciente. La clasificación de la “*American Joint Committee on Cancer*” establece un código de identificación del COCE en función de su tamaño (T), afectación ganglionar (N), metástasis (M) y estadiaje clínico (*TNM classification of malignant Tumours, 7th Edition; Wiley-Blackwell, 2009*). Del sistema de TNM, el factor clínico predictor más importante es el tamaño tumoral (39). Las metástasis ganglionares tienen lugar

cuando las células tumorales infiltran los ganglios linfáticos produciéndose la multiplicación de dichas células en el interior de los mismos afectando a su arquitectura. Los ganglios más comúnmente afectados son los submaxilares, seguidos de la cadena cervical.

Otro dato importante para determinar el pronóstico del COCE es su grado de diferenciación. El grado de diferenciación de un tumor define cuán diferentes son las células tumorales comparadas con las células del mismo tejido sano. Un tumor bien diferenciado tiene un mejor pronóstico que el moderadamente diferenciado y éste a su vez que uno poco diferenciado (Figura 2). A menor grado de diferenciación es más fácil que se produzca metástasis tumoral (26).

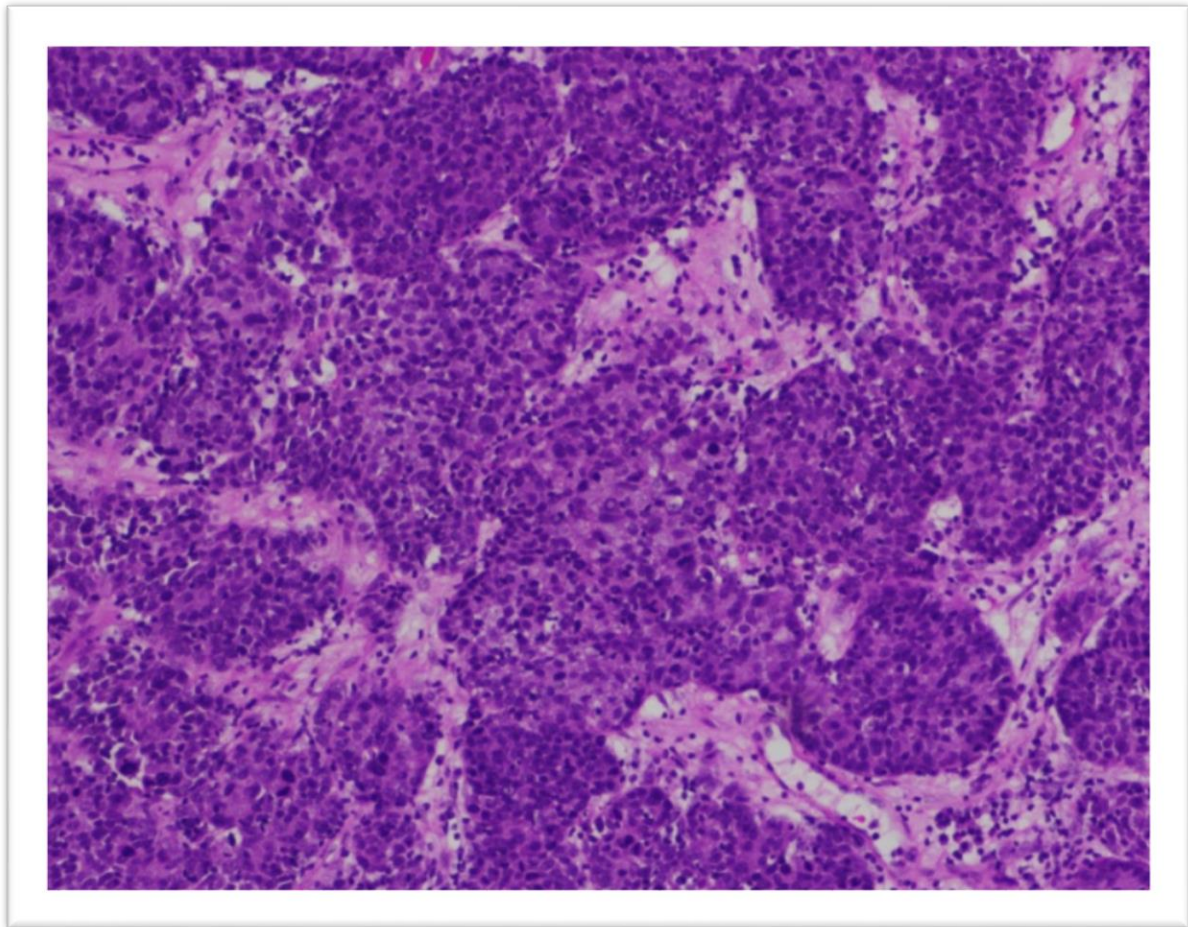


Figura 2. COCE poco diferenciado; cedida por el Dr. García-Ureta.

Una buena anamnesis explorando mucosas y palpando los ganglios del paciente puede ayudarnos a realizar diagnósticos precoces, aquellos ganglios que sean mayores de 1 cm y estén adheridos a planos profundos y de consistencia dura, se considerarán sospechosos ya que estos no suelen doler hasta estadios avanzados. Otras herramientas de las que disponemos son enjuagues para tinciones con azul de toluidina, biopsia con cepillo o detección mediante fluorescentes. Sin embargo, todos estos métodos suelen tener una especificidad baja y la exploración clínica con verificación del servicio de anatomía patológica mediante biopsia, siguen siendo el principal método diagnóstico.

2.1.6 Tratamiento

El objetivo del tratamiento es eliminar el tumor y preservar la función del aparato estomatognático, consiguiendo que las secuelas sean mínimas y previniendo su recidiva. Según el estadio del COCE el tratamiento puede ser quirúrgico (que puede incluir disección ganglionar o no), acompañado o no de radio y/o quimioterapia. Si el tumor no se pudiera eliminar por completo el tratamiento de elección es el quimioterápico con metotrexato o cisplatino en combinación con 5-fluoracilo, o paclitaxel (40).

La terapia del COCE presenta dificultades debido, principalmente, a las estructuras adyacentes a la región donde se desarrolla, que pueden verse afectadas bien por el tumor, bien por el tratamiento. Dichas estructuras incluyen el encéfalo, nervios craneales, faringe y laringe, mandíbula, glándulas salivales y músculos relacionados con el habla y la deglución. El daño en estas zonas supone déficits estructurales, funcionales y estéticos cuyo impacto merma la calidad de vida del paciente. Las recidivas locales y la progresión local del COCE son a menudo incurables.

Debido a las implicaciones que supone no controlar el tumor localmente, la mayoría de los estudios se centran en mejorar la efectividad de la terapia minimizando la toxicidad y efectos secundarios en estructuras adyacentes al tumor (41).

El tratamiento quirúrgico consiste en la resección de la masa tumoral. El alcance de la resección varía en función de la profundidad de la afectación, pudiendo ser requerida la eliminación de tejido muscular o de tejido ganglionar.

La radioterapia es el abordaje terapéutico más utilizado en oncología de cabeza y cuello. Su principal limitación es la toxicidad que genera en el paciente. Lesiones como mucositis, radiodermatitis, xerostomía o candidiasis son algunos de los signos y/o síntomas más comunes en pacientes que reciben radioterapia.

La quimioterapia es fundamental en el mantenimiento de la mayoría de los tratamientos coadyuvantes en pacientes con COCE tras la cirugía. Los beneficios aportados por la quimioterapia a los pacientes con cánceres avanzados incluyen la disminución del tamaño tumoral, reducción de la metástasis a distancia y mejora del pronóstico (8).

Hoy en día el cisplatino todavía sigue siendo la primera línea de elección en el tratamiento del COCE (42), aunque altos niveles de éste pueden producir efectos tóxicos como la nefro u ototoxicidad. La habilidad del cisplatino para inducir la muerte celular está orquestada por los miembros de la familia p53 (p53, p63 y p73), factores de transcripción que regulan los niveles de expresión de determinados ARNs mensajeros implicados en procesos como apoptosis, autofagia o arresto celular (43). La resistencia a este quimioterápico ha sido asociada con diferentes mecanismos moleculares, entre ellos la apoptosis mitocondrial, AKT1 (*RAC-alpha serine/threonine-protein kinase*), BCL2 (*apoptosis regulator Bcl-2*) o la cascada de las caspasas. La regulación de estos procesos de señalización puede darse a distintos niveles, a nivel de factores transcripcionales, interacción proteína-proteína y /o modulación a través de microARNs (44).

La quimioterapia personalizada es la que desarrolla medicamentos basados en los cambios celulares que causan el cáncer, combatiendo dichos cambios. Así, el Cetuximab ataca el factor de crecimiento epidérmico, con lo que desacelera o detiene el crecimiento celular. Otros medicamentos anti-VEGF, como el Bevacizumab, bloquean la formación de vasos sanguíneos privando al tumor del aporte necesario de nutrientes para su crecimiento (39). Sin embargo, no parece haber un aumento significativo de supervivencia a los 5 años por lo que su uso en el COCE es bastante limitado (40).

Uno de los factores que parecen influir en la efectividad de la terapia oncológica es el momento de aplicación de los quimioterápicos respetando el reloj biológico (45).

2.1.7 Pronóstico

En patologías tumorales el pronóstico se relaciona con metástasis y recurrencia en el cáncer (46). El pronóstico de los pacientes con COCE varía en función del estadio en el que se encuentre en el momento del hallazgo. A los 5 años la tasa de supervivencia en estadios precoces (estadios I y II) es en torno al 80% mientras, que en estadios avanzados (estadios III y IV) es de un 50% (26). La recidiva en pacientes que han padecido un COCE es generalmente de un 75% durante el primer año, por ello las revisiones mensuales durante el primer año son esenciales para prevenir recurrencias. No es hasta el quinto año libre de tumor cuando las revisiones pueden hacerse anualmente (40). Aproximadamente el 20-30% de los pacientes desarrollan metástasis, y su localización depende de la situación primaria tumoral.

Aquellos tumores relacionados con el VPH suelen afectar a pacientes jóvenes y tener mejor pronóstico (36).

Al final del proceso de tratamiento del COCE, el paciente puede haber perdido habilidades básicas para comer, beber, hablar y tragar, así como presentar distorsión facial (42). Estas secuelas reflejan la importancia de identificar este tipo de tumores en estadios iniciales.

2.1.8 Carcinogénesis

La carcinogénesis es el conjunto de procesos que acaban produciendo que células normales se conviertan en cancerosas. Varios son los mecanismos y conceptos estudiados y analizados en la transformación maligna de las células. En un tumor se distingue normalmente un núcleo principal que conocemos como estroma formado por fibroblastos, células inmunitarias y matriz extracelular (47) y un microambiente tumoral que lo rodea(48). La relación entre inflamación y cáncer ha sido muy estudiada, condiciones de inflamación e hipoxia contribuyen al angiogénesis aumentando la capacidad del tumor para seguir nutriéndose (49). Parece que los fibroblastos asociados a cáncer (CAFs) son los que median la inflamación liberando moléculas que sirven como mecanismos de señalización que atraen macrófagos y granulocitos que a su vez promueven, mediante la liberación de citoquinas, la formación de nuevos vasos sanguíneos (50).

Denominamos células iniciadoras de tumor (TIC) a aquellas células madre con capacidad para iniciar y mantener el crecimiento celular en procesos tumorales. Cuando estas células acumulan mutaciones o expresiones génicas anormales y no son detenidas por el sistema inmunológico del organismo tiene lugar el tumor maligno (48). Los fracasos de curación de los tumores se atribuyen a la existencia de una subpoblación de células CSC (*Cancer Stem Cells*) que se hallan en el centro del tumor. Estas células han mostrado ser resistentes al 5-fluoracilo y al cisplatino. Además, presentan una expresión aumentada de aldehído deshidrogenasa que las hace cuantificables y en ensayos de cultivos celulares han mostrado patrones similares a la transición epitelio mesenquimal (EMT) (51).

La EMT juega un papel importante en la embriogénesis, reparación tisular y metástasis. Es un proceso para producir células mesenquimales que requiere la expresión de un grupo de genes y mecanismos de señalización, la mayoría de los cuales parecen regular aspectos específicos en procesos de transformación maligna y progresión cancerosa (47). La transformación maligna está asociada con esta pérdida de diferenciación epitelial hacia un fenotipo más mesenquimal, la expresión de determinados genes en este fenotipo suele ir acompañado de un aumento en la motilidad celular. La pérdida de características epiteliales en la EMT incluye la disminución en la adhesión celular y la pérdida de la polaridad de la célula epitelial (52). Este cambio se produce por unos factores de transcripción que epigenéticamente cambian la expresión de determinados genes sobre todo de proteínas modificadoras de la cromatina e implicadas en la migración celular (53).

La comunicación intercelular a través de diferentes moléculas hace que el comportamiento de una célula influya en la adyacente (50), según Hanahan y Weinberg existen seis características distintivas que se repiten en todos los tumores (*Hallmarks of cancer*) (54): adquisición de señales estimuladoras del crecimiento autosuficientes (c-Met, oncogen ras, ciclinas), anormalidades en las señales inhibitoras del crecimiento (RB, p53), evasión de la apoptosis, inmortalización, angiogénesis (VEGF, IL-8), invasión y metástasis (E-cadherina, integrinas, MMP).

El crecimiento celular en condiciones normales es estimulado de manera externa por distintas moléculas que se unen a los receptores de membrana celular y ponen en marcha diferentes mecanismos internos de la célula. Por ejemplo, para estimular la división de los queratinocitos orales los factores de crecimiento epidérmico (EGF) se unen a sus receptores (EGFR) activando la proteína RAF quien a su vez activa otras quinasas (MEK y MAPK). La señal llega finalmente al núcleo donde la proteína C-MYC se une al ADN estimulando la transcripción de la ciclina D, quien activa las quinasas ciclina-dependientes (CDKs). Éstas catalizan la fosforilación de la proteína supresora de tumores del gen del retinoblastoma y liberan los factores de transcripción (E2F) necesarios para la transcripción de proteínas encargadas de la replicación del ADN (55).

La tasa de proliferación de cáncer depende de la proporción de las células que proliferan, la duración del ciclo celular y el factor de pérdida celular(48).

La carcinogénesis es gradual, a partir de células que acumulan alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores (56). La expresión incontrolada de oncogenes conduce a la proliferación celular constante, mientras que los genes supresores tumorales son aquellos que tienen la función de controlar la expresión de oncogenes, reparar el ADN dañado o provocar la

apoptosis celular. Además de mutaciones específicas en genes clave, las células también pueden variar su expresión génica por factores epigenéticos como por ejemplo a través de la modificación de histonas, remodelación de la cromatina, modificación del ADN por metilación y la modulación de genes por pequeños ARNs no codificantes (57).

La expresión anormal de determinadas moléculas ha sido estudiada para la detección precoz de procesos cancerígenos y para identificar características clínicas como la invasividad o agresividad del tumor. Una de las condiciones para la migración celular es la reorganización de la matriz extracelular y en el COCE la proteína Tenascin-C (Tn-C) ha sido estudiada como esencial para la EMT(55). Las ciclinas y las CDKs que sirven como interruptores moleculares activando o inactivando un momento específico del ciclo celular (58) se han hallado sobre expresadas en carcinomas orales (59).

Otro gen muy estudiado en procesos cancerosos es el gen p53, ya citado anteriormente, cuya proteína se traduce cuando la célula se dispone a dividirse. Si el material genético celular está dañado y no es grave la p53 detiene la división y activa los genes reparadores, si el daño es irreparable entonces activa el mecanismo que conduce a la apoptosis. La afectación de este gen por lo tanto impide el control de las células en división dañadas. En el COCE la expresión alterada del p53 se encuentra entre un 20 y 50% de los casos (60). Otros de los genes donde se han hallado mutaciones en el carcinoma oral de células escamosas son el TP53, NOTCH1, EGFR, CDKN2a, STAT3, CD44, Rb (50).

Las matrices metaloproteinasas (MMP) MMP1, MMP2, MMP3 y MMP9 se han observado en altas concentraciones en tejido canceroso de COCE (61). En el tejido tumoral participan, en la mayor parte, degradando la matriz extracelular y su aumento se ha asociado con metástasis (62).

Los polimorfismos, variación de nucleótidos en una parte específica del ADN que afecta por lo menos al 1% de la población, en citoquinas e interleuquinas están asociados con un aumento de riesgo de COCE (63).

Evitar la muerte celular es una de las adaptaciones que permite a las células tumorales escapar del efecto de la terapia anticancerosa. Existen proteínas proapoptóticas que disparan el mecanismo de la apoptosis y proteínas antiapoptóticas o proteínas de la supervivencia que son un colectivo capaz de evitar la apoptosis celular (Figura 3) (64). La expresión anormal de éstas últimas está asociada con actividades que promueven la supervivencia del cáncer, proliferación celular y resistencia a la terapia anticancerosa (65).

2.2 Regulación postranscripcional

El genoma es la totalidad de la información genética que posee un organismo. Los genes que lo componen son moléculas de ADN (ácido desoxirribonucleico) con una secuencia de nucleótidos determinada. La secuencia de los nucleótidos de ADN se transcribe a ARN (ácido ribonucleico) y después se traduce dando lugar a las proteínas. Son las proteínas, y no el ADN, las principales biomoléculas que llevan a cabo funciones estructurales, metabólicas, enzimáticas y reguladoras en la célula.

2.2.1 Tipos de ARN

Los ARNs son polirribonucleótidos, con ribosa de uracilo en lugar de timina, formados por cadenas lineales de longitud inferior a la del ADN. En las células de todos los organismos estudiados hasta la fecha hay dos tipos diferentes de moléculas de ARN, los ARN mensajeros los cuales se traducen en proteínas y aquellos llamados ARNs no codificantes (ncARNs) que no se traducen en proteínas pero que poseen funciones por sí mismos.

El ARN mensajero (mARN) contiene la información genética del ADN para la síntesis de proteínas. Su tamaño varía según la proteína que codifique y se degrada con rapidez. El mARN supone el 5% del ARN total celular. Para la síntesis de proteínas se asocia temporalmente a los ribosomas, complejo molecular formado por dos subunidades de ARN ribosómico que posee un espacio para el paso del mARN y el ARN transferente.

El ARN ribosómico (rARN) constituye la mayor parte del ARN total de la célula (75%). Su estructura permite que queden ensambladas las distintas proteínas que dan lugar al ribosoma.

Los ARN transferentes (tARN) son moléculas que participan en la síntesis de proteínas transportando los aminoácidos correspondientes con el código de codones del mARN a la cadena de producción. La fracción de tARN presente en la célula es en torno al 20% con respecto al ARN total.

Un microARN (miARN) es un ARN monocatenario no codificante de una longitud habitualmente de entre 18 y 24 nucleótidos que posee habilidad para regular la expresión de otros genes a un nivel postranscripcional, es decir a nivel de los ARN mensajeros. Los microARNs presentan una fracción muy pequeña con respecto a la masa total de ARN, aproximadamente, el 0,01% (67).

Los microARNs fueron inicialmente descubiertos como pequeños ARNs temporales (stARNs) que regulaban las transiciones del desarrollo en el *Caenorhabditis elegans*. Con los años se esclareció que esos stARNs eran el prototipo de una gran familia de pequeños ARNs, los miARN (4, 68).

Una característica importante de los microARNs, es que sus precursores, los pre-miARNs, adoptan una estructura tipo tallo-asa. En los animales los genes de miARNs se transcriben por acción de las ARN polimerasas II y el transcrito se denomina pri-miARN. El pri-miARN es

procesado por el complejo de Drosha, y una proteína que posee dominios de unión al ARN de doble hélice llamada Pasha, y transformado en pre-miARN. Todo este proceso sucede en el núcleo de la célula. Una vez el pre-miARN llega al citoplasma a través de la exportina 5, el asa terminal es removida por la proteína Dicer y quedan las dos cadenas de ARN. A esta doble cadena se le une el complejo RISC (*RNA induced silencing complex*) en el cual se halla una proteína llamada Argonauta (Ago) que se encarga de degradar una de las dos hebras dando lugar al microARN funcional (Figura 4).

La secuencia diana reconocida por el miARN se localiza generalmente en las regiones 3' no traducidas (UTR) del ARN mensajero (69), aunque algunos trabajos aportan otro mecanismo de regulación menos común ejercido por los miARNs en la región 5'. Sin embargo, en este último tipo de regulación se puede promover el aumento de traducción, es decir, que también tienen un efecto positivo en la expresión génica (28). Con todo esto podemos concluir que los microARNs regulan la expresión génica de manera negativa, silenciándolos, o positiva. Ejemplos de estos hechos se observaron con el miR-373 que aumenta los niveles de E-Cadherina o el miARN-369-3 que aumenta la traducción de TNF-alfa (factor de necrosis tumoral alfa) (70-72).

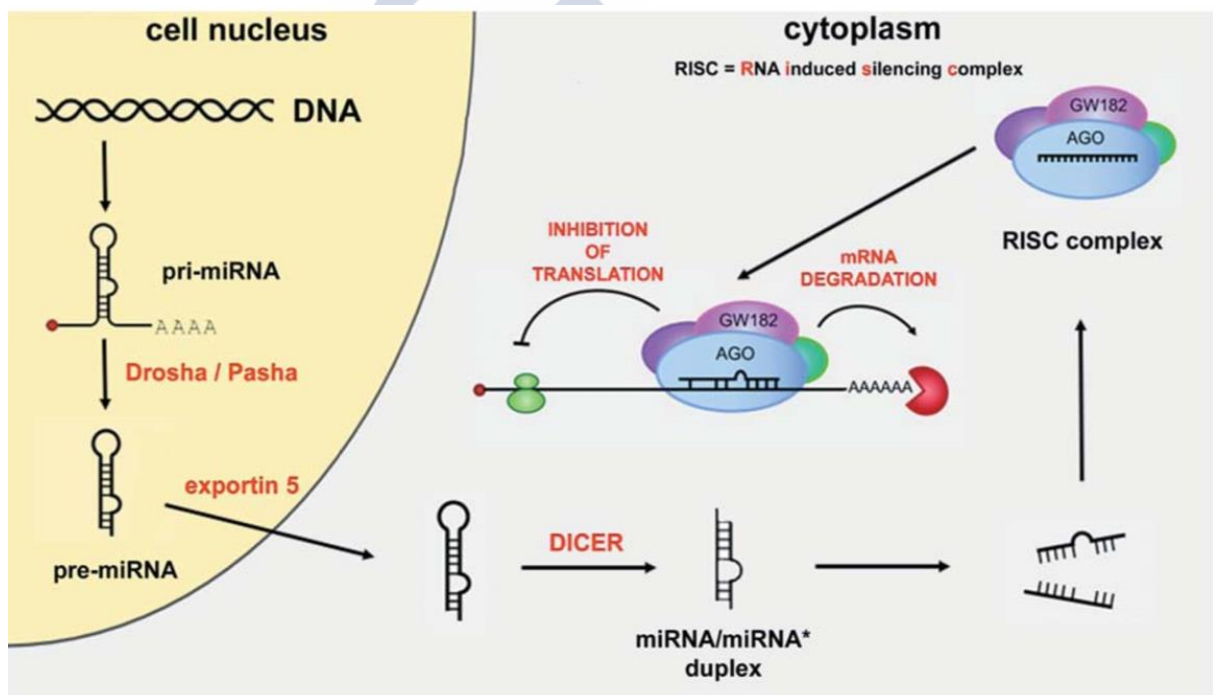


Figura 4. Biogénesis y mecanismo de regulación sobre el ARN mensajero (73)

Casi al mismo tiempo que se descubrieron los miARNs de la familia *let-7*, pequeños ARNs también fueron caracterizados como modificadores de procesos biológicos, los ARNs interferentes (*RNA interference*, ARNi), que formaban parte de un mecanismo de silenciamiento de genes secuencia-específico. Tras el estudio exhaustivo de estas secuencias de ARN se clasificaron tres tipos diferentes de ARNi basándose en los métodos de procesamiento los miARNs, los siARNs y los piARNs (Figura 5) (74).

Los siARNs (*small interference RNAs*) son pequeños ARNs de doble cadena de 21-25 nucleótidos, cuyas hebras son exactamente complementarias exceptuando dos nucleótidos a

cada extremo que son incorporados al RISC. El RISC utiliza los siARNs como guías para clavarse en ARNs mensajeros complementarios y evitar la expresión del gen destruyendo al ARN mensajero. La respuesta evolutivamente conservada a los ARNs exógenos de doble cadena puede reflejar un mecanismo de defensa endógeno contra la infección de ácidos nucleicos de virus y parásitos (4).

Tanto miARNs como siARNs median la regulación de la expresión de genes, sin embargo, su biogénesis y métodos de silenciamiento difieren. Los miARNs regulan los genes endógenos y siARNs defienden la integridad del genoma de la respuesta externa. Los miARNs y siARNs utilizan el mismo RISC para silenciamiento directo, aunque los miARNs encajan imperfectamente con el mRNA impidiendo que produzca proteínas y los siARNs se unen perfectamente con el mRNA destruyéndolo. La mayoría de los miARNs actúan intracelularmente, pero algunos miARNs existen en compartimentos extracelulares y se han estudiado como mediadores en la comunicación célula-célula (75).

Los ARNs asociados a Piwi (piARNs) son pequeños ARNs no codificantes de una sola hebra de entre 23 a 30 nucleótidos que se encarga de silenciar o bloquear los transposones, genes que cambian de lugar en el genoma, careciendo de la forma en horquilla típica de los miARNs (76). Los piARNs actúan sobre la cromatina reprimiendo histonas e impidiendo así que haya altos niveles de transposones, además también pueden bloquear la traducción de un transcrito en el citoplasma asociándose con una de las proteínas Argonauta, concretamente la Piwi (77). Inicialmente se pensaba que esta familia de ARNs no codificantes se hallaba solamente en células germinales, pero estudios posteriores han revelado la presencia de esta proteína también en células somáticas (78).

Las proteínas Piwi se han relacionado con distintos tipos de cáncer, por ejemplo, la PiwiL2 se expresa de manera ectópica en células madre precancerosas y en células de cáncer de mama cultivadas, y ha sido sugerido como marcador pronóstico en el cáncer de mama y una posible diana terapéutica (79). Otro ejemplo es la proteína Hili, otro tipo de proteína Piwi, cuya expresión se ha relacionado con genes pluripotentes como son el Oct4 y el SOX2 en cáncer colo rectal, o la proteína Hiwi que se relacionado con la proliferación y metástasis en el carcinoma hepatocelular (80, 81)

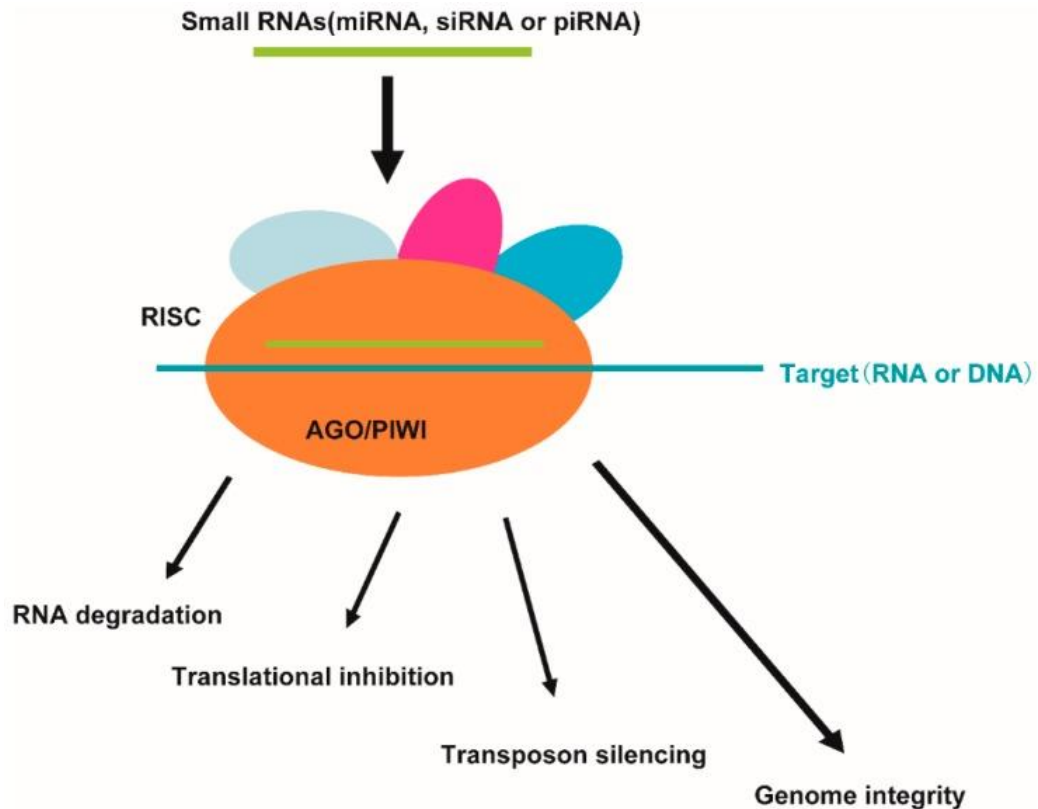


Figura 5. Relación entre los pequeños ARNs no codificantes y como regulan la expresión génica (74).

Los tres ARNs pequeños anteriormente descritos ejecutan sus efectos mediante la asociación con las proteínas Argonautas, las cuales se dividen a su vez en tres subfamilias, AGO, Piwi y WAGO, ésta última sólo descubierta en gusanos. Las proteínas AGO reclutan pequeños ARNs específicamente para formar el complejo RISC, los pequeños fragmentos de ARN le sirven a la proteína AGO como guías para llevar a cabo su función reguladora. La incorporación a la proteína AGO hace posible la subsistencia de la mayoría de estos pequeños ARNs en la célula que de otra manera serían degradados (74). Una excepción a esta regla es la manera que tiene el piARN piR-55490 de regular la expresión génica, ya que estudios recientes aseguran que es capaz de unirse al ARN mensajero del mTOR directamente e inducir su degradación sin mediación de la proteína AGO (82).

Otros de los ARNs no codificantes que tienen una función reguladora son los lncARNs (*long non coding RNA*) formados por cadenas de unos 200 nucleótidos de ARN. Transcritos por la ARN polimerasa II estos ARNs no codificantes han sido estudiados en distintos procesos celulares unidos a ADN, ARN o proteínas (Figura 6).

La expresión de los lncARNs en situaciones fisiológicas los relaciona con funciones como la diferenciación celular, el mantenimiento de la homeostasis de la célula (83), así como en el estado de la cromatina modulando la expresión de algunos genes (84). La función específica de la mayoría de ellos se desconoce, aunque de otros se han estudiado en profundidad como el Malat, HOTAIR o HULC (85). La función del HOTAIR se ha estudiado en el cáncer de pulmón cuya asociación con el miR-326 parece aumentar la proliferación y migración celular (86). Otra interacción conocida es la del lncARN HULC con el miR-372 en el carcinoma hepatocelular, dicha interacción inhibe la función del miR-372 aumentando la expresión de la proteína CREB

en líneas celulares (87). Parece que existe una amplia red de interacciones entre los microARNs y los lncARNs, aún en estudio, que hace aún más complejo el conocimiento de la regulación génica (88).

Igual que pasa con los microARNs, los lncARNs pueden salir de la célula mediante vesículas extracelulares y se cree que este mecanismo les da la posibilidad de funcionar también como mediadores en la comunicación célula-célula (89).

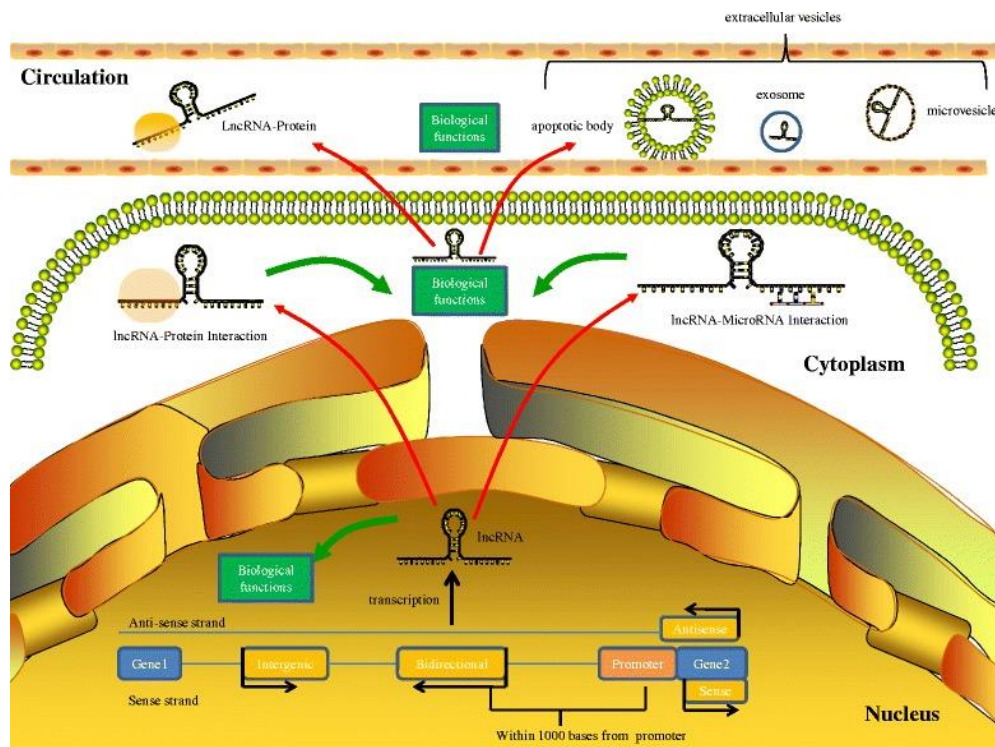


Figura 6. Biogénesis y funciones de lncARNs (90).

Su expresión diferencial ha sido estudiada en patologías como el cáncer de pulmón, colo rectal y hepatocelular (91-93). La medición de la expresión de los lncARNs también se puede hacer con microarrays, qRT-PCR o ultrasecuenciación. Igual que con los demás ARNs no codificantes con función reguladora, los lncARNs han sido propuestos como biomarcadores del cáncer y marcadores pronóstico para relacionar su expresión con tumores resistentes a la quimioterapia (90). Con respecto al tejido oral el grupo de Gibb et al. estudió la expresión de lncARNs en lesiones orales pre malignas con respecto al tejido oral sano e identificaron un total de 12 lncARNs diferencialmente expresados (94). Sin embargo, los resultados de los estudios son muy diversos y contradictorios como pasa con los microARNs, debido fundamentalmente al tipo de muestra utilizada y el método de análisis (90).

Los snoARNs (*small nucleolar RNA*) son una gran clase de ARN no codificante encontrados en secuencias, hasta ahora, de eucariotas, concretamente en secuencias intrónicas del gen huésped del que proceden, aunque también pueden provenir de un transcrito independiente. Los identificados como snoARNs largos suelen ser dos snoARNs que se encuentran en el mismo intrón (95) y por lo tanto de una misma secuencia intrónica puede salir un snoARN o varios (96). La función principal estudiada en este tipo de pequeños ARNs no codificantes es la biogénesis de los ribosomas, concretamente, son componentes de los

complejos ribonucleoproteicos (snoRNP) (97). Se dividen principalmente en dos grupos, la caja C/B y la H/ACA, que difieren en términos de motivos característicos y estructura, así como los sitios de unión de las proteínas y las modificaciones químicas que catalizan (Figura 7) (95).

La función de las cajas C/D y H/ACA de los snoARNs se realiza en el ARN pre-ribosomal, modificando nucleótidos en sitios específicos. La diferencia entre dichas cajas es la secuencia que guía a las enzimas para las modificaciones, los miembros de la caja C/D están implicados en la 2'-O-metilación, y los de la caja H/ACA en la pseudouridilación.

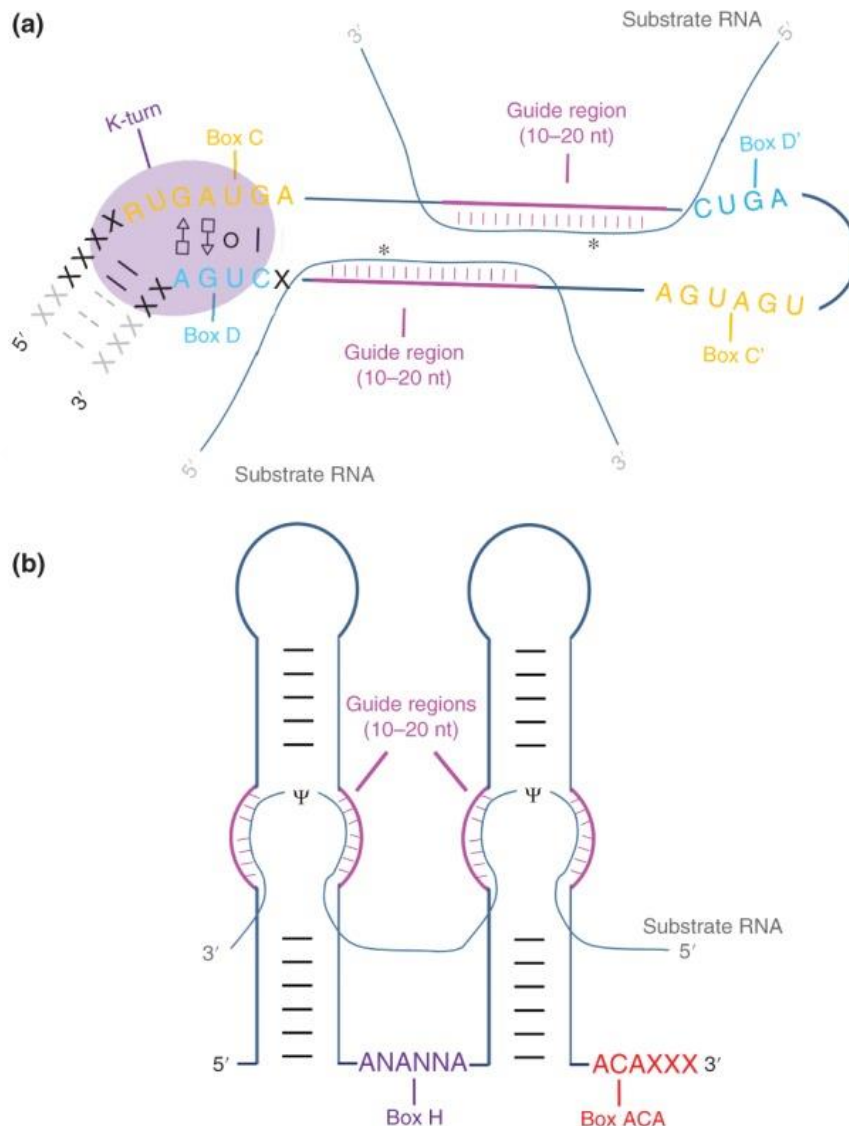


Figura 7. Los dos posibles motivos de los snoARNs (cajas C/D y H/ACA) (95).

Mediante ultrasecuenciación e inmunoprecipitación por la unión de estos ARNs a determinadas proteínas, se identifican nuevos snoARNs, aunque la falta de asociación de algunos snoARNs a complejos ribonucleicos en los estudios, hace pensar que cumplen otras funciones reguladoras distintas a las implicadas en la biogénesis de los ribosomas. Algunos estudios sugieren que los snoARNs también pueden participar en la regulación de corte alternativo y modificaciones postranscripcionales de mARNs (98). Los snoARNs han sido

descritos como elementos genéticos móviles, es decir, pueden migrar intragenómicamente a diferentes localizaciones y copiarse a sí mismos usando mecanismos de retrotransposición (99).

Por lo tanto, las alteraciones en la expresión de dichos ARNs pueden afectar a varios procesos vitales y patológicos, convirtiéndose así en objeto de estudio como dianas para tratamiento y diagnóstico de patologías humanas neurodegenerativas, oncológicas o virales(100). El aumento de expresión del ACA11 se ha observado en procesos cancerosos y se estudia su relación con los procesos de estrés oxidativo. La expresión aumentada de éste snoARN parece producir un aumento de resistencia a la quimioterapia y aumento de proliferación en líneas celulares de mieloma múltiple (101).

Muchos de los snoARNs descritos no tienen dianas o funciones conocidas hasta ahora y se les ha denominado como snoARNs huérfanos (*orphan snoRNAs*) (102).

A diferencia de los snoARNs, los scaARNs (*small Cajal body-specific RNAs*) se acumulan en los cuerpos de Cajal, unas organelas presentes en el nucleoplasma. Los scaARNs pueden tener también en su secuencia motivos de cajas C/D y H/ACA guiando así la metilación y la pseudouridilación de los snARNs (*small nuclear RNAs*). La expresión de estos ARNs también se ha visto desregulada en procesos patológicos como el mieloma múltiple (103).

Los microARNs están codificados a lo largo del genoma principalmente localizados en regiones intergénicas (entre un 57% y un 69%), seguido de regiones intrónicas (entre un 12% y un 17%), exónicas (en torno al 5%), regiones largas no codificantes (5%) y regiones repetidas (8%). De las regiones genómicas anteriormente descritas cerca del 50% tienden a la alteración en diferentes tipos de cáncer y son colectivamente denominadas como regiones genómicas asociadas al cáncer (*Cancer Associated Genomic Regions: CAGRs*) La asociación de los miARNs con el cáncer se debe a esta relación de la localización en regiones genómicas afectadas en procesos cancerosos, además, las mutaciones de la maquinaria de biogénesis de miARNs conlleva a la infra expresión de los microARNs y a la tumorigénesis. En el estudio de Kawahara et al., analizaron los niveles de Drosha y Dicer en muestras de parafina de 61 pacientes con COCE que habían recibido tratamiento inefectivo de quimioterapia basado en el uso del 5-fluoracilo. Cuyos resultados revelaron una baja supervivencia y resistencia al quimioterápico en aquellas muestras donde la expresión del Dicer era baja (104).

En los últimos años ha aumentado el interés por los microARNs ya que se han publicado estudios que demuestran el papel de éstos en la regulación de procesos tales como el ciclo, la diferenciación y la apoptosis celular (5). Los microARNs pueden expresarse de manera ubicua, es decir, en todo tipo de tejidos o expresarse en uno específicamente (4). También pueden expresarse de manera puntual en etapas determinadas del desarrollo de la célula u órgano. En términos globales, los estudios revelan que la expresión de los miARNs se reduce en procesos cancerosos (69, 105).

Mientras que la proteómica de la mayoría de los organismos está bastante bien definida, es decir los genes que codifican proteínas, el transcriptoma de los ARNs no codificantes está todavía en fases iniciales. Un análisis informático reveló que los miARNs pueden regular al menos el 30% de todos los genes humanos (2).

Las características específicas de los microARNs los hace atractivos para el tratamiento y diagnóstico precoz de muchas patologías. A diferencia de los mARNs que son inestables, los microARNs parecen estar protegidos de las ribonucleasas del suero de la sangre mediante un sistema vesicular indeterminado y son detectados también en fluidos corporales como la saliva a pesar de que estos medios pueden contener enzimas que degradan el ARN (106, 107).

2.2.2 Identificación de microARNs y perfil de expresión

Identificar un miARN no es sencillo. Principalmente porque no todos los ARNs de 24 nucleótidos son miARNs. La mayoría de los pequeños ARNs que se aíslan de una muestra son fragmentos de ARNs ribosomales, de mensajeros, de transferentes, etc.

Una de las estrategias para identificar un miARN consiste en utilizar la bioinformática a partir de las secuencias obtenidas y compararlas con las bases de datos del genoma humano. Como puede haber muchas secuencias aún no identificadas, debemos intentar ubicarlas en los posibles *loci* del genoma. Es importante considerar que algunos microARNs son transcritos individualmente y otros proceden de la misma molécula, como pre-miARN (67), que posteriormente es procesada en múltiples miARNs maduros (2). También debemos explorar si el ARN maduro puede formar una estructura tipo tallo-asa dentro del genoma.

La manera de comprobar la existencia de un microARN es hacer un análisis tipo *Northern Blot*, detección de la molécula de ARN mediante hibridación, para comprobar la expresión individual de las secuencias candidatas (69). Uno de los pasos más interesantes sobre la existencia y eficacia de un microARN es determinar el gen a cuya expresión afecta y para ello hay distintos métodos. Una de las maneras es medir la existencia de la proteína, mediante *Western Blot*, que consideremos diana tras la introducción de un microARN en una célula. También podemos demostrarlo llevando a cabo ensayos de luciferasa. Si el microARN realmente se une a un ARN mensajero determinado que lleva asociada la luciferasa, ésta no se observará, mientras que, si el microARN no se une, el ARN mensajero se traducirá sin problema junto con la luciferasa y observaremos con un luminómetro la presencia de ésta.

Una vez se identifican nuevos miARNs, se suben a una base de datos. La base de datos por excelencia es la miRBase (<http://www.mirbase.org/>, acceso el 30 de septiembre de 2016) que proporciona las secuencias de los miARNs publicados (Figura 8). Cada entrada en la base de datos representa una porción del transcrito de un miARN determinado con información de la localización y la secuencia del miARN maduro. Los microARNs se nombran usando el prefijo miR, un guión y un único número identificativo, por ejemplo, miR-1, miR-2. Los genes que codifican el microARN también usan el prefijo “mir” pero se escriben con letras itálicas, por ejemplo, *mir-1*. Los números se asignan secuencialmente, independientemente del organismo en el que se hallan descubierto (108). Teniendo en cuenta que un microARN tiene dos hebras complementarias la identificación sola en el genoma no es suficiente, hace falta determinar qué secuencia es la expresada bien 5', con el sufijo -5p, bien 3', con el sufijo -3p (67).

miRBase

Home Search Browse Help Download Blog Submit

Search miRBase

By miRNA identifier or keyword
Enter a miRNA accession, name or keyword:
[Input field] [Enviar] [Restablecer] [Example]

By genomic location
Select organism, chromosome and start and end coordinates. Leave the start/end boxes blank to retrieve all miRNAs on the selected chromosome.
Choose species: [Dropdown] Chr: [Dropdown] Start: [Input] End: [Input] [Get sequences]

For clusters
Select organism and the desired inter-miRNA distance.
Choose species: [Dropdown] Inter-miRNA distance: [Input: 10000] [Get clusters]

By tissue expression
Select organism and tissue.
Choose species: [Dropdown] Select tissue: [Dropdown] [Get experiments]

Figura 8. El miRBase recopila información sobre microARNs.

A diferencia de los mRNA, los microARNs carecen de una secuencia común como puede ser la cola de poly(A), muy útil como método de selección, o un sitio de unión universal para su identificación. Esto es importante porque los miARNs representan una pequeña fracción (0.01%) de la masa total de ARN y por ello debe ser selectivamente detectado. Los microARNs en una familia (por ejemplo, *let-7*) pueden diferir en un solo nucleótido, haciendo la habilidad de discriminar entre dos formas en un solo nucleótido importante. Los microARNs se clasifican en familias según su secuencia homóloga, más concretamente la secuencia raíz (*seed sequence*), y se cree que diferentes microARNs dentro de la misma familia pueden tener efectos similares en la expresión génica (109). Existe una base de datos, Rfam (<http://rfam.xfam.org/>, acceso el 30 de septiembre de 2016) que agrupa los microARNs en familias.

La expresión de microARNs se ha observado en condiciones fisiológicas normales en líneas celulares y modelos animales. Los procesos en los que se han observado van desde el desarrollo y mantenimiento del organismo hasta la diferenciación tisular. También han sido estudiados en células madre (*stem cells*) como reprogramadores del destino celular, así como biomarcadores para identificar el estado de diferenciación tisular en cánceres de origen desconocido (110).

Estudiar estas pequeñas moléculas conlleva muchos retos, pero los avances tecnológicos permiten tener a nuestro alcance varias plataformas que analizan la expresión de los microARNs. Los métodos existentes para la extracción del ARN total de las muestras pueden afectar de manera directa a los resultados del estudio, ya que la mayoría de estos métodos suelen desechar o degradar el miARN.

Las muestras de donde se extrae el miARN pueden tener distintos formatos tales como tejido congelado, líneas celulares o muestras de parafina. El protocolo que se suele utilizar es similar al de la extracción de ARN total pero con la modificación de que se retiene la fracción de los miARNs. Normalmente las mayores cantidades de miARN se obtienen bien de líneas celulares, bien de tejido fresco (aunque en este último la cantidad puede variar en función del tipo de tejido utilizado) (67). La calidad y la cantidad del ARN extraído son importantes para los resultados de los estudios. La calidad de ARN total suele medirse usando espectrofotometría

y electroforesis capilar, dicha tecnología nos facilita el RIN (*RNA Integrity Number*) que es el número de integridad de ARN cuyos valores van desde 10 (intacto) hasta 1 (totalmente degradado) (68).

Actualmente contamos con tres tecnologías bien establecidas para cuantificar la expresión de microARNs como son qRT-PCR (*quantitative reverse transcription PCR*), microarrays y secuenciación masiva (ARN-Seq) (Tabla 1 y Figura 9).

La qRT-PCR consiste en la transcripción inversa del miARN en cADN (ADN complementario), seguida de qPCR, monitorizando la acumulación del producto de reacción. Un aspecto beneficioso de este sistema es la fácil incorporación de los laboratorios que ya están familiarizados con RT-PCR. Las reacciones se llevan a cabo de forma multitudinaria y paralela, esto significa que son cientos de reacciones de qRT-PCR midiendo diferentes miARNs y usando las mismas condiciones de reacción. Las placas comercialmente hechas a medida pueden ser diseñadas tanto para examinar un pequeño grupo de microARNs determinado, como por ejemplo aquellos que regulan un mecanismo de interés, o analizar una gran cantidad de miARNs (67). La qRT-PCR es un método establecido, sensible y específico que puede ser usado para cuantificación absoluta, aunque no puede identificar microARNs nuevos.

Los métodos de secuenciación se llevan a cabo para conocer el orden de los nucleótidos en ADN o ARN. La ventaja de la secuenciación masiva con respecto a las otras plataformas es su altísima precisión y la capacidad para identificar microARNs nuevos ya que no es necesario conocer la secuencia de antemano. Sin embargo, la cuantificación de dichos microARNs, es relativa, ya que se hace en función del número de lecturas de una secuencia control determinada. Así que la comparación entre muestras con mucha variación en la expresión de microARNs no es muy fiable, ya que la cuantificación absoluta no es posible. El coste de la tecnología de ultrasecuenciación es elevado, aunque dicha limitación se ha contrarrestado con los códigos de barras utilizados para poder secuenciar muchas muestras al mismo tiempo (67). Otra de las desventajas es la infraestructura adicional necesaria para la interpretación de los datos así, como los sesgos relacionados con los procedimientos enzimáticos usados durante la preparación de las muestras que favorece la captura de algunos microARNs sobre otros. Para el análisis de datos y la interpretación en la secuenciación masiva es necesario probar distintos algoritmos de mapeo de las lecturas y cuantificación de los niveles de expresión (67).

Uno de los mayores retos en los estudios de microARNs como biomarcadores es la falta de tejido tumoral de alta calidad solicitada para los análisis de expresión con tecnología de ultrasecuenciación (111). Los tejidos en parafina son una fuente de incalculable valor para la investigación clínica. Sin embargo, los ácidos nucleicos extraídos de dicha fuente, especialmente en el caso del ARN, están fragmentados y químicamente modificados, haciendo difícil su uso en estudios moleculares. Esto no parece afectar a los resultados en los análisis de expresión como muestran los estudios que comparan los perfiles de expresión de tejido en parafina y congelado tanto usando métodos de ultrasecuenciación como con qRT-PCR (112, 113).

Los microarrays tienen menos especificidad que la qRT-PCR o que la secuenciación masiva de ARNs, no sirve para identificar nuevos miARNs y es difícil usarla para cuantificación absoluta. Pero es más barata que el resto de los métodos usados para los perfiles de expresión y permite realizar gran cantidad de mediciones al mismo tiempo.

Los microarrays fueron los primeros métodos en ser usados como análisis paralelos de gran número de microARNs. Son una colección de matrices en formato cuadrículado llamado chip, donde se colocan secuencias génicas de ARN. La secuencia que se une a la sonda la denominamos diana. La complementariedad de las bases entre las secuencias diana y las sondas que, por defecto, están en cada una de las matrices produce una cantidad de luz medible. Dicha luz es escaneada y analizada permitiendo conocer los genes expresados en la muestra. A mayor hibridación en las muestras aumentará la intensidad del color rojo y si la hibridación de un gen determinado es menor que la media, predominará el verde. Si la hibridación comparando ambos tipos de muestras, casos y controles, es similar, el color que se aprecia es más oscuro- negro. El análisis de la imagen requiere tecnología adicional para identificar los puntos con intensidad lumínica variable, los microARNs a los que corresponden los puntos del microarray y para la cuantificación final con la que se establece la expresión diferencial.

Tecnología	Ventajas	Desventajas	Cantidad de muestra	Coste
PCR de Transcripción reversa cuantitativa (qRT-PCR)	Método sensible y específico. Puede ser usado para cuantificación absoluta	No puede identificar nuevos microARNs. El procesamiento es de rendimiento medio teniendo en cuenta al número de muestras que se pueden estudiar por día.	<ng ó ng- μ g	\$\$
MicroARNs microarray	Bastante menos costoso y alto rendimiento con respecto al número de muestras que pueden ser analizadas por día.	Generalmente menos especificidad que qRT-PCR o secuenciación de ARN. Dificultad para usar con cuantificación absoluta. No puede identificar nuevos microARNs.	ng- μ g	\$
Secuenciación de ARN: plataformas <i>next-generation</i> de alto rendimiento	Alta precisión en la distinción de pequeños microARNs que se parecen entre sí, incluidos los isomiRs; puede detectar nuevos microARNs.	No puede ser utilizado para cuantificación absoluta. Necesita un análisis bioinformático adicional importante	ng- μ g ó > μ g	\$\$\$
Secuenciación de ARN: plataformas <i>next-generation</i> a pequeña escala	Alta precisión en la distinción de pequeños microARNs que se parecen entre sí. Puede detectar nuevos microARNs.	No puede ser utilizado para cuantificación absoluta. Necesita un análisis bioinformático adicional importante	ng- μ g ó > μ g	\$\$\$

Tabla 1. Tipos de tecnología para analizar el perfil de expresión de microARNs (67).

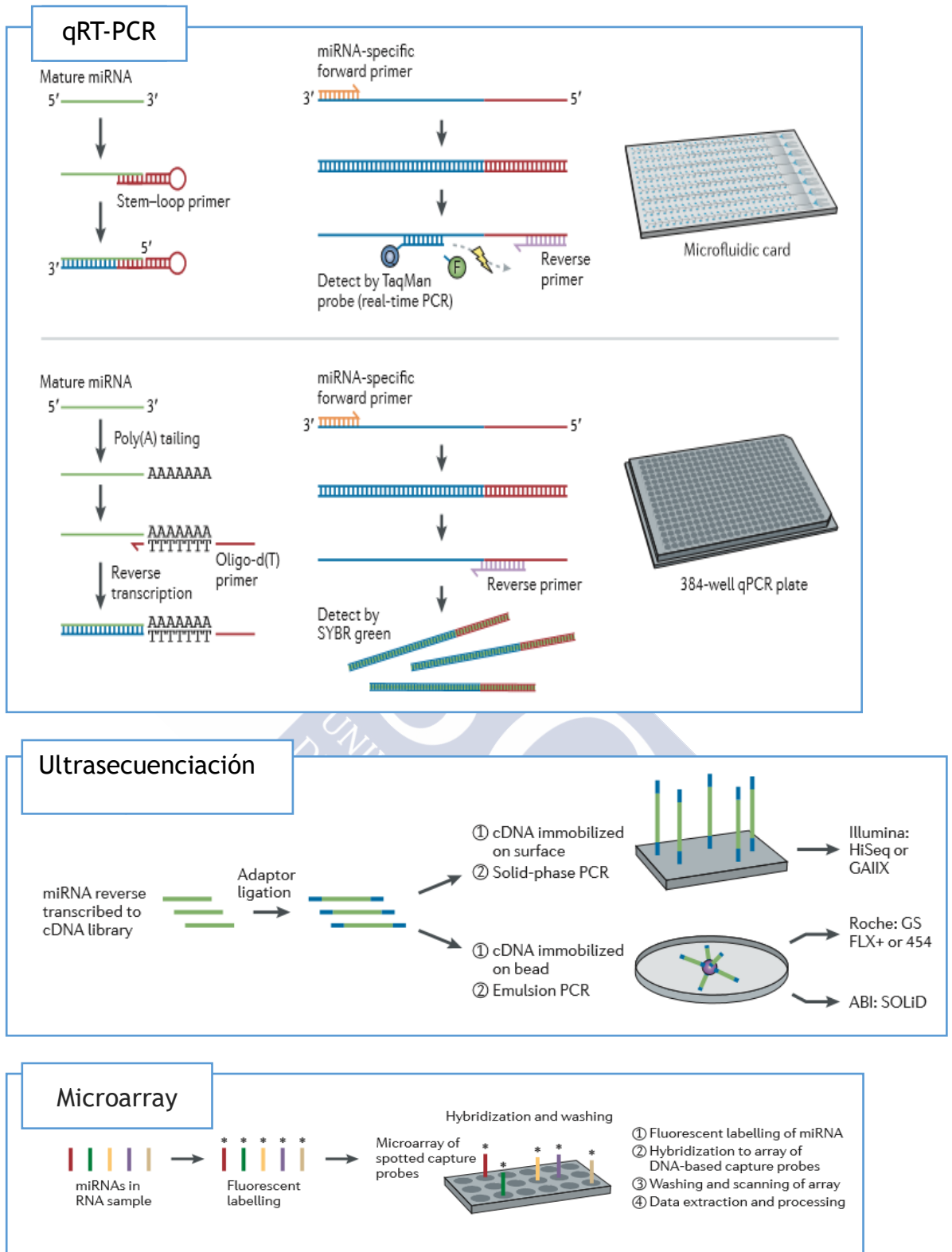


Figura 9. Métodos para analizar el perfil de expresión de microARNs (67).

2.2.3 MicroARNs como biomarcadores en el COCE

La alteración de la expresión de los microARNs se ha asociado con fenotipos clínicos específicos de tumores tales como recurrencia, desarrollo de metástasis y supervivencia tras la cirugía (6). Para desarrollar terapias específicas contra el cáncer, el conocimiento de las diferencias entre células normales y malignas es esencial. Básicamente, en el campo de la oncología, los microARNs se clasifican como oncomiRs, cuando silencian genes supresores tumorales, o como miRs supresores de tumores, cuando silencian oncogenes, y su desregulación se manifiesta como sobre o infra expresión.

El perfil de expresión de los microARNs ha sido estudiado en muchos tipos de tumoraciones malignas y se han descubierto determinados microARNs como posibles biomarcadores del cáncer (7).

Los estudios sobre expresión diferencial de los microARNs en el COCE son numerosos (114). Sin embargo, los resultados entre dichos estudios son muy dispares y en ocasiones contradictorios. Ejemplo de esto es el trabajo de Li J. et al. de expresión de microARNs en el cáncer de lengua con tejido congelado, donde el miR-21 aparece como sobre expresado mientras que en el de Sun L. et al., sobre el mismo tipo de cáncer pero con líneas celulares, dicho microARN aparece infra expresado (8, 9). Un estudio sobre la asociación entre una expresión aumentada del miR-146a y el riesgo desarrollo de metástasis nodular en pacientes con COCE, fue positiva para aquellos pacientes con polimorfismo C (rs2910164) (115), sin embargo, estudios posteriores sobre el mismo polimorfismo indicaron que no existía asociación con la progresión del COCE (116). El miR-184, por ejemplo, mostró niveles aumentados en un estudio de carcinoma escamoso de lengua (117), mientras que en otro estudio se relacionó su disminución de expresión con la progresión en el cáncer oral (118).

En la tabla 2 se resumen los estudios sobre los perfiles de expresión diferencial del COCE, reflejando el tipo de muestra y la tecnología utilizada, así como los microARNs que aparecen desregulados en cada estudio:

Título	Año	Muestra	Tecnología	Sobre expresados	Infra expresados
Integrative Analysis in Oral Squamous Cell Carcinoma Reveals DNA Copy Number-Associated miRNAs Dysregulating target genes (119)	2012	Tejido congelado 20 tumores metastásicos de COCE y 17 no metastásicos.	qRT-PCR	hsa-miR-150, hsa-miR-155, hsa-let-7g, hsa-miR-195, hsa-miR-142-3p, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-497, hsa-miR-146b-5p, hsa-miR-218, hsa-miR-29c, hsa-miR-146a, hsa-miR-29a, hsa-miR-26b, hsa-miR-145, hsa-miR-7f, hsa-miR-34a, hsa-miR-148a, hsa-miR-100, hsa-miR-10a, hsa-miR-29b, hsa-miR-15a, hsa-miR-125b, hsa-miR-192, hsa-miR-199a-3p, hsa-miR-26a.	hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-92b, hsa-miR-23b, hsa-miR-149, hsa-miR-95.
Salivary MicroRNAs in Oral Cancer (120)	2013	Saliva (20 pacientes sanos, 20 con lesiones pre-malignas que no malignizaron en un periodo de 3 años, 20 con COCE y 20 con estomatitis aftosa recurrente)	qRT-PCR	miR-21 y miR-184 en COCE y lesiones pre-malignas cuando se comparan con controles sanos. No hubo diferencia con controles sanos y pacientes con estomatitis aftosa.	miR-145 en COCE y lesiones pre-malignas en comparación con controles sanos
MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used as prognostic marker in oral squamous cell carcinoma (2)	2013	Líneas celulares Tw2.6 y TW2.6 MS-10 (COCE más agresivo que el primero).	qRT-PCR	hsa-miR-590-5p, hsa-miR-141, hsa-miR-29b	hsa-miR-1915, hsa-miR-17, hsa-miR-92a, hsa-miR-20b, hsa-miR-19b, hsa-miR-20a, hsa-miR-1246, hsa-miR-1225-5p
Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis (25)	2013	8 muestras de leucoplasias que acabó en COCE y 7 leucoplasias no progresivas todas de tejido congelado.	Microarrays y corroboración con qRT-PCR	hsa-miR-10b-5p, hsa-miR-708, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-21, hsa-miR-335-5p, hsa-miR-144*, hsa-miR-25-3p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-660-5p, hsa-miR-140-5p, hsa-miR-590-5p	hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-145-5p, hsa-miR-99b-5p, hsa-miR-100-5p, hsa-miR-125b-5p, hsa-miR-181b, hsa-miR-181c, hsa-miR-197-3p, hsa-miR-331-3p, hsa-miR-15a-5p, hsa-miR-150-5p, hsa-miR-7a-5p.

MicroRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma (121)	2013	29 tumores COCE en tejido congelado y 7 controles	qRT-PCR	hsa-miR-31, hsa-miR-31*, hsa-miR-135b, hsa-miR-193a-5p, hsa-miR-103, hsa-miR-224, hsa-miR-93, hsa-miR-200c, hsa-miR-183, hsa-miR-203, hsa-miR-21, hsa-miR-223.	hsa-miR-133a, hsa-miR-376c, hsa-miR-411, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-489, hsa-miR-139-5p, hsa-miR-483-5p, hsa-miR-30e-3p, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-let7c, hsa-miR-486-5p.
microRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation (122)	2013	15 Casos tejido congelado de COCE y tejido adyacente.	Microarrays y corroboración con qRT-PCR	hsa-miR-196a, hsa-miR-196b, hsa-miR-33, hsa-miR-19a, hsa-miR-33b, hsa-miR-142-5p, hsa-miR-503, hsa-miR-31, hsa-miR-7, hsa-miR-19b, hsa-miR-135b, hsa-miR-632, hsa-miR-504, hsa-miR-187, hsa-miR-339, hsa-miR-302d, hsa-miR-34b, hsa-miR-34c, hsa-miR-455, hsa-miR-9, 296, hsa-miR-301, hsa-miR-130b, hsa-miR-196b, hsa-miR-200a, hsa-miR-210, hsa-miR-17-3p, hsa-miR-302b*, hsa-miR-224, hsa-miR-183, hsa-miR-138, hsa-miR-188, hsa-miR-92b, hsa-miR-182, hsa-miR-144, hsa-miR-146b, hsa-miR-182*, hsa-miR-149, hsa-miR-141, hsa-miR-610	hsa-miR-1, hsa-miR-30a-3p, hsa-miR-139, hsa-miR-133a, hsa-miR-486, 135a, hsa-miR-204, hsa-miR-206, hsa-miR-411, hsa-miR-499, hsa-miR-99a, Hsa-miR-10b, hsa-miR-299-5p, hsa-miR-379, hsa-miR-100, hsa-miR-30a-5p, hsa-miR-95, hsa-miR-378, hsa-miR-218, hsa-miR-368, hsa-miR-363, hsa-miR-128a, hsa-miR-655, hsa-miR-376a, hsa-miR-628, hsa-miR-487b, hsa-miR-410, hsa-miR-140, hsa-miR-801, hsa-miR-376a*, hsa-miR-154, hsa-miR-432, hsa-miR-328
High-throughput sequencing of small RNA transcriptome reveals critical biological features targeted by microRNAs in cell models used for squamous cell cancer research (123)	2013	Líneas celulares SCC25 y queratinocitos normales.	Ultrasecuenciación (SOLiD)	hsa-miR-409, hsa-miR-3545, hsa-miR-495, hsa-miR-376c, hsa-miR-379, hsa-miR-375a, hsa-miR-296, hsa-miR-382, hsa-miR-708, hsa-miR-4305	hsa-miR-181d, hsa-miR-10a, hsa-miR-3940, hsa-miR-4724, hsa-miR-4521, 4700, hsa-miR-181c, hsa-miR-4459, hsa-miR-935, hsa-miR-210

Genomewide Study of Salivary microRNAs for detection of oral cancer (124)	2014	Saliva, cuatro grupos diferentes: 9 pacientes con COCE, 8 con COCE en remisión, 8 con liquen plano y 9 controles sanos (34 muestras en total)	nCounter NanoString	miR-24, miR-27b (COCE vs control)	miR-136, miR-147, miR-1250, miR-148a, miR-632, miR-646, miR-668, miR-877, miR-503, miR-220a, miR-323-5p (COCE vs control)
Alterations in miRNA expression patterns in whole blood of OSCC patients (125)	2013	Muestras de sangre de 50 pacientes con COCE y 35 voluntarios sanos	qRT-PCR	hsa-miR-3162, hsa-miR-3651, hsa-miR-494, hsa-miR-1914*, hsa-miR-4299, hsa-miR-4284, hsa-miR-3653, hsa-miR-500a, hsa-miR-378, hsa-miR-762, hsa-miR-3656, hsa-miR-320a	hsa-miR-186, hsa-miR-7d*, hsa-miR-424, hsa-miR-4318, hsa-miR-15b*, hsa-miR-326, hsa-miR-100, hsa-miR-125b, hsa-miR-30e*.
microRNA expression profiling of oral carcinoma, identifies new markers of tumor progression (126)	2010	Muestras de tejido congelado de 8 tumores sin metástasis y 7 con metástasis de COCE.	Microarrays	hsa-miR-489, hsa-miR-129, hsa-miR-23a, hsa-miR-214, hsa-miR-23b, hsa-miR-92, hsa-miR-25, hsa-miR-210, hsa-miR-212, hsa-miR-515, hsa-miR-146b, hsa-miR-21, hsa-miR-338	hsa-miR-520h, hsa-miR-197, hsa-miR-378, hsa-miR-135b, hsa-miR-224, hsa-miR-34a.
Oral Squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumorigenesis (13)	2016	Tejido congelado de 29 muestras con COCE y tejido adyacente del mismo paciente como control.	Microarrays y corroboración con qRT-PCR	hsa-miR-29b, hsa-miR-21, hsa-miR-30e, hsa-miR-31, hsa-miR-31*, hsa-miR-193-3p, hsa-miR-552, hsa-miR-19a, hsa-miR-19b, hsa-miR-141, hsa-miR-101, hsa-miR-144, hsa-miR-29c, hsa-miR-1275, hsa-miR-142-3p	hsa-miR-199a/b-3p, hsa-miR-15b, hsa-miR-16, hsa-miR-let-7a, hsa-miR-let-7d, hsa-miR-126, hsa-miR-203, 199a-5p, hsa-miR-let-7f, hsa-miR-17, hsa-miR-106a, hsa-miR-27a, hsa-miR-130a, hsa-miR-24, hsa-miR-223, hsa-miR-143, hsa-miR-342-3p, hsa-miR-451, hsa-miR-let-7g, hsa-miR-200a, hsa-miR-26a, hsa-miR-le-t7i, hsa-miR-15a, hsa-miR-195, hsa-miR-1259, hsa-miR-308

Tabla 2. Estudios de expresión diferencial de microARNs en el COCE

Los estudios de perfiles de expresión de cáncer de cabeza y cuello también presentan contradicciones (73, 125, 127). La mayoría de las revisiones coinciden en que las principales razones por las que los perfiles de expresión son tan diferentes en sus resultados son el tipo de muestra utilizada (tejido congelado, parafina o líneas celulares) y la localización u el origen de las mismas (cavidad oral, orofaringe, faringe o laringe indistintamente). Los labios, la cavidad oral y la orofaringe, normalmente tienen el primer contacto con los carcinogénicos provenientes del aire, alimentos y bebidas y por ello presentan diferente exposición que la laringe o la hipofaringe (15). Además, el uso de diferentes plataformas para el perfil de microARNs supone la aplicación de diferentes estrategias de normalización lo cual da resultados de expresión inconsistentes, sin olvidar que el tipo de tumores usados es muy variado desde lesiones premalignas, lesiones incipientes a lesiones avanzadas con metástasis (128, 129). Tampoco podemos olvidar la influencia que las costumbres y el ambiente tienen sobre el cáncer, así el uso de poblaciones con entornos tan dispares ayuda a aumentar esta heterogeneidad de datos (130).

Algunos autores sugieren que las líneas celulares cancerosas estudiadas solas, son inapropiadas para detectar microARNs como biomarcadores o para establecer un perfil de expresión diferencial (15, 73). Sin embargo, no hay duda de que los estudios funcionales en líneas celulares que pretenden demostrar las dianas de los microARNs o analizar el efecto que determinados microARNs tienen sobre un tejido específico, son efectivos. El primer paso en este tipo de experimentos es medir la concentración del microARN que se va a estudiar en la línea celular. Aquellos estudios que usaron más de una línea celular observaron que la expresión de base de determinados microARNs variaba en función de la línea celular estudiada (7, 10-12).

La mayoría de los estudios de perfiles de expresión en el COCE hasta ahora representan bien modelos de líneas celulares bien tejido de muestras de carcinoma de cabeza y cuello en su totalidad. Aunque los tumores de faringe, laringe y orales están agrupados en los carcinomas de cabeza y cuello el proceso de carcinogénesis es bastante diferente con lo que nos encontramos con una gran heterogeneidad molecular (13).

Lin llevó a cabo un meta análisis para valorar el papel de los microARNs como biomarcadores para detectar el cáncer oral. Seleccionaron ocho estudios de perfiles de expresión concluyendo que se necesitan más trabajos para evaluar rigurosamente el perfil de expresión de miARNs, y atribuye las diferencias en los resultados al diseño del estudio, tamaño o tipo de la muestra, así como a la raza del paciente (114). Quizá otro de los factores que pueden influir en el resultado es la calidad de las muestras utilizadas. La mayoría de los estudios no hablan de ello en cuanto a pureza y degradación, ya que por ejemplo en algunos kits de microarrays se permite utilizar muestras sin cumplir unos requisitos de pureza o integridad mínima. De los estudios de expresión diferencial de microARNs en COCE sólo hallamos uno que especificara el descarte de aquellas muestras que no alcanzaban unos valores mínimos de calidad y pureza (121).

Otras de las causas por la que puede existir esta disparidad de resultados es que hay muchos factores que influyen en la expresión de microARNs como son los tratamientos con quimioterápicos, las infecciones o condiciones de hipoxia (131).

El descubrimiento de nuevos microARNs, hecho que se produce de manera constante, obliga a las empresas dedicadas a la tecnología con microarrays a añadir nuevas sondas que identifiquen estos microARNs. Por ello, es necesario llevar a cabo estudios con la tecnología de microarrays actualizada para estudiar los perfiles de expresión diferencial de microARNs que contengan dichas nuevas sondas.



3.Material y métodos





3.1 Tipo de estudio y obtención de las muestras

Nuestro estudio es de tipo observacional retrospectivo en el grupo de los casos y de cohortes en el grupo de los controles.

El grupo de casos estaba formado por un total de 19 pacientes. Seis de las muestras de COCE se obtuvieron de pacientes atendidos por el Servicio de Cirugía Maxilofacial del Complejo Hospitalario Universitario de Santiago de Compostela (CHUS) y 13 del Biobanco de Santiago (SERGAS), todos ellos con un diagnóstico histológico previo. Para todos los casos los *criterios de inclusión* fueron no haber recibido tratamiento de radioterapia o quimioterapia antes de la obtención de la muestra, tener accesibilidad a los datos de la historia clínica del paciente, que la muestra contara con más de 80% de células tumorales y que la cantidad de material congelado fuera suficiente para extraer ARN total.

El grupo control estaba formado por 31 muestras obtenidas durante la cirugía de pacientes que acudieron al Servicio Maxilofacial para extraerse un tercer molar. Todas las muestras extraídas fueron de pacientes mayores de edad y tras su extracción fueron almacenadas a -80 grados centígrados. Todos los pacientes del grupo de controles y casos atendidos en el Servicio de Cirugía Maxilofacial del CHUS firmaron el correspondiente consentimiento informado para participar en el estudio. Los consentimientos estaban disponibles en gallego y castellano. Este estudio ha sido aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínico de Galicia Ref. 2015/132 (CEIC), actualmente “Comité Autónoma da Ética da Investigación” (CAEI) (Anexos).

3.2 Variables clínicas

Los datos extraídos de las historias clínicas de los pacientes fueron: sexo (varón o mujer), edad (en años), localización del tumor, diferenciación tumoral (buena, moderada, pobre), TNM, estadio del tumor, diámetro (en centímetros), estatus del fumador (no fumador, fumador, exfumador), consumo de cigarrillos (número/día), resección tumoral (sí o no), vaciamiento ganglionar (sí o no), tratamiento de radioterapia y/o de quimioterapia (sí o no), recidiva (sí o no), antecedentes familiares (sí o no) y situación vital (éxito o no).

3.2.1 Localización del tumor

Las muestras fueron extraídas de la mucosa yugal, paladar blando, encía, zona triángulo retromolar, lengua y suelo de boca.

3.2.2 Diferenciación tumoral

Las muestras fueron analizadas por un anatomopatólogo que describió la diferenciación tumoral como buena, moderada o pobre.

3.2.3 TNM y estadio del tumor

Los tumores fueron clasificados en el momento del diagnóstico según el Manual de Estadaje de Cáncer del *American Joint Committee on Cancer*(60).

3.2.4 Consumo de tabaco

Aquellos pacientes que estuvieron más de diez años sin fumar, fueron clasificados como exfumadores, aquellos pacientes que no fumaron nunca fueron clasificados como no fumadores, y de los pacientes fumadores el consumo se registró como cigarrillos por día.

3.3 Extracción del ARN total de la muestra

El método de extracción de los microARNs tiene un gran impacto en los resultados del experimento para determinar el perfil de expresión de microARNs.

Una de las dificultades para extraer el ARN sin que se degrade es la presencia de las ARNasas prácticamente en cualquier ambiente donde haya presencia humana (132). Por ello es necesaria una adecuada limpieza de las superficies de trabajo, en nuestro caso, usamos un pulverizador, el RNaseZAP (Ambion™) (Figura 10). Además, debido al efecto cancerígeno que tiene el fenol cloroformo, es también necesario trabajar dentro de una campana de químicos. El fenol cloroformo es necesario durante el proceso de la extracción de ARN total para la desproteínización de ácidos nucleicos. La mayoría de las proteínas son más solubles en fenol que en fase acuosa, tras la centrifugación se observan dos fases, la más baja es donde se deposite la fase orgánica que contiene proteínas y la más alta contiene ácidos nucleicos (133).



Figura 10. RNaseZap (Ambion™) para limpiar superficies y dejarlas libre de ARNasas.

Muchos de los métodos de extracción utilizados para el análisis del transcriptoma (mARN) pierden durante la extracción los microARNs. Por este motivo escogimos un kit de eficacia contrastada y con historia de uso. El kit que se utiliza para el aislamiento del ARN total es el mirVana™ miRNA Isolation Kit (Figura 11), siguiendo el protocolo que recomienda el fabricante, con el cual se puede extraer el ARN total o microARN directamente en unos 30 minutos. El objetivo final es eliminar todo aquello que no nos interesa, como proteínas, ADN, etc. y conservar el ARN total.



Figura 11. mirVana™miRNA Isolation Kit

3.3.1 Optimización del Protocolo

El protocolo del mirVana™miRNA Isolation Kit recomienda la congelación inmediata tras la extracción de la muestra en nitrógeno líquido y mantenerla congelada a -80°C . Para la primera parte de la extracción se debe machacar la muestra con un mortero mientras se evita su descongelación añadiendo nitrógeno líquido y el Buffer Lysis, que facilita el kit, hasta conseguir pulverizar totalmente la muestra para después continuar con el protocolo.

El problema principal que tuvimos al probar este método fue la dificultad de moler la muestra sin que ésta se saliera del recipiente antes de descongelarse lo más mínimo o de la posibilidad de analizar muestras que ya han sido congeladas con anterioridad sin utilizar previamente el nitrógeno líquido. En nuestro caso, ninguna de las muestras que poseía el biobanco, habían sido previamente congeladas en nitrógeno líquido.

Otra opción que da el protocolo es usar *Tissue Lyser*, un método para machacar muestras congeladas en un tubo introduciendo bolas de metal y agitando todo junto durante el tiempo necesario hasta que se consiga homogeneizar todo. Nosotros usamos dicho método como alternativa al mortero y el nitrógeno líquido pero las muestras no se deshacían del todo, debido creemos a la naturaleza fibrosa de las muestras de COCE. Otro método que encontramos en la literatura fue un homogeneizador motorizado, pero la limitación económica nos impidió probarlo ya que en el laboratorio carecíamos de esta tecnología.

Las muestras facilitadas por el biobanco de Santiago de Compostela venían en tubos Eppendorf. De cada muestra se obtuvieron cortes de congelación en OCT (*Optimal Cutting*

Temperature), 14 cortes de 14 micrómetros cada uno, y fueron nuevamente congeladas a -80°C .

Para deshacer las muestras utilizamos una pieza de mano (Dremel® 200 Series) con fresas de diamante de 1 mm de diámetro con un mango largo de 45 mm (Muela de Diamante 2 mm Dremel®) (Figura 12). El hecho de utilizar fresas de tallo largo se debe a la necesidad de llegar hasta el fondo del Eppendorf para conseguir una muestra totalmente homogénea (Figura 13). A las muestras congeladas se le añadió el Lysis Buffer que proporciona el kit mirVana™ miRNA Isolation y se volvieron a congelar en el mismo recipiente que se encontraban. Una vez conseguida la congelación total de la mezcla de la muestra y el Buffer, se utilizó la fresa de diamante y la pieza de mano para machacar la muestra en conjunto. La decisión principal de este método es debido a que, si no hay una solidificación completa, la muestra empieza a girar dentro del líquido sin ser machacada. Después seguimos con el procedimiento que recomienda el fabricante.



Figura 12. Formato de la pieza de mano y fresa de bola de diamante de tallo largo similares a las que se utilizaron en el proyecto.



Figura 13. Se observa el tubo Eppendorf, en los que se transportaba la muestra, y cómo la fresa larga de diamante llega hasta el fondo del recipiente de manera efectiva.

3.3.2 Protocolo de extracción

1. Machacamos la muestra con 10 volúmenes de *Lysis /Binding Buffer* por masa de tejido.
2. Añadimos después 1/10 volúmenes de la muestra de *Homogenate Additive*.
3. Mezclamos bien con vórtex.
4. Dejamos la muestra diez minutos en hielo
5. Añadimos ácido fenol cloroformo, la misma cantidad de volumen que teníamos de la muestra antes de añadirle el *Homogenate Additive*.
6. Vórtex 60 segundos.
7. Centrifugamos 5 minutos para separar la fase acuosa de la orgánica.
8. Recogemos la fase acuosa sin tocar el fondo y anotamos el volumen recogido.
9. Añadimos 1.25 volúmenes de 100% etanol a temperatura ambiente a la fase acuosa y mezclamos.
10. Pipeteamos la mezcla a través de uno de los filtros que trae el kit (Figura 14) y centrifugamos 15 segundos. Nos deshacemos del sobrante y volvemos a utilizar el mismo tubo de colección.
11. Añadimos 700 μL de Solución de Lavado 1 (que previamente se ha preparado añadiendo 21 mL de 100% etanol a la botella en el que viene en el kit). Centrifugamos 5-10 segundos y nos deshacemos del sobrante volviendo a utilizar el mismo tubo de colección.
12. Añadimos 500 μL de Solución de Lavado 2/3 (que previamente se ha preparado añadiendo 40 mL de 100% etanol a la botella en el que viene en el kit) y centrifugamos de 5-10 segundos, deshaciéndonos posteriormente del sobrante, y volvemos a utilizar el mismo tubo de colección.
13. Repetimos el paso anterior
14. Una vez eliminado el sobrante, hacemos *spinning* 1 minuto más.
15. Cambiamos el tubo de colección y añadimos 20 μL de *Elution Solution* calentada previamente a 95°C. *Spinning* 20-30 segundos más.
16. Almacenamos todas las muestras a -80°C.



Figura 14. El tubo Eppendorf con los filtros que facilita el mirVana™miRNA Isolation Kit

El protocolo del mirVana™miRNA Isolation también recomienda utilizar 100 microlitros de *Elution Solution* al final del proceso. Sin embargo, hemos comprobado que 100 microlitros es mucha cantidad y la muestra sale muy diluida. Por lo que las muestras estudiadas fueron analizadas con 20 microlitros de *Elution Solution*.

Para analizar el ARN total con microarrays se necesita una cantidad y calidad mínima de la muestra. Por norma general la calidad de ARN total se valora en base a la pureza y a la integridad.

La cantidad y pureza de ARN total se analizó con el NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (Figura 15). El NanoDrop® ND-1000 es un espectrofotómetro que mide la pureza y la concentración de ADN, ARN y proteínas. Los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta con un patrón específico, a mayor cantidad de ácidos nucleicos mayor es la luz absorbida por la muestra. Con un microlitro de la muestra y usando previamente la solución en la que está disuelta la misma como blanco, el NanoDrop® ND-1000 facilita la concentración en ng/microlitro (Figura 16). La contaminación de la muestra por las proteínas se valora con un ratio de absorbancia de dos longitudes de onda 260nm y 280nm, $(A)_{260/280}$. La pureza se considera adecuada con una ratio superior a 1.8 (134). El uso del NanoDrop es sencillo y el nivel de técnica que se requiere es bajo (7).



Figura 15. NanoDrop®ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

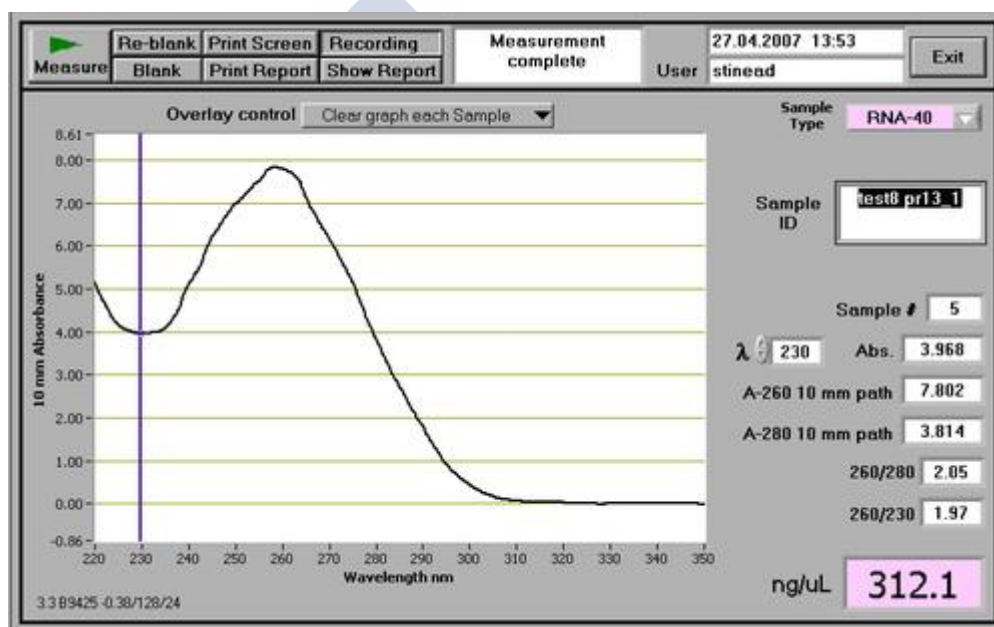


Figura 16. Ejemplo de la curva que se observa en el NanoDrop® ND-1000 cuando la pureza es adecuada.

La cantidad de ARN total que recomienda la casa comercial para el uso de las muestras con Affymetrix®miARN 4.1 Array Plate es de mínimo 130 ng y el grado de pureza es el de un ratio $(A)_{260/280}$ de 1.95.

La integridad del ARN se valora analizando las subunidades 28S y 18S del ARN ribosomal mediante chips de electroforesis que dan un valor numérico llamado RIN (*RNA Integrity Number*) donde 10 indica que no ha habido degradación y 1 que la degradación ha sido absoluta. En nuestro caso usamos los Agilent RNA 6000 NanoChips en el Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) (Figura 17).



Figura 17. NanoChip similar al que se utilizó en el proyecto

La intención inicial era analizar las muestras con ultrasecuenciación cuya precisión es del 99,99% y así poder descubrir nuevos microARNs. Las exigencias del protocolo son altas y además de una concentración de por lo menos 200 ng /microlitro, el RIN debe ser superior a 6 y la proporción mínima de microARN debe ser del 0,05% del ARN total.

El Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) es la tecnología que usamos para determinar la calidad del ARN y medir la proporción del microARN en el ARN total de la muestra.

Para medir la calidad del ARN utilizamos los RNA 6000 NanoChips que permiten medir hasta 12 muestras y facilitan el RIN antes descrito. Los chips se mantienen estables a temperatura ambiente y caducan al año de ser expedidos. Para hacer funcionar dichos chips hacen falta unos reactivos, que deben ser conservados a 4°C, y el marcador de peso molecular (*ladder*) que debe conservarse a -20°C. Ambos productos deben aclimatarse a temperatura ambiente 30 minutos antes de ser utilizados. Una vez colocados los reactivos en el chip se utiliza un microlitro de cada muestra en cada pocillo y se coloca en la estación del Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) para ser utilizado (Figura 18).



Figura 18. Estación del Bioanalyzer 2100 para analizar los chips.

El Small Chip RNA (Agilent Technologies) se prepara de manera similar a los RNA 6000 NanoChips con la diferencia de que el Small Chip RNA se utiliza para conocer la concentración de la muestra en pico gramos de las secuencias de entre 0 y 150 nucleótidos, y que la cantidad máxima de muestras analizables en cada Small chip son 11. Una vez procesado el chip, el software permite calcular el porcentaje de microARNs teniendo en cuenta las masas medidas en cada chip.

Sin embargo, tuvimos dificultades a la hora de correr el RNA 6000 NanoChip correctamente. Nos encontramos con diferentes situaciones: el *ladder* no se procesaba bien y por ello tampoco el resto de las muestras (Figura 19), o el *ladder* se procesaba correctamente pero el resto de las muestras no (Figura 20), o se observaba lectura en el gráfico y calculaba la concentración de la muestra pero no era capaz de calcular el RIN indicándolo con el código N/A (Figura 21). Ante este último hecho intentamos solucionar este problema tal y como recomienda la casa comercial ajustando los límites de los picos, pero en vista de que informa de que tampoco garantiza un RIN correcto no lo dimos por válido.

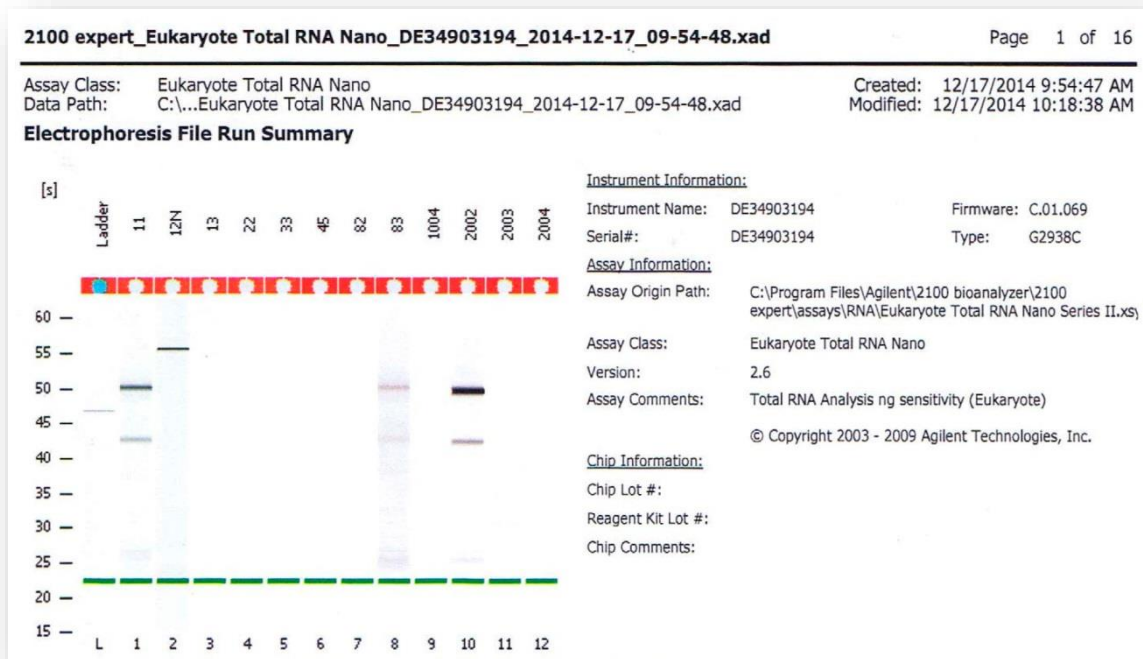


Figura 19. En esta imagen se aprecia que el *ladder* no ha corrido correctamente.

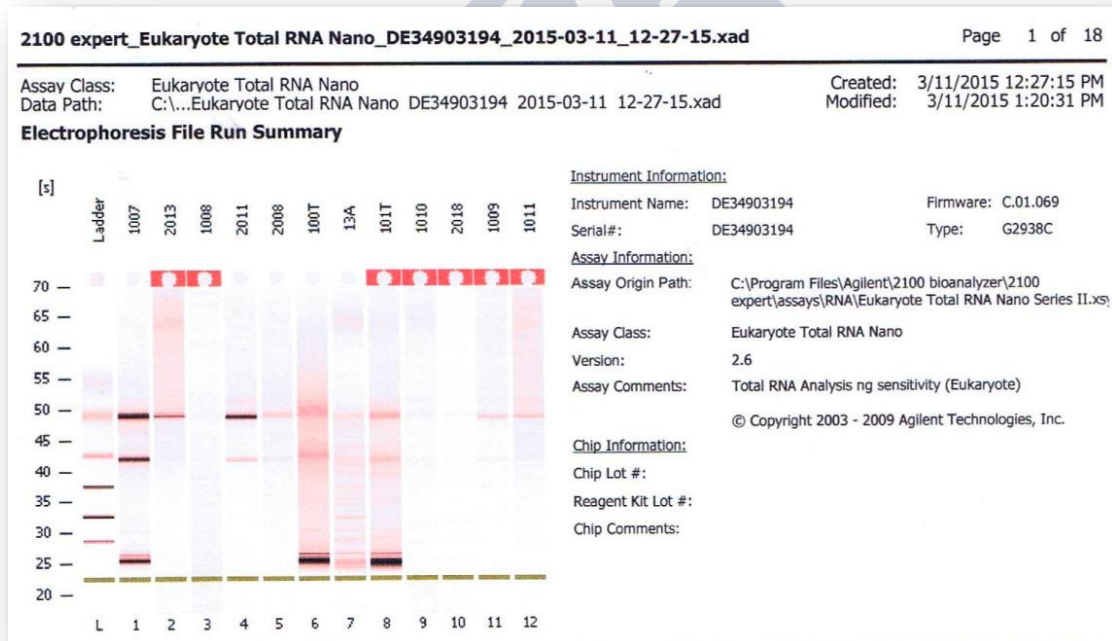


Figura 20. En esta imagen se puede ver que el *ladder* ha corrido correctamente pero no el resto de las muestras.

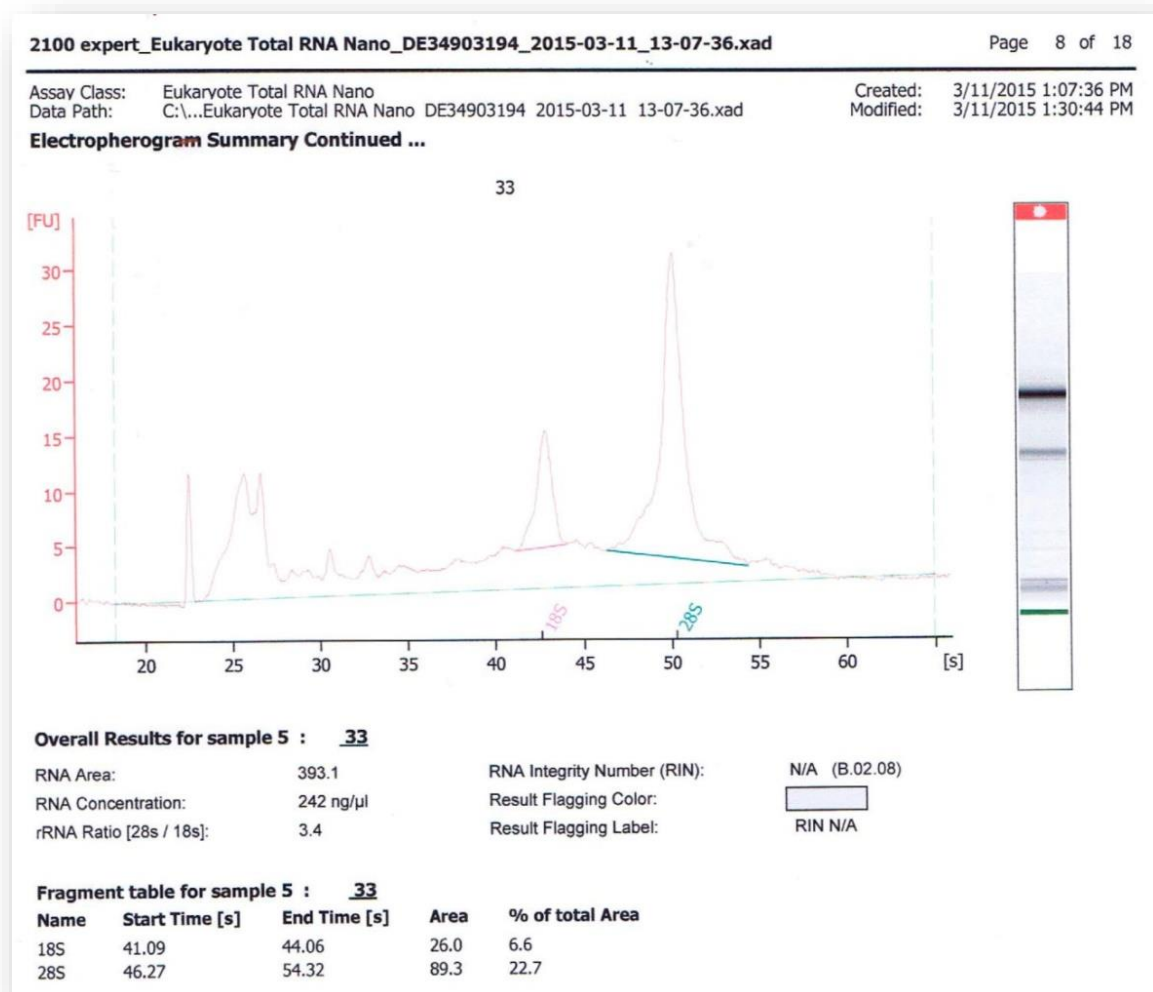


Figura 21. Esta imagen pertenece a una de las muestras del proyecto, en ella se puede apreciar la concentración del ARN total pero no el RIN.

Aunque el protocolo recomienda lavar con agua libre de nucleasas mediante un chip de lavado (Figura 22) durante 3 minutos los electrodos del Bioanalyzer 2100 antes de colocar el chip, esto resultó ser insuficiente para obtener buenos datos. Tras varias pruebas establecimos un protocolo de lavaje de una hora con lavados constantes de 30 segundos con agua libre de nucleasas y permitiendo que se evaporase el fluido remanente en los electrodos durante 20 minutos.

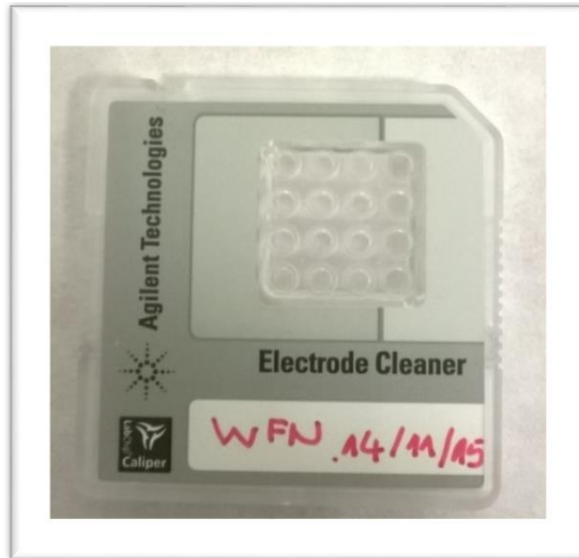


Figura 22. Electrode Cleaner, dispositivo en cuyos pocillos se coloca agua libre de nucleasas para limpiar los electrodos.

Sin embargo, y a pesar de mejorar los resultados con el protocolo de lavado, por cada chip que se utilizaba, no se conseguía que todas las muestras se procesaran correctamente. Lamentablemente, este protocolo no fue suficiente para procesar el Small Chip RNA con éxito, donde el *ladder* no salía con los 7 picos necesarios que requiere (6 marcando el número de nucleótidos y 1 que corresponde al marcador) (Figuras 23 y 24).

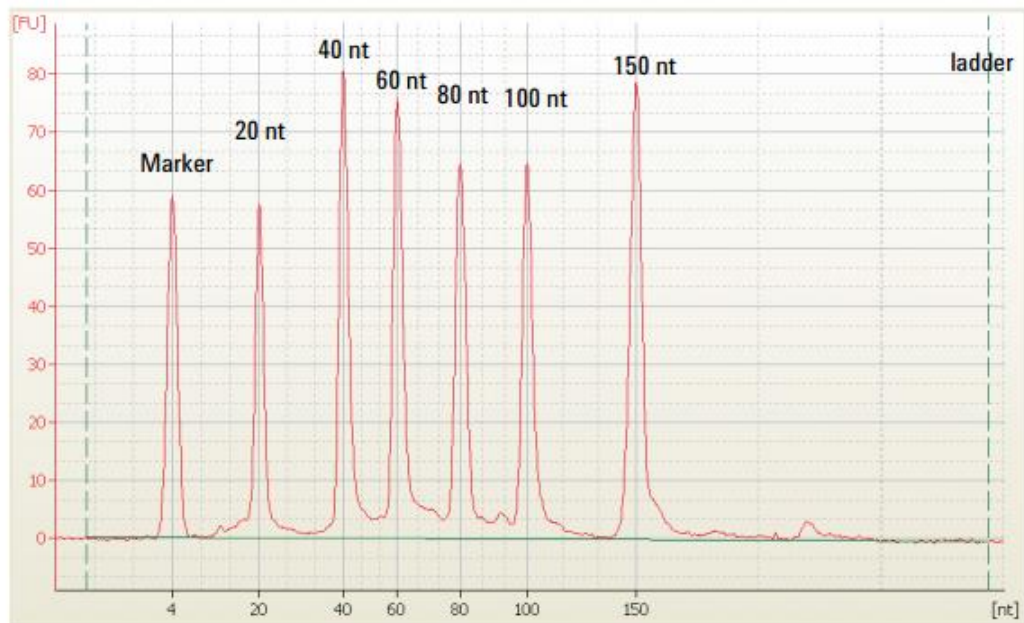


Figura 23. Extraída del protocolo del Small Chip RNA donde se refleja cómo se debe ver el *ladder* corrido correctamente.

2100 expert_Small RNA_DE34903194_2015-06-06_11-56-10.xad				Page 2 of 10
Assay Class:	Small RNA	Created:	6/6/2015 11:56:09 AM	
Data Path:	C:\...06\2100 expert_Small RNA_DE34903194_2015-06-06_11-56-10.xad	Modified:	6/6/2015 12:28:19 PM	
Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)				
Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	
Sample 1		✓	19 % miRNA; Concentration: 188.20 pg/μl	
Sample 2		✓	Number of Peaks: 6	
Sample 3		✓	Number of Peaks: 4	
Sample 4		✓	Number of Peaks: 26	
Sample 5		✓	2 % miRNA; Concentration: 807.30 pg/μl	
Sample 6		✓	10 % miRNA; Concentration: 1775.30 pg/μl	
Sample 7		✓	Number of Peaks: 5	
Sample 8		✓	All Other Samples	
Sample 9		✓	2 % miRNA; Concentration: 1291.20 pg/μl	
Sample 10		✓	4 % miRNA; Concentration: 2255.20 pg/μl	
Sample 11		✓	1 % miRNA; Concentration: 2015 pg/μl	
Ladder		✓	Number of Peaks: 9	

Figura 24. Ejemplo del resumen de un Small Chip RNA corrido en este proyecto donde se puede observar que el *ladder* presentó un total de 9 picos.

Si bien optimizando el protocolo logramos calcular que el RIN de las muestras era el necesario, el Small Chip RNA usado para calcular la concentración de miARN requiere el uso de un *ladder* muy sensible, que no conseguimos que corriera correctamente.

Con el ARN total de las muestras ya extraído con las características de integridad y pureza que se pueden observar en la tabla de resultados, y con los recursos de los que disponíamos, decidimos analizar la expresión diferencial de 8 muestras con COCE y 8 muestras de encía de pacientes sanos usando la tecnología de microarrays.

3.4 Microarray

Una de las metodologías disponibles para comparar perfiles de expresión de microARNs de las muestras tumorales con tejido sano es mediante el uso de microarrays. Para ello hemos utilizado el Affymetrix®miRNA 4.1 Array Plate. Esta placa mide de manera sensible y precisa los transcritos de ARN no codificante implicados en la regulación génica. Los transcritos que detecta han sido extraídos del miRBase v20 e incluye 30.424 miARNs maduros de todas las especies, 2.578 miARNs humanos y 1.996 snoARN y scaARN (*small Cajal body-specific RNA*) humanos. Estos datos pueden filtrarse seleccionando las sondas por especies gracias al software que facilita la casa comercial.

El primer paso tras extraer el ARN total es marcar la muestra con el Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit. Empezando con ARN total el proceso comienza

con una breve reacción de *tailing* seguida de otra de ligación de la molécula de señalización biotinilada para la muestra de ARN. El proceso de marcaje se completa en menos de una hora (Figura 25). La alta sensibilidad del FlashTag Biotin HSR es debida a la propiedad de la tecnología de amplificación 3DNA®.

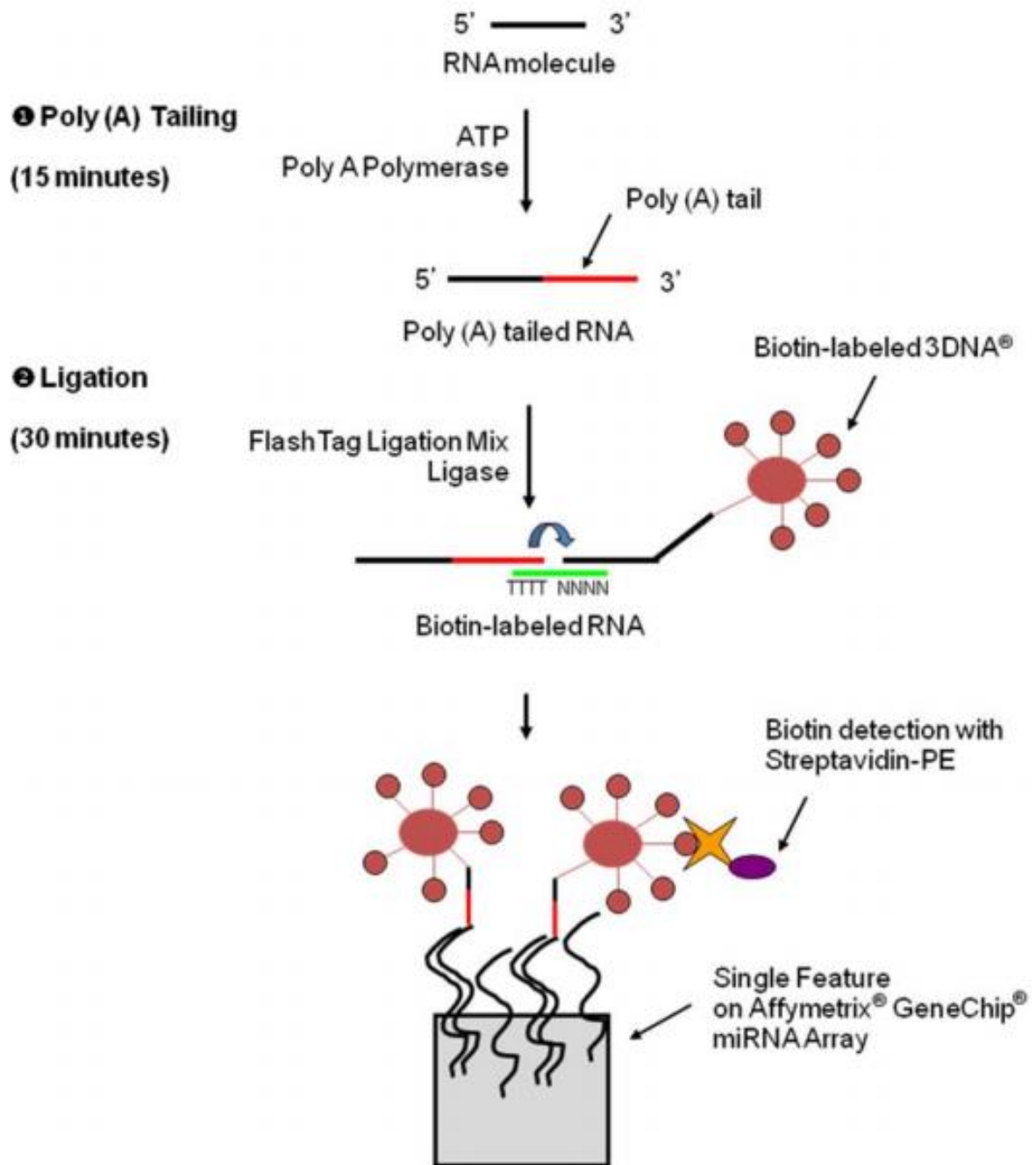


Figura 25. Extraída del manual de Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit. La imagen resume los pasos necesarios para marcar la muestra con el kit.

3.4.1 Protocolo de Affymetrix® FlashTag™ Biotin HSR RNA Labeling Kit

_Poly A tailing

1. Ajustamos el volumen de ARN total a 8 microlitros con agua libre de nucleasas
2. Transferimos 8 microlitros de ARN al hielo. Añadimos 2 microlitros de *RNA Spike Control Oligos* y devolvemos al hielo.
3. Diluimos el ATP mix en 1mM 1:500.
4. Recopilamos el Master Mix en un tubo libre de nucleasas con estos componentes: 26.4 microlitros de *10X Reaction Buffer*, 26.4 microlitros de 25mM $MnCl_2$, 17.6 microlitros de ATP Mix y 17.6 microlitros de *PAP Enzyme*.
5. Añadimos 5 microlitros de Master Mix a los 10 microlitros de ARN / *Spike Control Oligos* del paso 2 para conseguir un volumen total de 15 microlitros.
6. Mezclamos poco a poco.
7. Incubamos en un termo bloque a 37°C durante 15 minutos. Nos deshacemos del ATP no utilizado.

_Ligación

1. Centrifugamos brevemente los 15 microlitros de la muestra con ARN y los reactivos utilizados en los pasos anteriores y colocamos en hielo.
2. Añadimos 4 microlitros de *5X FlashTag Biotin HSR Ligation Mix* a cada muestra.
3. Añadimos 2 microlitros de *T4 DNA Ligasa* a cada muestra.
4. Mezclamos poco a poco.
5. Incubamos a temperatura ambiente durante 30 minutos.
6. Paramos la reacción añadiendo 2.5 microlitros de *HSR Stop Solution*. Mezclamos los 23.5 microlitros de cada muestra.
7. Separamos 2 microlitros de cada muestra para utilizarlos en el test de ELOSA QC (*Enzyme Linked Oligosorbent Assay*), diseñado para confirmar que el kit ha sido llevado a cabo con éxito.

La marcación de las muestras fue corroborada por el test ELOSA QC que recomienda la marca Affymetrix antes de continuar con el proceso. Este es un test que, tras el uso de diferentes reactivos y cultivo de los mismos junto con las muestras, emite una coloración azulada que indica que la muestra ha sido marcada con éxito o coloración roja que indica lo contrario. Las pruebas del ELOSA QC se llevan a cabo en una placa similar a la de la prueba de ELISA y con reactivos y productos asequibles en el laboratorio (Figura 26).

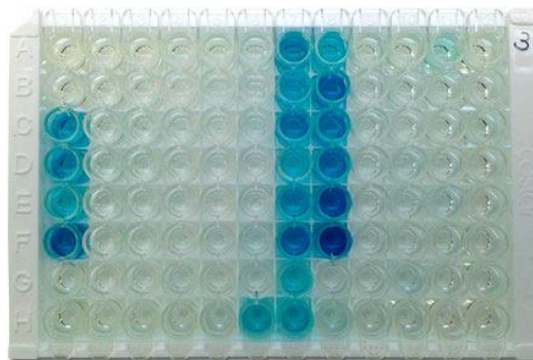


Figura 26. Placa con pocillos similar a la que se utilizó en la prueba de ELOSA QC.

3.4.2 Affymetrix®miRNA 4.1 Array Plate

La placa microRNA 4.1 de Affymetrix (Figura 27) tiene la capacidad de analizar microARNs de humanos y otras especies con una cantidad de muestra de 130 ng y pudiendo identificar un total de 2.578 miARNs maduros humanos.

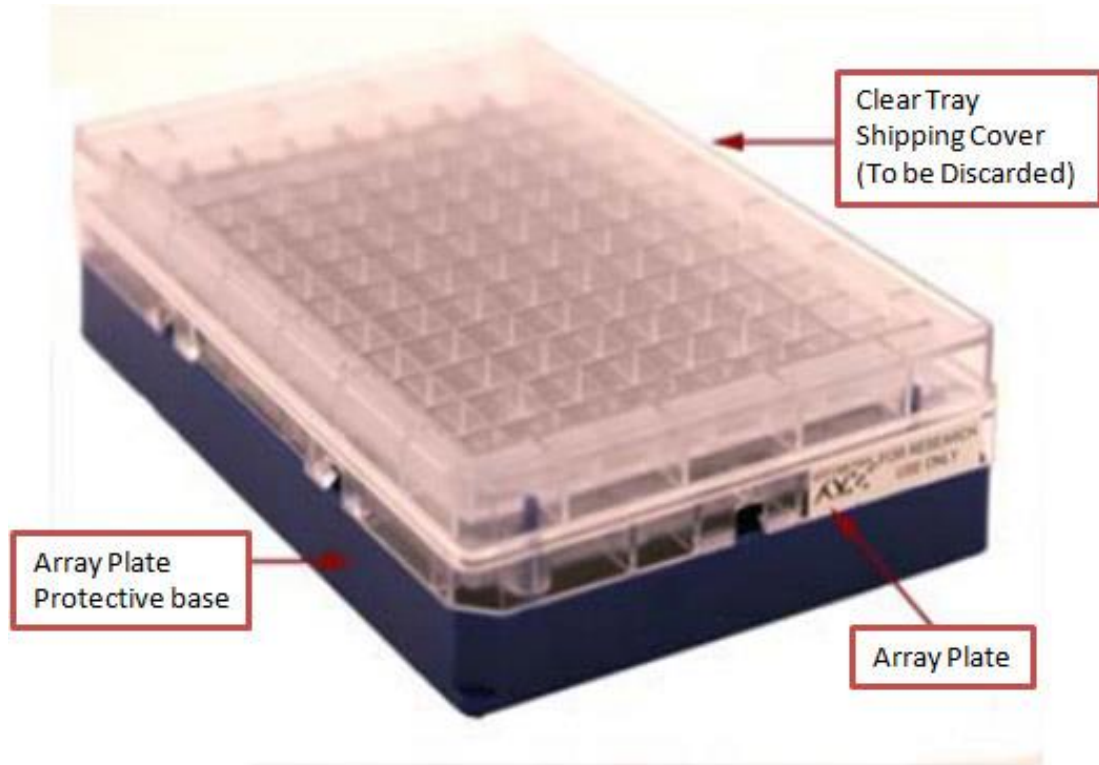


Figura 27. Placa Affymetrix®miRNA 4.1 Array Plate similar a la que se usó en el proyecto

Una vez las muestras están marcadas, quedan dos procesos antes del escaneado, hibridación y lavado, y tinción.

_Protocolo de hibridación:

1. Descongelamos y calentamos el *20X Eukaryotic Hybridization Controls* durante 5 minutos a 65°C.
2. Para preparar el cóctel de hibridación de array, añadimos a 21.5 microlitros de cada muestra marcada los siguientes componentes: *2X Hybridization Mix*, *27.5% Formamide*, *DMSO*, *20X Hybridization Controls*, *Control Oligo B2*, *3nM*, agua libre de nucleasas.
3. Incubamos a 99°C durante 5 minutos, y después a 45°C durante 5 minutos.
4. Aspiramos 130 microlitros e inyectamos en el *array*.
5. Colocamos el *array* en las bandejas del horno e incubamos a 48°C a 60 rpm (revoluciones por minuto) durante 16 horas.

Protocolo de lavado y tinción.

1. Tras la hibridación retiramos el array del horno.
2. Extraemos el cóctel de cada *array* y transferimos a un nuevo pocillo para salvar dicho cóctel.
3. Rellenamos cada *array* completamente con *Array Holding Buffer*.
4. Permitimos a los *arrays* equilibrarse a temperatura ambiente antes de lavar y teñir.
5. Colocamos el *array* en la *Fluidic Station 450* y seguimos el siguiente protocolo:
 - a. 10 ciclos de 2 lavados de *Wash Buffer A* a 25°C
 - b. 8 ciclos de 15 lavados con *Wash Buffer B* a 50°C
 - c. Teñimos las sondas del *array* durante 10 minutos con el *Stain Cocktail 1* a 25°C
 - d. Lavamos 10 ciclos con *Wash Buffer A* a 30°C
 - e. Teñimos las sondas durante 10 minutos con *Stain Cocktail 2* a 25°C
 - f. Teñimos las sondas durante 10 minutos con *Stain Cocktail 1* a 25°C
 - g. Realizamos 15 ciclos de 4 lavados con *Wash Buffer A* a 35°C
 - h. Rellenamos las sondas con *Array Holding Buffer*

El escáner utilizado con la placa Affymetrix®miRNA 4.1 Array Plate es el GeneTitan®Instrument y el software asociado es el Affymetrix®GeneChip® Command Console® (AGCC). El AGCC es un software libre de última generación disponible en la página web de Affymetrix que facilita una serie de herramientas para el control del instrumento y manejo de los datos usados en el procesamiento de las placas. El software resume los datos de intensidad celular de las sondas (que genera el documento *CEL) y permite el registro de la muestra en el array, manejo de datos, control del instrumento, así como el encuadre manual y automático de la imagen.

3.5 Procesamiento de datos

Tras el escaneado, los documentos *CEL fueron procesados por el Affymetrix®Expression Console™ software (v.1.4) (Figura 28). El Affymetrix®Expression Console™ software es fácil de usar y disponible para todos los usuarios de Affymetrix de manera gratuita. Permite así a cualquier investigador realizar controles de calidad, normalizar y analizar los datos obtenidos usando un ordenador estándar.

Para poder convertir los documentos *CEL en *CHP, necesarios en el análisis de los resultados de la expresión de los microARNs, es imprescindible primero descargar de la página de Affymetrix las librerías de los organismos que queramos analizar. En nuestro caso sólo queríamos analizar los microARNs humanos. Con el Affymetrix®Expression Console™ software (v.1.4) se evalúa también la calidad del proceso de hibridación, mediante la medición de determinados controles, así como la distribución de la señal del escaneado.

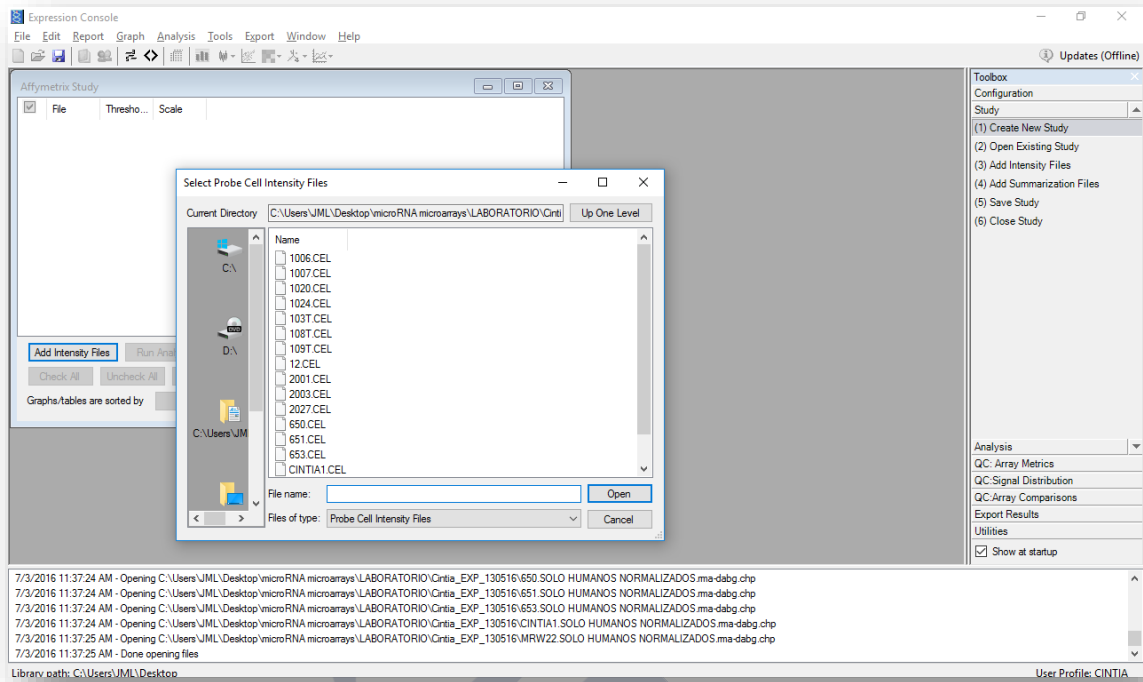


Figura 28. Affymetrix [®]Expression Console™ software (v.1.4) en nuestro análisis exportando de los documentos *.CEL.

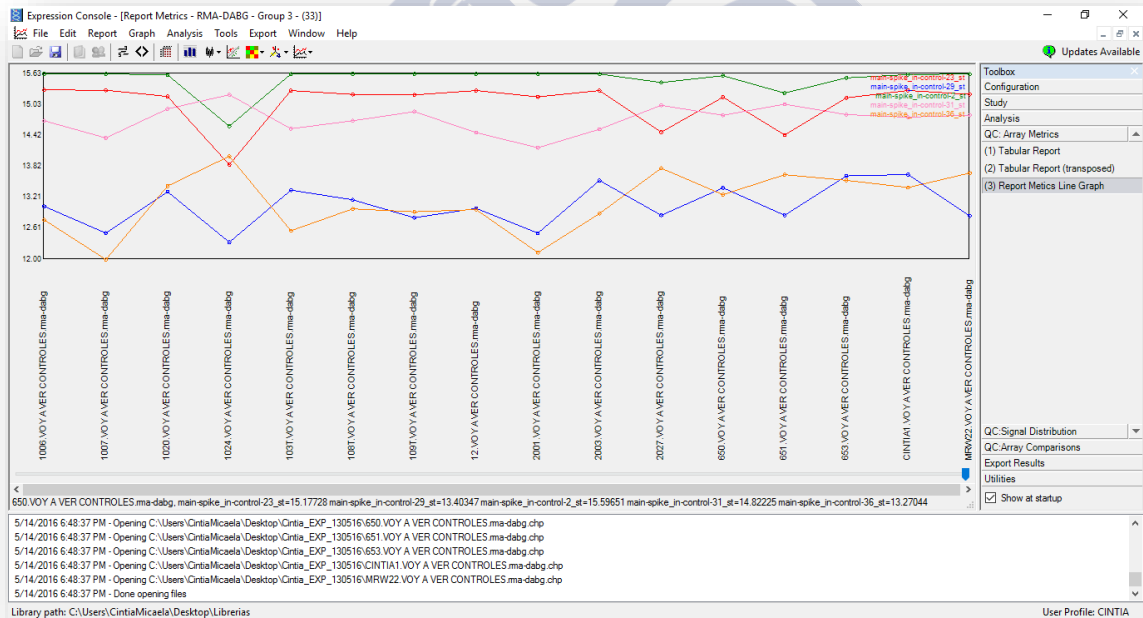


Figura 29. Affymetrix [®]Expression Console™ software (v.1.4) en nuestro análisis comprobando la intensidad de los controles recomendados por la casa comercial.

Uno de los análisis llevamos a cabo es el de los controles que recomienda Affymetrix de los oligos 2, 23 y 29 que confirmaban la ligación y la incorporación de la cola de poly(A), el

oligo 31 que confirma la ligación y el oligo 36 que confirma la ligación y la ausencia de ARNasas. Si se ha hecho bien la señal de estos oligos debe ser de 9.96 o mayor (Figura 29).

Una vez comprobado que el proceso de hibridación y distribución de la señal es correcto con el Affymetrix *Expression Console*TM software (v.1.4), y obtenidos el resumen de los archivos en formato *CHP, exportamos estos archivos al Transcritome Analysis Console 3.0 (TAC) (Figura 30), también desarrollado por Affymetrix, que lleva a cabo análisis estadísticos para analizar la expresión diferencial de los microARNs. Exportamos los archivos *CHP de cada muestra analiza, 16 muestras en total, y los dividimos en grupos.

El primero fue el grupo de casos y controles, pero también lo hicimos con un grupo de casos de estadio II con los controles y luego otro de casos de estadio IV con los controles, y comparando casos de estadio IV y estadio II. Otro análisis fue separando mujeres y hombres independientemente de la muestra de origen, mujeres y hombres sólo de las muestras control y por último muestras de COCE de lengua con encía sana.

Después de dividir las muestras en sus respectivos grupos activamos el análisis (Figura 30) y el programa facilitó un resumen del mismo explicando el número de genes desregulados, sobre expresados e infra expresados, el nivel de significancia obtenido a través de análisis univariable de ANOVA y los criterios de selección de la expresión, que básicamente es el doble o la mitad de la expresión de un grupo con respecto al otro. Otros análisis disponibles en el TAC son el *Scatter plot*, el *Volcano plot* y el *Hierarchical clustering*. El *Scatter plot* marca en gris los genes que no están diferencialmente expresados y los que están por encima están sobre expresados y los que están por debajo infra expresados. El *Volcano plot* muestra en un gráfico la cantidad de veces (*fold change*) que están desregulados los genes. La figura del *Hierarchical clustering* representa en la línea vertical las muestras analizadas por grupos (con los números 1 y 2) y en línea horizontal sondas diferencialmente expresadas. Las sondas del chip están codificadas con un número cuyo gen correspondiente puede verse en una tabla que facilita también el programa junto con el *fold change* y el valor p entre otros (Figura 31).

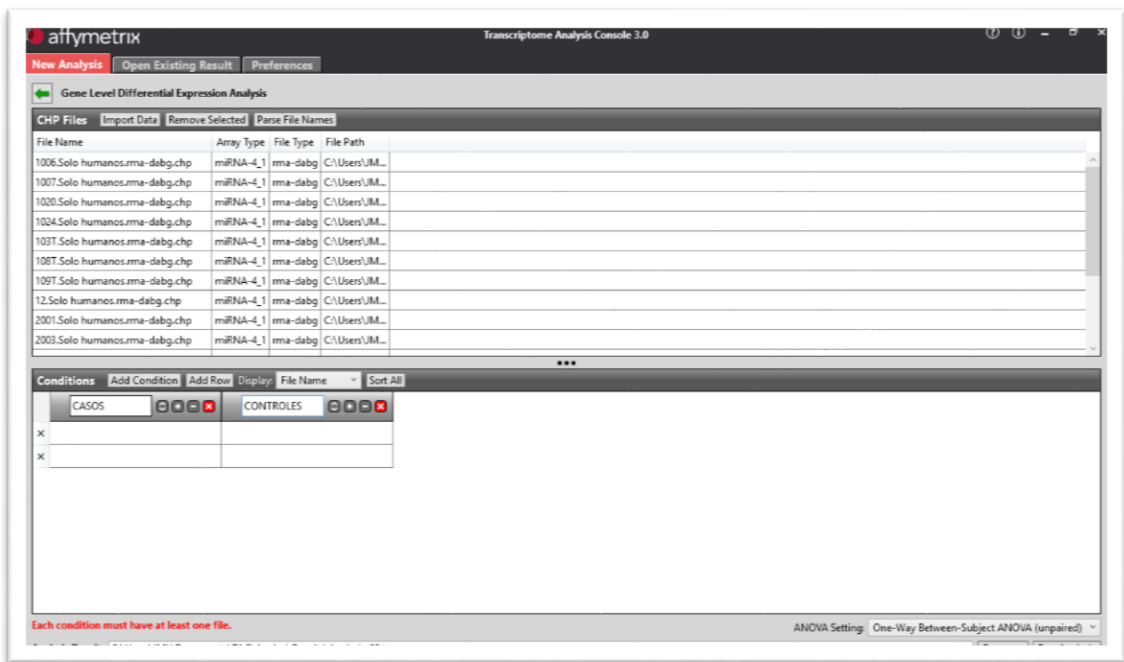


Figura 30. Programa del TAC con los archivos *CHP exportados.

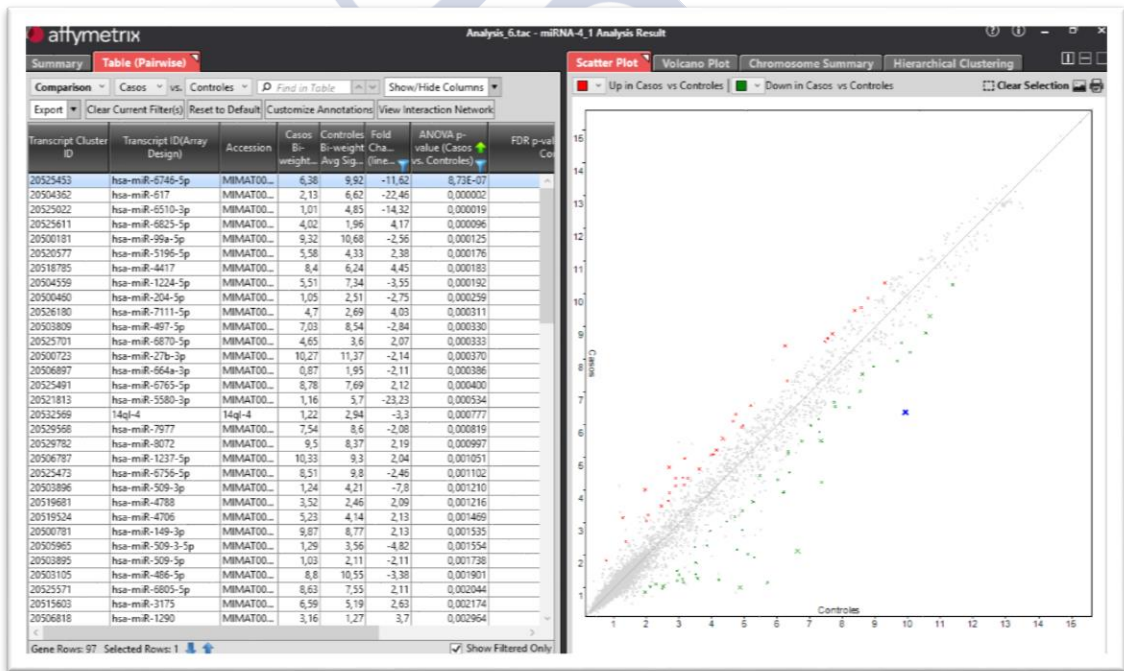


Figura 31. Tabla del TAC resumiendo el estudio de expresión diferencial de casos de COCE con respecto a los controles, en esta imagen se observa concretamente el Scatter plot y el resumen inicial que ofrece.

Tras la obtención de los microARNs desregulados estudiamos cada microARN por separado utilizando el Diana Tool v 3.0 miRpub (disponible en <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=mirpub/index>, acceso el 30 de septiembre de 2016). Esta herramienta permite conocer los estudios relacionados con un microARN determinado (135) y su enlace directo a la fuente (Figura 32).

The screenshot shows the Diana Tools interface. At the top, there are logos for the University of Thessaly, IMIS Athens IC, and IMIS AL Ferry. Below the navigation bar (HOME, SOFTWARE, PUBLICATIONS, CONTACT), a search bar contains 'hsa-miR-99a-5p'. A notification indicates '377 related publications' and an 'Add missing pub' button is present. The main content area displays a list of publications, with the top one expanded to show details: 'Differential expression of microRNAs as predictors of glioblastoma ...' (2014), authors Bradley Barrie S, Loftus Joseph C, Mielke Clinton J, Dinu Valentin, full title 'Differential expression of microRNAs as predictors of glioblastoma phenotypes', journal 'BMC Bioinformatics (2014)', MeSH diseases 'N/A', MeSH tissues 'N/A', found keywords 'hsa-miR-99a', PubMed ID '24438171', PMC open access ID 'PMC3901345', and sources 'text mining on pmc open access'. A sidebar on the right shows 'Used keywords' (hsa-miR-99a-5p, hsa-miR-99a), 'Families' (mir-99), and 'Other keywords' (mir-99a-5p, mir-99a). Below this is a 'Keywords in' dropdown menu set to 'Not Specified' and a 'Sources' button. On the left, there is a login section with fields for 'Username' and 'Password', a 'Remember me next time' checkbox, a 'Login' button, and a 'Forgot your password?' link. Below the login section, there are links to 'Sign up for free!' and 'or take a tour'. Further down, it lists 'Available features for registered users' (Download databases, History, Bookmarks) and states 'Login is not required to access the site!'. At the bottom left, there are logos for the European Union, NSRF, and other funding agencies.

Figura 32. miRpub en Diana Tools con los resultados que se obtienen buscando el microARN hsa-miR-99a-5p.

Además de recopilar la información disponible de cada microARN desregulado, también estudiamos la interacción de los miARNs y sus dianas gracias del Diana Tool miRPath v3.0 (disponible en <http://snf-515788.vm.oceanos.grnet.gr/dianauniverse/index.php?r=mirpath>, acceso el 30 de septiembre de 2016). Dicha plataforma permite ver las dianas posibles de cada microARN y buscar mecanismos celulares en común en los que están implicados (Figura 33). Al insertar un microARN el programa permite tenerlo en cuenta, o no, en los análisis (*enable/disable*), indica entre paréntesis el número de dianas conocidas y la posibilidad de acceder a dichos genes (*see genes*) (136).

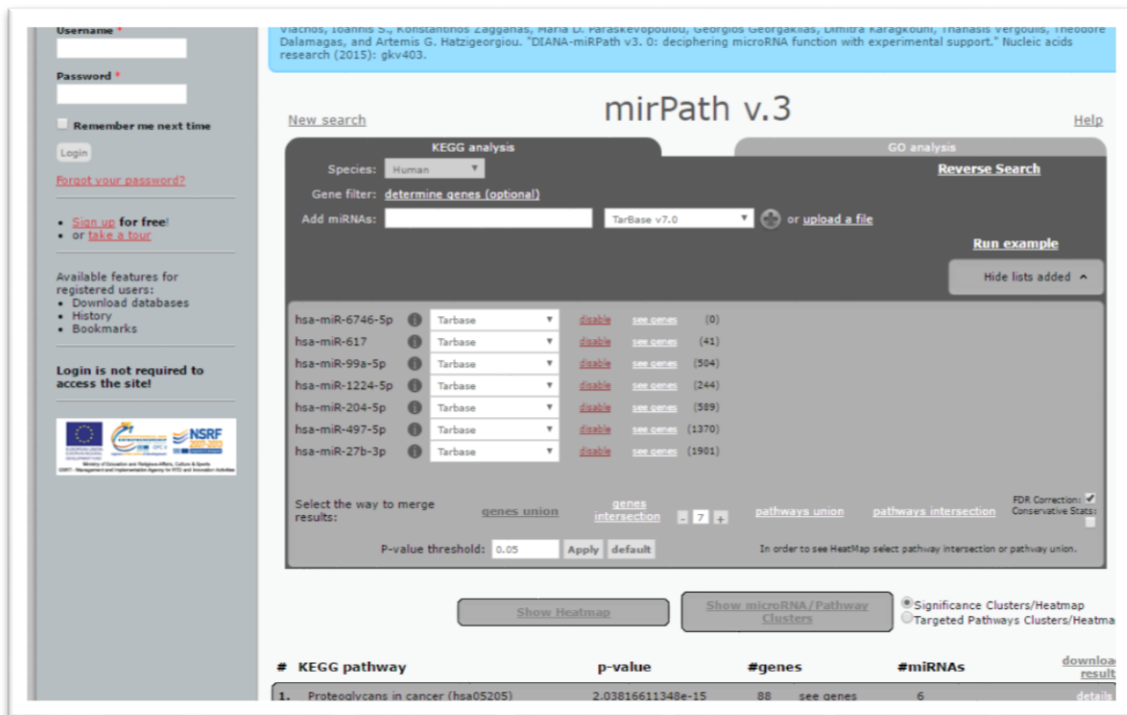


Figura 33. mirPath v3.0 analizando los microARNs desregulados.

3.6 Análisis estadístico

Los valores de las variables fueron recogidos en una base de datos diseñada específicamente para el estudio y analizados con el programa SPSS versión 20.0.

Para la descripción univariante se emplearon los estadísticos descriptivos básicos: media, desviación estándar, frecuencia y porcentaje.

En el análisis univariante se relacionaron las variables con el estadístico del Chi cuadrado de Pearson o ANOVA, según condiciones de aplicación. Para la comparación de las medias de concentración y RIN del ARN total extraído de las muestras de los casos comparadas con los controles, se llevó a cabo el test no paramétrico de U de Mann Whitney. El nivel de significación empleado fue del 5%, considerando el valor de $p \leq 0.05$ que indica una relación estadísticamente significativa y un valor $p \geq 0.05$ que indica ausencia de relación.

Para el análisis de la relación entre la cantidad de ARN y el RIN con respecto al tipo de tejido, se utilizaron pruebas estadísticas no paramétricas, concretamente el test de Kruskal-Wallis. Los valores por debajo de 0.05 se consideraron estadísticamente significativos. Para el análisis de la relación entre la cantidad de ARN y el RIN con el paso del tiempo, se aplicó estadística no paramétrica mediante la correlación de Spearman.

El Affymetrix®Expression Console facilita los valores numéricos en log2 para la normalización de los datos obtenidos en el escaneo que pertenecen a las intensidades relativas de las hibridaciones (unidades de fluorescencia).

En cuanto a la expresión diferencial de los microARNs, el Transcriptome Analysis Console llevó a cabo un análisis ANOVA univariante seleccionando aquellos genes con un *fold change* de más de ± 2 y con un valor p menor de 0,05. Finalmente analizamos los mecanismos celulares con el Diana Tools miRPath 3.0 de aquellos genes cuyo valor de significancia era menor de 0,001.

El Diana Tools miRPath 3.0 utiliza el Fisher's Exact test para relacionar los microARNs con sus dianas y mecanismos moleculares.





4.Resultados





4.1 Descriptivo

4.1.1 Edad y sexo

La edad media de los 19 casos es de 56,78, con un rango de 31-75 años. De los 19 casos 6 son mujeres (31,6%) y 13 son hombres (68,4%).

La edad media de los 31 controles es de 41,06 con un rango de 18 a 85 años. De los 31 controles 12 son mujeres (38,7%) y 19 son hombres (61,3%).

4.1.2 Consumo de tabaco

De los 19 casos 9 (47,4%) son fumadores en el momento del diagnóstico, 9 (47,4%) son no fumadores y 1 ex fumador (5,2%).

De los 31 controles 7 (22,6%) son fumadores, 23 (74,2%) no fumadores y 1 ex fumador (3,2%).

4.1.3 Localización del tumor

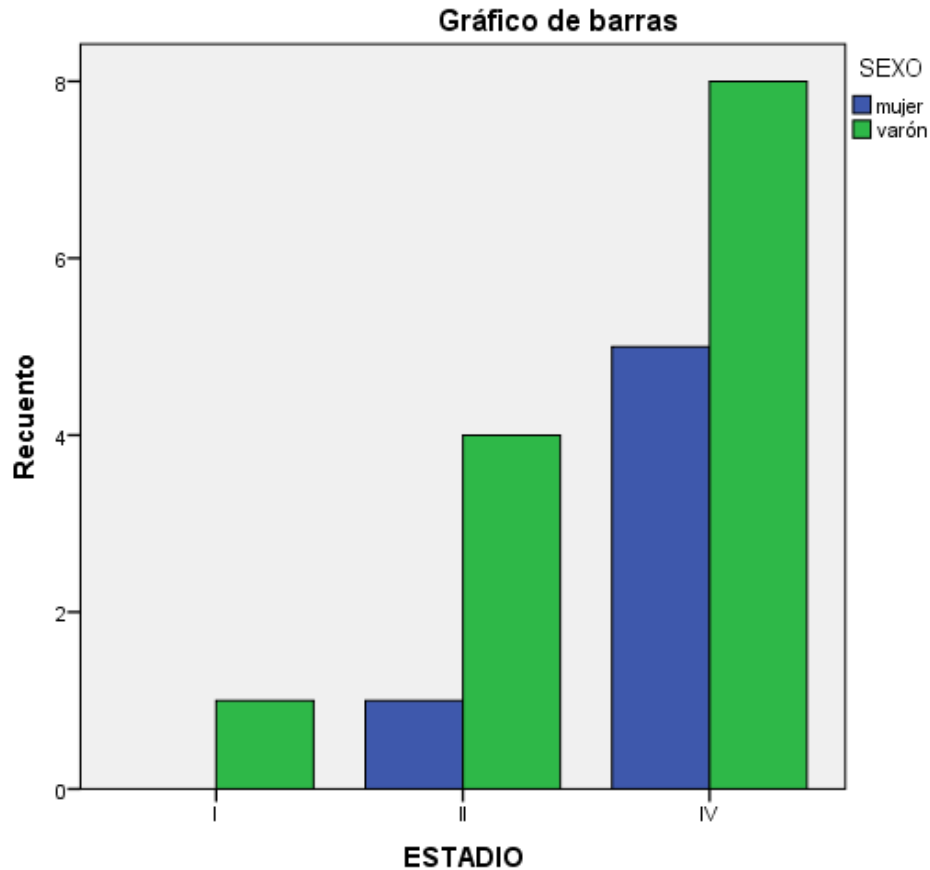
Los 19 casos son tumores primarios intraorales, 9 (47,3%) en lengua, 5 (26,3%) en encía, 2 (10,5%) en la zona trígono molar, 2 (10,5%) en suelo de boca, 1 (5%) en mucosa yugal.

4.1.4 Estadíos TNM

En el momento del diagnóstico 1 tumor está en estadio I (5,3%), 5 en estadio II (26,3%), 13 en estadio IV (68,4%).

4.1.5 Distribución de estadíos según sexo

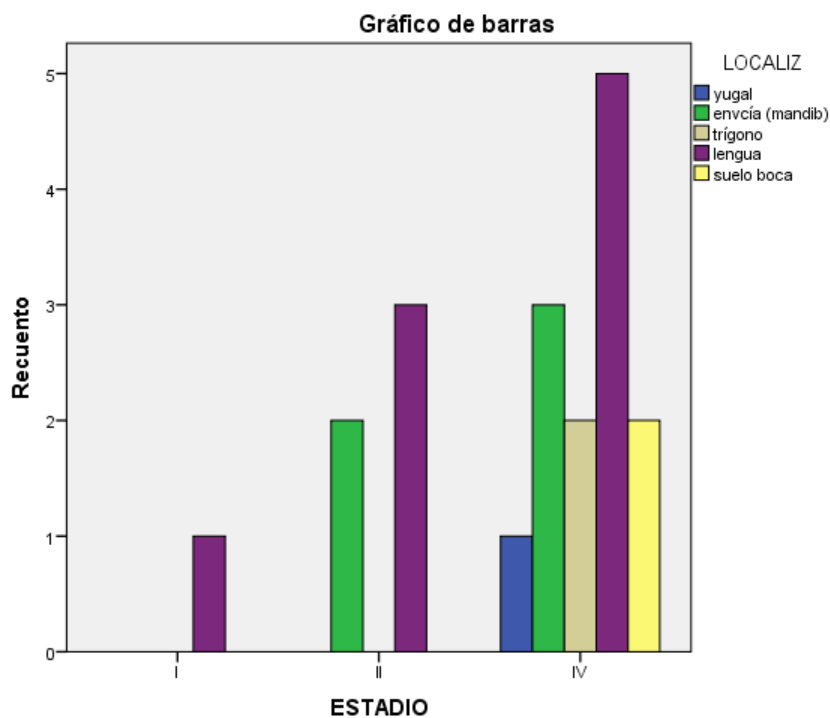
El número de mujeres con tumores en estadio II es de 1 (20%) y el de hombres de 4 (80%). El número de mujeres con estadio IV es de 5 (38,5%) y el de hombres de 8 (61,5%). Sólo hay un caso con estadio I en un hombre. La relación no es estadísticamente significativa ($p=0,590$) (Gráfica 1).



Gráfica 1. Distribución de las muestras con estadio I, II y IV con respecto al sexo.

4.1.6 Distribución de estadios TNM según localización

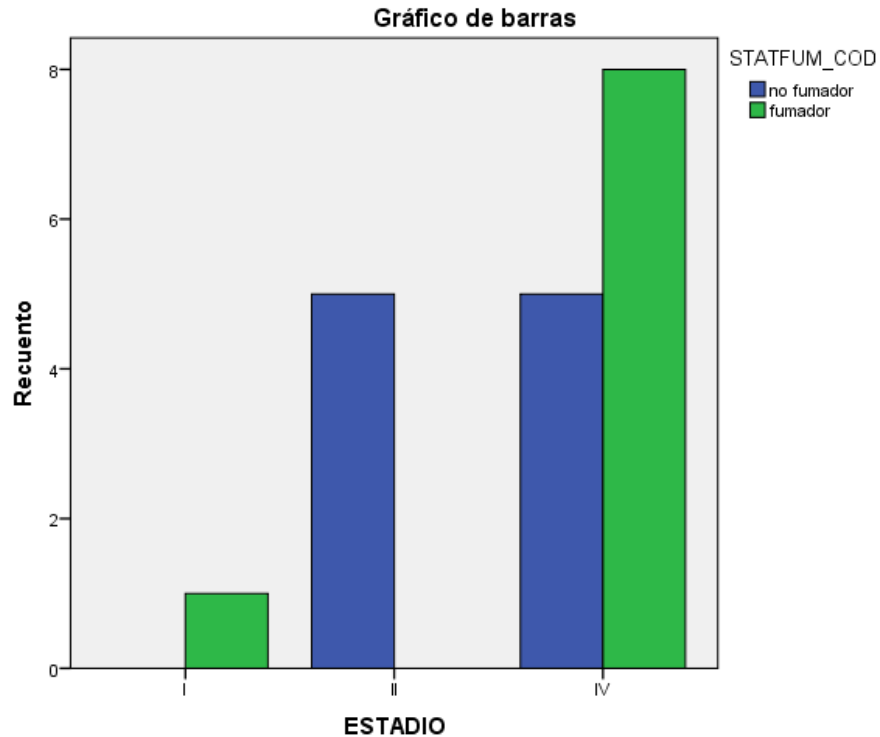
Los tumores en estadio II se hallan 2 en encía (40%) y 3 en lengua (60%). En el estadio IV se hallan en lengua (38,5%), 3 en encía (23,1), 2 en la zona trigono molar (15,4%) y 2 en suelo de boca (15,4%), 1 en la mucosa yugal (7,7%). Sin relación estadísticamente significativa ($p=0,862$) (Gráfica 2).



Gráfica 2. Distribución de las muestras con estadio I, II y IV con respecto a la localización tumoral

4.1.7 Distribución de estadios TNM y hábito tabáquico

De los casos en estadio II 5 son no fumadores (100%), y no hay fumadores. De los casos en estadio IV 8 son fumadores (61,5%) y 5 son no fumadores (38,5%). El único caso en estadio I es fumador (100%). Esto revela una diferencia estadísticamente significativa entre el estadio TNM de los fumadores y los no fumadores ($p= 0,036$) (Gráfica 3).



Gráfica 3. Distribución de las muestras con estadio I, II y IV con respecto al hábito tabáquico.

4.2 Calidad y concentración de ARN

Extrajimos el ARN total de 19 casos y 31 controles (Tablas 3 y 4) y por limitaciones anteriormente descritas analizamos las 8 mejores muestras por grupo (Tablas 5 y 6) teniendo en cuenta la calidad de la muestra en cuanto a pureza y degradación.

Los resultados pueden apreciarse en las tablas siguientes de casos y controles donde se especifica de cada muestra la concentración, expresada en nanogramos por cada microlitro (ng/microlitro), la integridad de la muestra, expresada con el valor numérico del RIN (Figura 34), el año de congelación y la pureza de la muestra con los valores de absorbancia $(A)_{260/280}$ y $(A)_{260/230}$ anteriormente descritos:

Control	ng/microlitro	RIN	Año	260/280	260/230
11	64.27	8.6	2015	1.97	1.99
12	444	8.2	2015	2.08	1.81
23	344,5	6,6	2015	1,98	1,72
33	220	6.5	2015	1,97	1,37
42	92,38	8,3	2015	1,9	1,18
45	195,54	8.9	2015	1,51	0,67
1003	403,23	7	2015	1,56	0,87
1004	163.34	7	2015	1.71	0.72
1005	263,55	9.6	2015	1,63	0,78
1006	208.52	9	2015	1.97	0.99
1007	266.17	8.6	2015	2.05	1.95
1012	596	8.8	2015	2	1,55
1013	430	10	2015	1,98	0,91
1020	632	8.8	2015	2,09	1,33
1021	433	9,6	2015	1,65	1,23
1022	202	8,6	2015	2,01	1,73
1023	349	10	2015	1,6	0,76
1024	1525	8.8	2015	2,06	2,1
2001	347	7,3	2015	1,95	1,99
2002	291	9.3	2015	2,02	1,69
2003	212	9.2	2015	2,07	1,92
2004	274	10	2015	2,04	1,58
2011	96,04	9.8	2015	1,73	0,36
2014	2930,6	8.1	2015	2.03	1.87
2015	269,22	8.4	2015	1,56	0,82
2017	111,07	8.9	2015	2,12	1,77
2019	335.10	9,7	2015	1.78	1.15
2020	300,04	9.7	2015	1,54	0,8
2021	82.41	8.7	2015	2.06	0.9
2024	1706	9,6	2015	1,92	1,23
2027	1552	8.2	2015	2,06	2,13

Tabla 3. Características de las muestras del grupo control analizadas.

CASO	ng/microlitro	RIN	Año de congelación	260/280	260/230
1500601	48,57	6,9	1999	1,92	1,83
1500603	300,86	6,5	2006	1,99	1,08
1500604	210,5	7,1	2001	2,08	2,07
103T	281,5	7	2014	2	1,32
108T	653,5	8,4	2014	2,03	1,66
109T	2149,53	8,9	2014	2,06	2,09
12T	2655,2	8,5	2012	2	2,13
15P1500647	10	6,5	1994	1,85	1,04
15P1500648	191	2,9	1997	2,04	2,13
15P1500649	374	8,1	1997	1,73	1,16
15P1500650	322	8,8	1998	2,04	1,95
15P1500651	36	6,8	1998	1,99	1,98
15P1500652	40	3,3	1999	1,92	1,85
15P1500653	229	10	1999	1,87	1,50
15P1500654	43	3,6	1999	1,91	1,33
15P1500655	61	1,1	2000	2,03	1,85
15P1500657	478	8,8	2001	1,99	1,98
CINTIA 1	528	8,3	2015	1,83	2,01
MRW22	972,27	8	2015	2,08	2,06

Tabla 4. Características de las muestras del grupo de casos analizadas.

MUESTRA	ng/microlitro	260/280	260/230	RIN
12	444	2.08	1.81	8.2
1006	208.52	1.97	0.99	9
1007	266.17	2.05	1.95	8.6
1020	632	2,09	1,33	8.8
1024	1525	2,06	2,1	8.8
2001	347	1,95	1,99	7,3
2003	212	2,07	1,92	9.2
2027	1552	2,06	2,13	8.2

Tabla 5. Controles seleccionados para el estudio con microarrays

MUESTRA	ng/microlitro	260/280	260/230	RIN
103T	281.5	2	1.32	7
108T	653.50	2.03	1.66	8.4
109T	2149.53	2.06	2.09	8.9
15P1500650	322	2.04	1.95	8.8
15P1500651	296	1.99	1.98	6.8
15P1500653	431	1.87	1.50	10
CINTIA 1	3532	1.83	2.01	8.3
MRW22	972.27	2.08	2.06	8

Tabla 6. Casos seleccionados para el estudio con microarrays

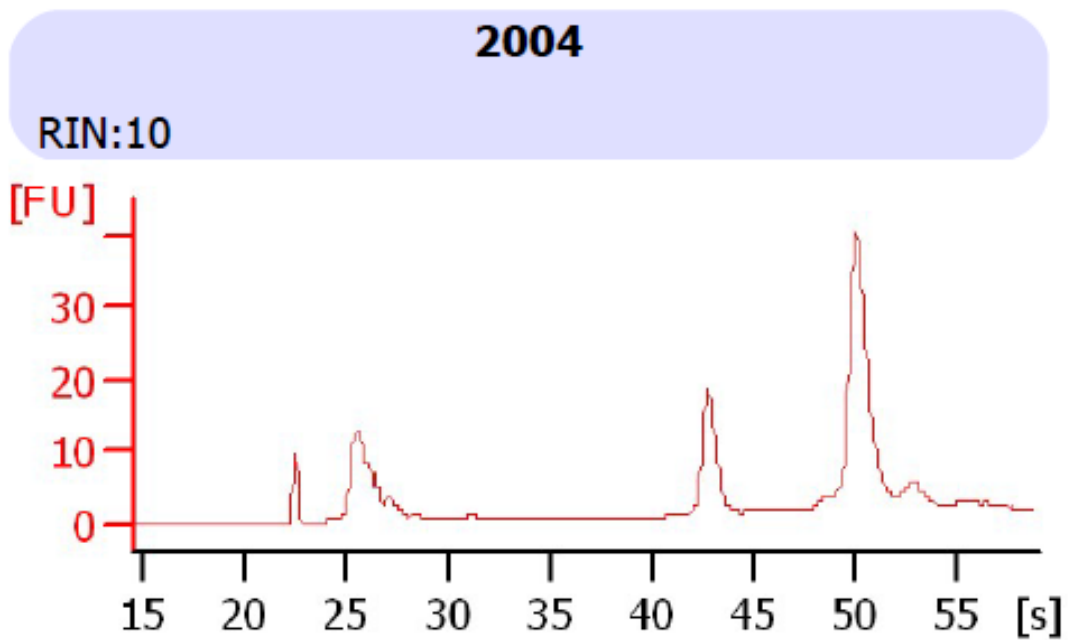
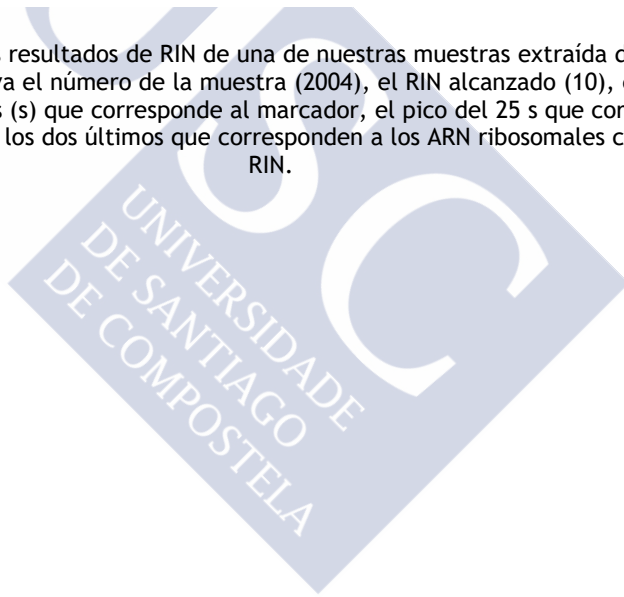


Figura 34. Ejemplo de los resultados de RIN de una de nuestras muestras extraída del Bioanalyzer 2100 de Agilent. En la gráfica se observa el número de la muestra (2004), el RIN alcanzado (10), el primer pico que está en el intervalo de 22 segundos (s) que corresponde al marcador, el pico del 25 s que corresponde con los ARNs de menos de 150 nucleótidos y los dos últimos que corresponden a los ARN ribosomales con los que se calcula el RIN.



4.2.1 Concentración de ARN total y RIN de casos y controles

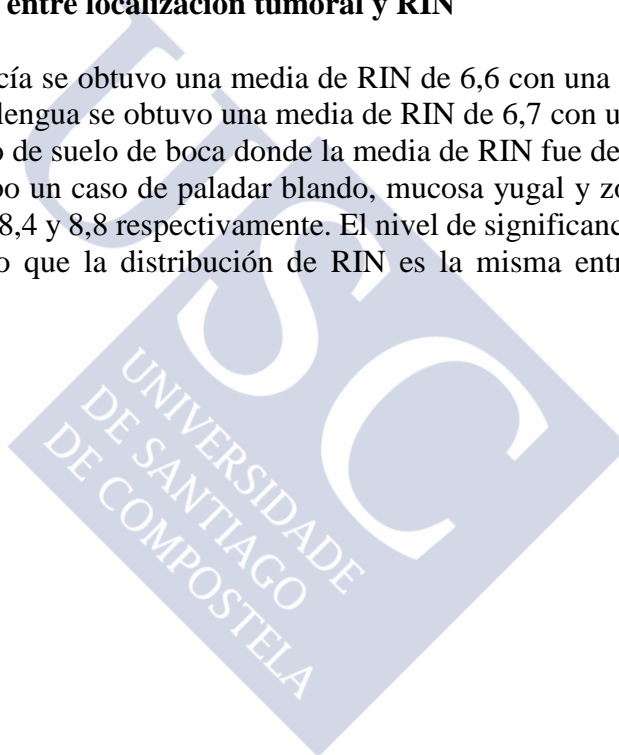
La media de RIN de los 31 controles fue de 8,70 (desviación estándar 0,9941) y la de concentración de 494,81 (desviación estándar 615,073) ng/ microlitro.

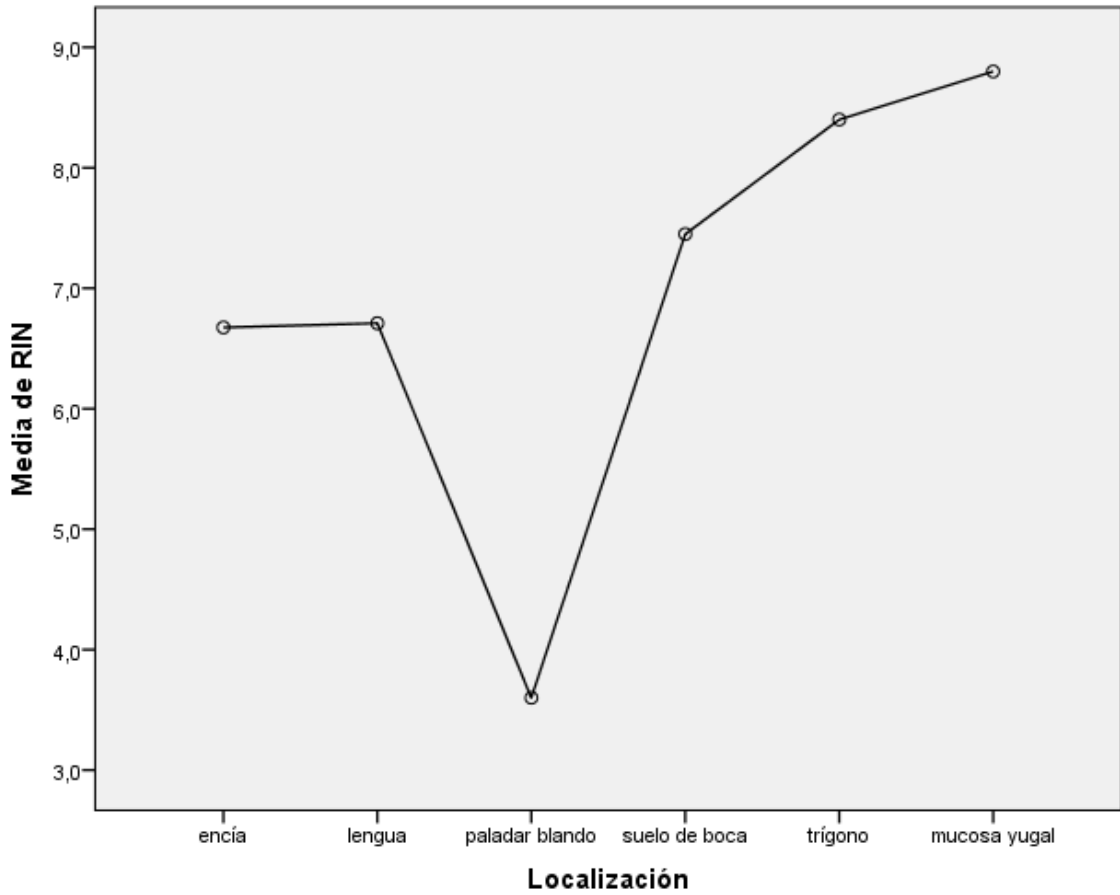
El análisis de los 19 casos reveló un RIN medio de 6,81 (desviación estándar 2,4035) y una concentración media de 504,43 (desviación estándar 717,757) ng/microlitro.

El análisis de la U de Mann Whitney para comparar las medias de los casos y controles reveló un valor p de 0,49 para la concentración de ARN y un valor p de 0,001 para el RIN, con lo que el RIN es significativamente superior en las muestras de los controles en comparación con los casos.

4.2.2 Asociación entre localización tumoral y RIN

De los 4 casos de encía se obtuvo una media de RIN de 6,6 con una desviación típica de 2,661; en los 10 casos de lengua se obtuvo una media de RIN de 6,7 con una desviación típica de 2,6739; dos casos hubo de suelo de boca donde la media de RIN fue de 7,4 y su desviación típica de 0,7778; sólo hubo un caso de paladar blando, mucosa yugal y zona retromolar cuya media de RIN fueron 3,6, 8,4 y 8,8 respectivamente. El nivel de significancia fue de 0,696 (test de Kruskal-Wallis) por lo que la distribución de RIN es la misma entre las categorías de localización (Gráfica 4).

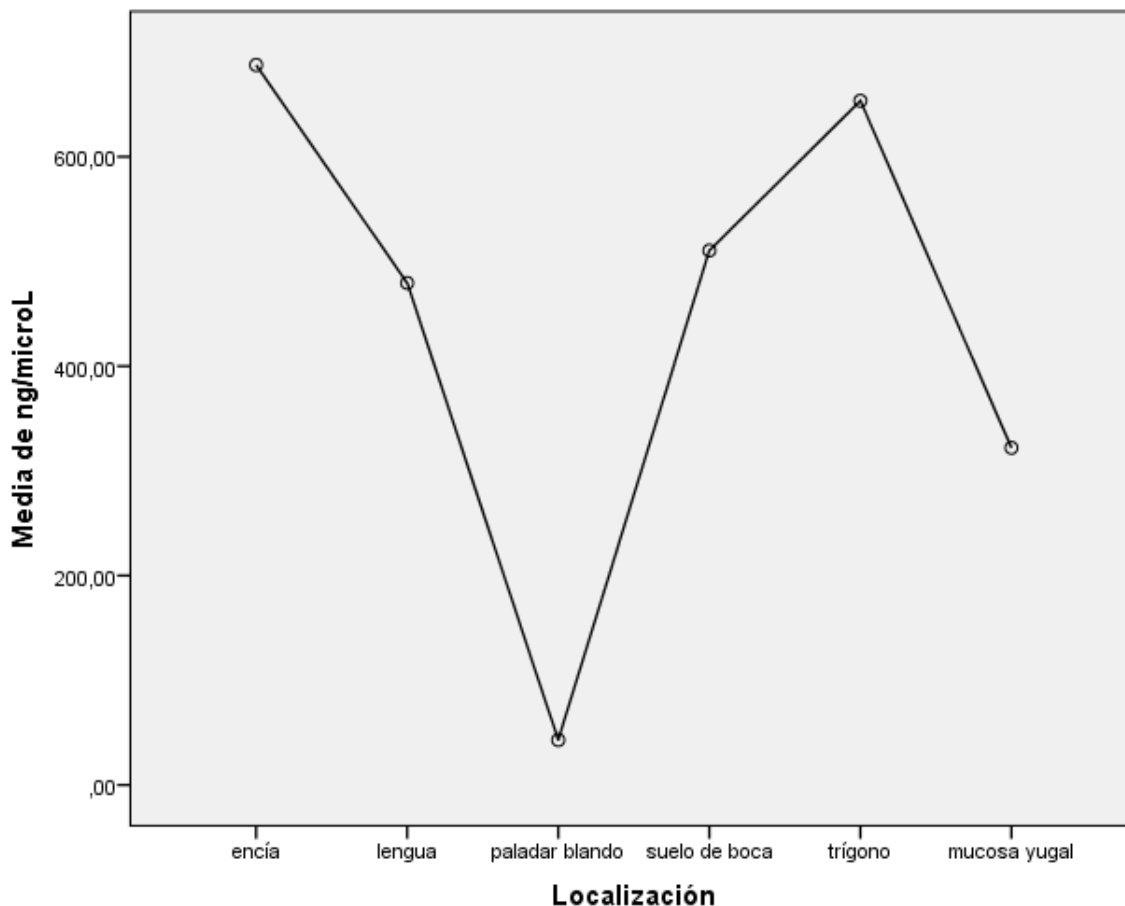




Gráfica 4. Asociación entre la localización de las muestras de COCE y la media del RIN obtenido.

4.2.3 Asociación entre localización tumoral y concentración de ARN total

Los 4 casos de encía presentaron una concentración media de 687,63 ng/microlitro con una desviación típica de 984,34046; en los 10 casos de lengua la media de concentración fue de 479,44 ng/microlitro y la desviación estándar de 783,92079; los 2 casos de suelo de boca tuvieron una media de concentración de 510,4200 y una desviación típica de 653,15453. Los únicos casos de paladar blando, mucosa yugal y zona retromolar tuvieron una media de concentración de 43,00 ng/microlitro, 322,00 ng/microlitro y 653,50 ng/microlitro respectivamente. El nivel de significancia fue de 0,774 por lo que no se halló relación entre la concentración de ARN total extraído de las muestras y el tejido usado (Gráfica 5).

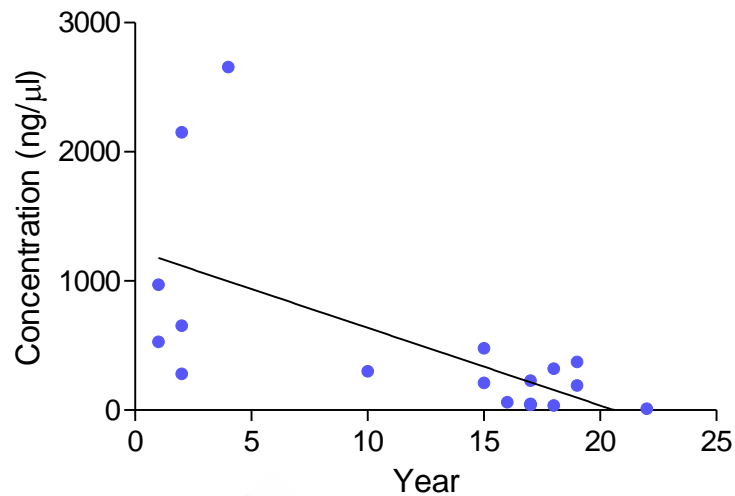


Gráfica 5. Asociación entre la localización de las muestras del COCE y la concentración extraíble media de ARN total.

4.2.4 Asociación entre RIN y años de congelación de los tumores

La correlación de *Spearman* para relacionar la influencia del paso del tiempo en los casos con la concentración de ARN total fue de -0.632 ($p= 0,006$) y con el RIN fue de $-0,350$ ($p=0.142$).

Concluyendo así que el paso del tiempo influyó en la cantidad de ARN total extraíble en las muestras, pero no sobre el RIN (Gráfica 6).



Gráfica 6. Relación de la variación de la concentración de ARN total obtenida y el año de extracción de la muestra.

Al dicotomizar la variable de “tiempo de congelación” en menores y mayores a 5 años, en relación a la concentración siguen existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$, concentración media menores de 5 años: 1206,67 ng/microlitro y mayores de 5 años 180,33 ng/microlitro), sin embargo cuando comparamos esta variable dicotomizada con el RIN, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, $p=0,087$, (RIN medio en muestras que llevan menos de 5 años congeladas: 8,18; RIN para muestras que llevan más de 5 años congeladas: 6,16).

4.3 Perfil de expresión diferencial de microARNs

4.3.1 Expresión diferencial de microARNs en muestras de COCE y controles

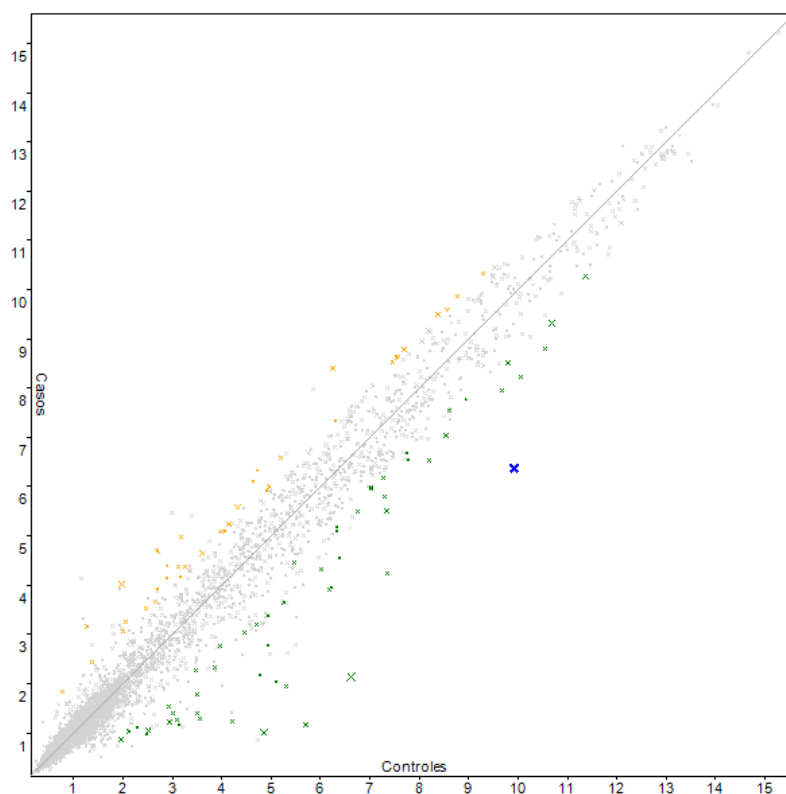
Tras el análisis de imagen los datos fueron filtrados y, gracias al software Expression Console® Affymetrix. El análisis del TAC reveló un total de 97 genes desregulados en el COCE en comparación con los controles sanos (36 sobre expresados y 61 infra expresados), de los cuales 80 son microARNs. En la tabla 7 se puede observar el Transcript Cluster ID, que es el código de la sonda del microarray, el Transcript ID Array Design, que es el microARN al que corresponde el código de la sonda, *fold change*, que es el número de veces que un gen determinado está desregulado en un grupo con respecto al otro, y el ANOVA *p-value*, que corresponde al nivel de significancia del análisis (valor p).

Transcript Cluster ID	Transcript ID (Array Design)	Fold Change	ANOVA p-value (casos vs controles)
20525453	hsa-miR-6746-5p	-11,62	8,73E-07
20504362	hsa-miR-617	-22,46	0,000002
20525022	hsa-miR-6510-3p	-14,32	0,000019
20525611	hsa-miR-6825-5p	4,17	0,000096
20500181	hsa-miR-99a-5p	-2,56	0,000125
20520577	hsa-miR-5196-5p	2,38	0,000176
20518785	hsa-miR-4417	4,45	0,000183
20504559	hsa-miR-1224-5p	-3,55	0,000192
20500460	hsa-miR-204-5p	-2,75	0,000259
20526180	hsa-miR-7111-5p	4,03	0,000311
20503809	hsa-miR-497-5p	-2,84	0,00033
20525701	hsa-miR-6870-5p	2,07	0,000333
20500723	hsa-miR-27b-3p	-2,14	0,00037
20506897	hsa-miR-664a-3p	-2,11	0,000386
20525491	hsa-miR-6765-5p	2,12	0,0004
20521813	hsa-miR-5580-3p	-23,23	0,000534
20532569	14ql-4	-3,3	0,000777
20529568	hsa-miR-7977	-2,08	0,000819
20529782	hsa-miR-8072	2,19	0,000997
20506787	hsa-miR-1237-5p	2,04	0,001051
20525473	hsa-miR-6756-5p	-2,46	0,001102
20503896	hsa-miR-509-3p	-7,8	0,00121
20519681	hsa-miR-4788	2,09	0,001216
20519524	hsa-miR-4706	2,13	0,001469
20500781	hsa-miR-149-3p	2,13	0,001535
20505965	hsa-miR-509-3-5p	-4,82	0,001554
20503895	hsa-miR-509-5p	-2,11	0,001738
20503105	hsa-miR-486-5p	-3,38	0,001901
20525571	hsa-miR-6805-5p	2,11	0,002044
20515603	hsa-miR-3175	2,63	0,002174
20506818	hsa-miR-1290	3,7	0,002964
20534505	hsa-mir-139	-3,07	0,003268
20524036	hsa-miR-6126	2,1	0,003419
20518890	hsa-miR-4495	2,1	0,00383
20517911	hsa-miR-3659	-3,33	0,003943
20509224	hsa-miR-1908-5p	2,02	0,003962
20506797	hsa-miR-663b	3,48	0,004417
20518919	hsa-miR-4521	-8,73	0,004474
20525633	hsa-miR-6780b-5p	2,02	0,004806
20500182	hsa-miR-99a-3p	-3,92	0,005754

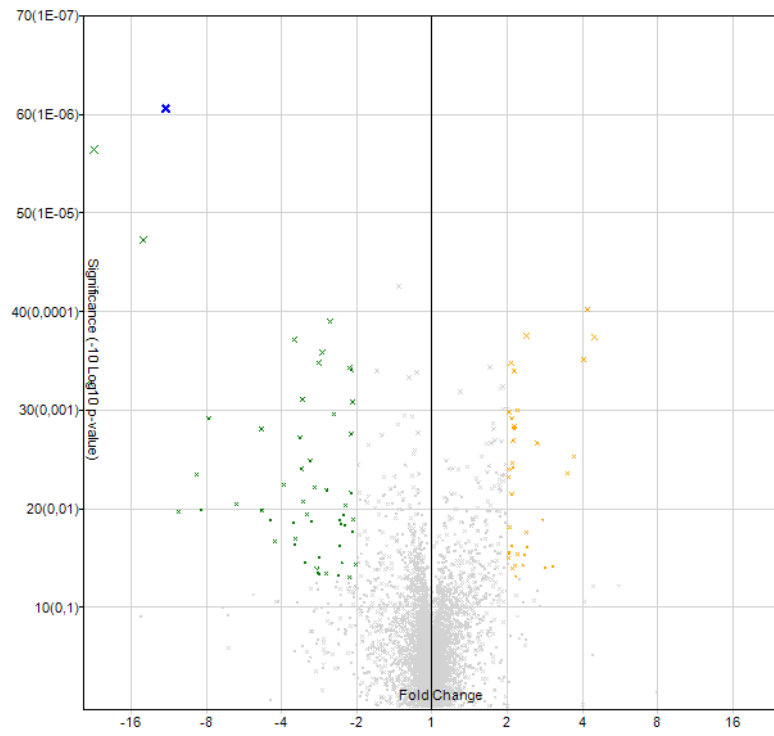
20505745	hsa-miR-874-5p	-2,96	0,006059
20532568	14ql-4	-2,64	0,00647
20518432	hsa-miR-3911	-2,11	0,006907
20515610	hsa-miR-3180-3p	2,08	0,007077
20502446	hsa-miR-451a	-3,28	0,008397
20504421	hsa-miR-654-3p	-6,05	0,009
20532594	14qll-22	-2,21	0,009243
20500457	hsa-miR-199b-5p	-8,4	0,010167
20501160	hsa-miR-29c-3p	-4,81	0,010213
20503106	hsa-miR-486-3p	-4,78	0,010407
20525563	hsa-miR-6801-5p	-10,3	0,010696
20500743	hsa-miR-138-5p	-3,17	0,011462
20500186	hsa-miR-101-3p	-2,26	0,011584
20500720	hsa-miR-23b-5p	-2,06	0,012861
20525485	hsa-miR-6762-5p	-4,45	0,013045
20523018	hsa-miR-6086	-2,33	0,013054
20518625	hsa-miR-3937	2,77	0,013164
20506823	hsa-miR-1295a	-3,03	0,013422
20528493	hsa-miR-7641	-3,59	0,013924
20532627	ACA17	-2,32	0,014394
20503803	hsa-miR-494-3p	-2,23	0,014842
20518818	hsa-miR-4443	2,04	0,01543
20534131	ENSG00000263442	-2,08	0,017241
20534152	ENSG00000264591	-2,08	0,017241
20534159	ENSG00000265325	-2,08	0,017241
20534163	ENSG00000265607	-2,08	0,017241
20534183	ENSG00000266646	-2,08	0,017241
20534187	ENSG00000266755	-2,08	0,017241
20538261	U84	-2,08	0,017241
20525468	hsa-miR-6753-3p	2,38	0,017418
20501213	hsa-miR-365b-5p	-3,54	0,020201
20525639	hsa-miR-6838-5p	-4,26	0,021521
20525697	hsa-miR-6868-5p	-3,55	0,02314
20518817	hsa-miR-4442	2,08	0,023642
20500432	hsa-miR-139-5p	-2,35	0,023899
20505790	hsa-miR-885-3p	2,4	0,02427
20518425	hsa-miR-3180	2,03	0,02763
20525438	hsa-miR-6738-5p	2,03	0,028661
20503793	hsa-miR-146b-5p	2,19	0,02921
20521825	hsa-miR-5585-3p	2,35	0,029274
20538298	mgh18S-121	-2,84	0,031249

20525716	hsa-miR-6877-3p	2,01	0,031658
20538141	U18A	-2,29	0,034712
20500135	hsa-miR-19a-3p	-3,23	0,035357
20500741	hsa-miR-135a-3p	2,31	0,036948
20538268	U8	-2,02	0,036967
20525470	hsa-miR-6754-3p	2,14	0,038308
20532991	ENSG00000207118	3,03	0,038715
20518621	hsa-miR-3934-5p	2,82	0,039768
20515611	hsa-miR-548w	2,09	0,039847
20515647	hsa-miR-514b-5p	-2,88	0,0409
20504550	hsa-miR-758-3p	-2,86	0,044734
20532579	14qll-12	-2,65	0,044976
20501161	hsa-miR-30c-1-3p	-2,83	0,045867
20538156	U28	-2,37	0,046883
20526885	hsa-miR-7162-3p	-2,14	0,049205
20529138	hsa-miR-7846-3p	2,16	0,049409

Tabla 7. Genes desregulados en el análisis de casos y controles.



Gráfica 7. Scatter plot, del análisis de las muestras de COCE y los controles, extraído del TAC.



Gráfica 8. Volcano plot, del análisis de las muestras de COCE y los controles, extraído del TAC.



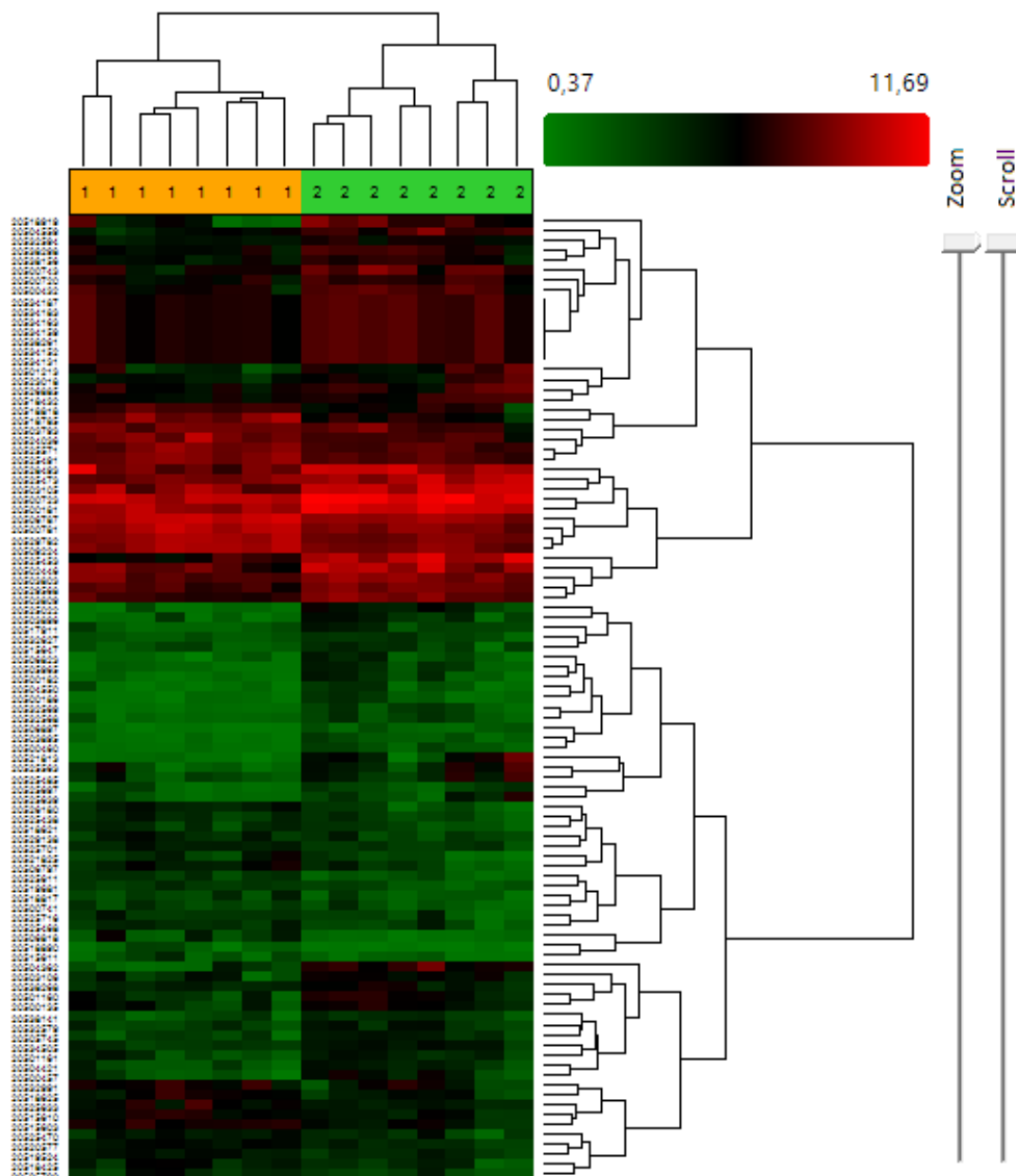


Figura 35. Análisis no supervisado de las 16 muestras de los microARNs. Cada columna representa cada muestra y cada fila representa cada microARN desregulado. El color rojo representa los microARNs que están expresados por encima de la media, el color verde aquellos que están por debajo de la media y el negro indica ausencia de variación (Transcriptome Analysis Console, TAC).

4.3.2 Expresión diferencial por estadíos (II y IV)

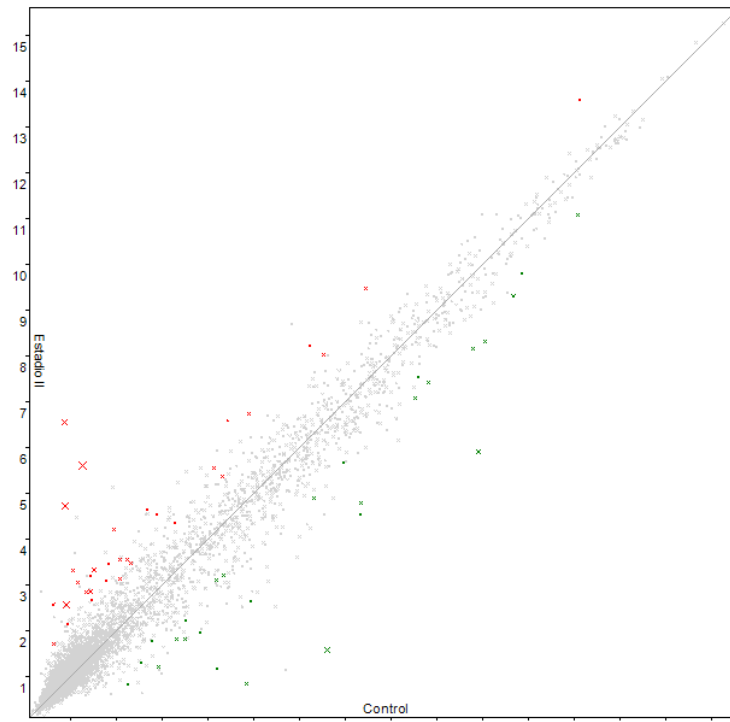
Aunque el número de muestras son escasas para establecer una relación clara, hicimos el análisis de expresión diferencial por estadíos con el ánimo de hallar microARNs que indiquen diferencias entre tumores en cuanto a agresividad y/o pronóstico y poder compararlos así con otros estudios.

El análisis de las muestras con estadio II con respecto a los controles reveló un total de 59 genes diferentemente expresados, de los cuales 27 estaban sobre expresados y 32 infra expresados (Tabla 8).

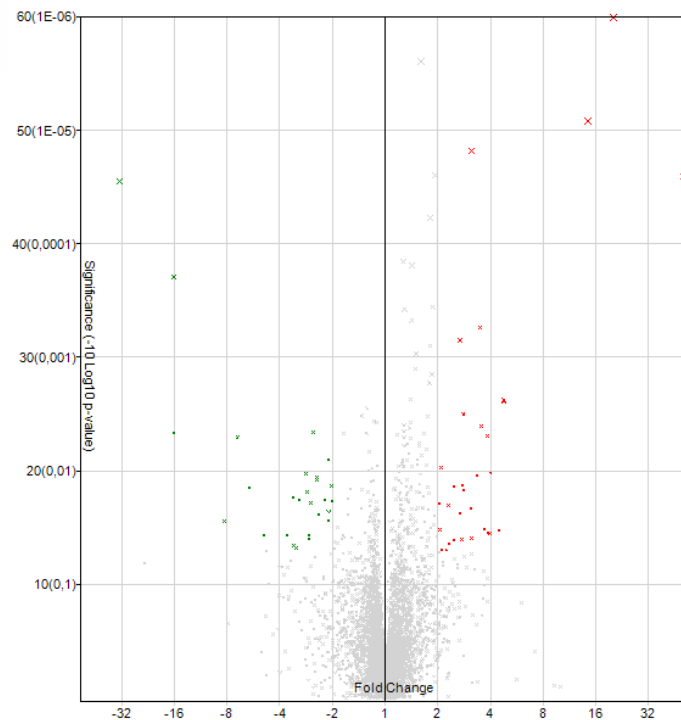
Transcript Cluster ID	Transcript ID (Array Design)	Fold Change	ANOVA p-value (estadio II vs controles)
20506818	hsa-miR-1290	20,23	0,000001
20504557	hsa-miR-767-5p	14,39	0,000008
20525665	hsa-miR-6852-5p	3,12	0,000015
20500393	hsa-miR-196a-5p	50,75	0,000026
20504362	hsa-miR-617	-33,02	0,000028
20525453	hsa-miR-6746-5p	-16,08	0,000197
20500435	hsa-miR-7-5p	3,49	0,000548
20534379	hsa-mir-31	2,67	0,000706
20500192	hsa-miR-105-5p	4,76	0,002377
20525611	hsa-miR-6825-5p	4,77	0,002443
20506837	hsa-miR-1246	2,81	0,003152
20525633	hsa-miR-6780b-5p	3,56	0,004035
20500181	hsa-miR-99a-5p	-2,58	0,004616
20525022	hsa-miR-6510-3p	-16,12	0,004634
20501771	hsa-miR-196b-5p	3,84	0,004928
20504559	hsa-miR-1224-5p	-6,96	0,005094
20538295	mgU6-53	-2,11	0,008035
20525586	hsa-miR-6812-3p	2,09	0,009387
20524036	hsa-miR-6126	4	0,010568
20503104	hsa-miR-485-3p	-2,82	0,010595
20536680	hsa-mir-4430	3,37	0,010965
20538120	U102	-2,46	0,011395
20534230	HBII-210	-2,44	0,011991
20500164	hsa-miR-31-5p	2,75	0,013412
20500730	hsa-miR-125b-5p	-2,02	0,0136
20517706	hsa-miR-4257	2,47	0,013817
20518919	hsa-miR-4521	-5,96	0,013968
20525727	hsa-miR-6883-5p	2,81	0,014803
20503809	hsa-miR-497-5p	-2,77	0,015327
20528493	hsa-miR-7641	-3,35	0,016976
20525473	hsa-miR-6756-5p	-3,11	0,017978
20538296	mgU6-53	-2,21	0,01809
20525556	hsa-miR-6797-3p	-2,01	0,018606
20534237	HBII-289	-2,65	0,019126
20537530	hsa-mir-6787	2,04	0,01935
20532758	ENSG00000199856	2,3	0,020313

20525430	hsa-miR-6734-5p	3,08	0,021471
20500798	hsa-miR-195-5p	-2,09	0,023045
20519524	hsa-miR-4706	2,67	0,023553
20500464	hsa-miR-210-5p	-2,39	0,024223
20529568	hsa-miR-7977	-2,1	0,02724
20503896	hsa-miR-509-3p	-8,25	0,027681
20506866	hsa-miR-1269a	3,7	0,032505
20520577	hsa-miR-5196-5p	2,05	0,033098
20505608	hsa-miR-675-5p	4,47	0,033117
20526180	hsa-miR-7111-5p	3,87	0,035286
20518785	hsa-miR-4417	3,96	0,035332
20532594	14qll-22	-2,71	0,036734
20505745	hsa-miR-874-5p	-4,93	0,036786
20506838	hsa-miR-1247-5p	-3,66	0,036893
20518621	hsa-miR-3934-5p	3,13	0,039182
20519627	hsa-miR-4758-3p	-2,72	0,03989
20518439	hsa-miR-3916	2,75	0,040216
20525558	hsa-miR-6798-3p	2,47	0,041094
20529565	hsa-miR-7974	2,31	0,044018
20532568	14ql-4	-3,32	0,045412
20517911	hsa-miR-3659	-3,23	0,047465
20537593	hsa-mir-6848	2,23	0,049524
20536202	hsa-mir-3123	2,1	0,049661

Tabla 8. Genes desregulados en las muestras de estadio II con respecto a los controles.



Gráfica 9. Scatter plot del análisis de las muestras de los casos con estadio II y los controles.



Gráfica 10. Volcano Plot en el análisis de los casos con estadio II y las muestras control.

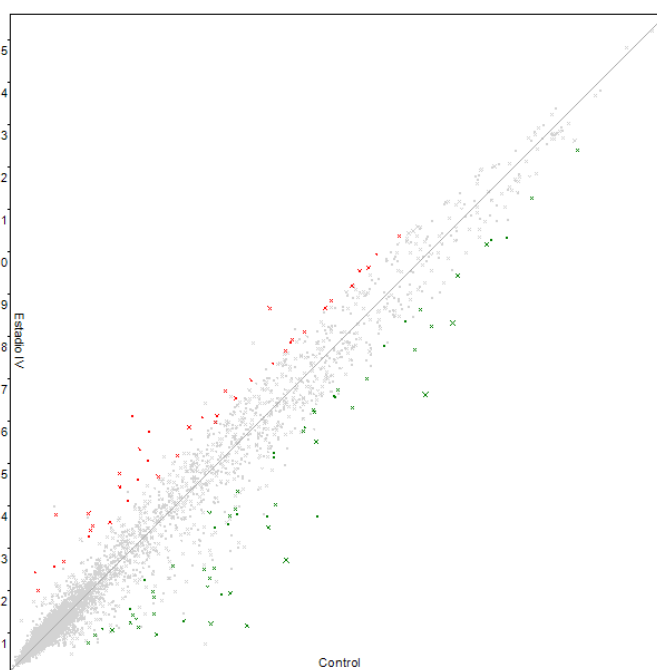
En el análisis de expresión diferencial de las muestras de estadio estadio IV con respecto a los controles encontramos 107 genes diferentemente expresados de los cuales 67 estaban sobre expresados y 40 infra expresados (Tabla 9).

Transcript Cluster ID	Transcript ID (Array Design)	Fold Change	ANOVA p-value (estadio IV vs controles)
20525453	hsa-miR-6746-5p	-9,85	0,000012
20504362	hsa-miR-617	-15,02	0,000029
20503105	hsa-miR-486-5p	-4,73	0,000095
20525022	hsa-miR-6510-3p	-12,48	0,000197
20500723	hsa-miR-27b-3p	-2,3	0,000356
20504559	hsa-miR-1224-5p	-3,59	0,000438
20538176	U41	2,2	0,000577
20518785	hsa-miR-4417	5,35	0,000625
20520577	hsa-miR-5196-5p	2,87	0,000666
20500460	hsa-miR-204-5p	-2,75	0,000752
20525491	hsa-miR-6765-5p	2,22	0,00078
20525611	hsa-miR-6825-5p	3,6	0,000804
20525701	hsa-miR-6870-5p	2,12	0,000805
20506787	hsa-miR-1237-5p	2,09	0,000834
20500181	hsa-miR-99a-5p	-2,39	0,000876
20506897	hsa-miR-664a-3p	-2,29	0,001302
20526180	hsa-miR-7111-5p	4,19	0,001346
20525571	hsa-miR-6805-5p	2,16	0,001374
20500781	hsa-miR-149-3p	2,22	0,001382
20529782	hsa-miR-8072	2,25	0,001437
20503106	hsa-miR-486-3p	-6,6	0,001476
20503809	hsa-miR-497-5p	-2,92	0,001549
20509224	hsa-miR-1908-5p	2,06	0,001817
20525593	hsa-miR-6816-5p	2,02	0,001917
20519681	hsa-miR-4788	2,2	0,002089
20525563	hsa-miR-6801-5p	-10,37	0,002321
20521813	hsa-miR-5580-3p	-23,21	0,002377
20524034	hsa-miR-6124	2,19	0,002882
20505965	hsa-miR-509-3-5p	-6,09	0,002906
20525485	hsa-miR-6762-5p	-5,35	0,003214
20518852	hsa-miR-4467	2,03	0,003245
20532569	14ql-4	-3,28	0,003378
20502446	hsa-miR-451a	-3,98	0,003406
20506795	hsa-miR-1202	2,14	0,003435
20515603	hsa-miR-3175	2,88	0,00392
20503895	hsa-miR-509-5p	-2,25	0,004125
20501213	hsa-miR-365b-5p	-5,13	0,005408
20525473	hsa-miR-6756-5p	-2,27	0,005498
20503896	hsa-miR-509-3p	-7,64	0,00605
20504572	hsa-miR-1301-3p	2,24	0,00651
20532585	14qll-17	-2,05	0,006647

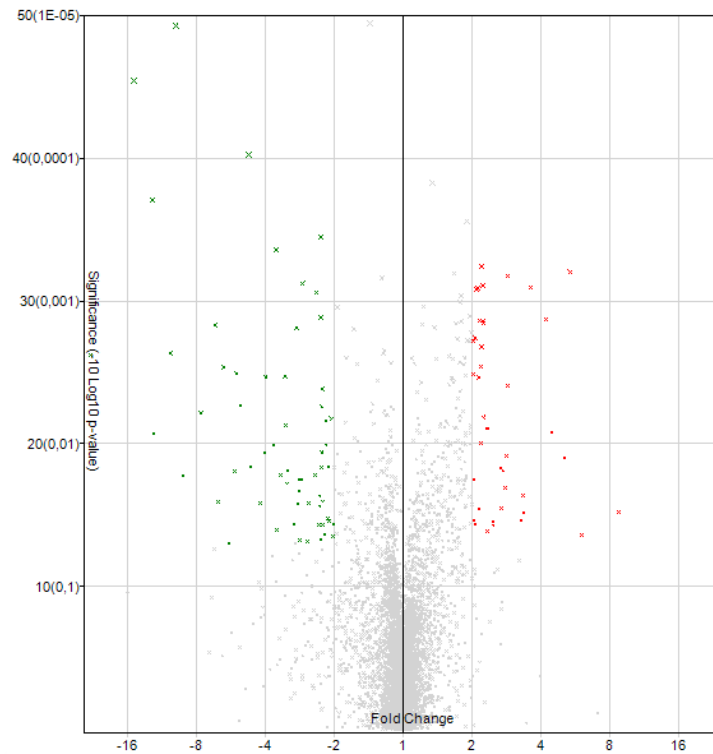
20500462	hsa-miR-205-5p	-2,17	0,006923
20534505	hsa-mir-139	-3,26	0,007491
20518890	hsa-miR-4495	2,33	0,007828
20506797	hsa-miR-663b	4,46	0,008358
20518919	hsa-miR-4521	-12,31	0,008505
20526178	hsa-miR-7110-5p	2,19	0,009948
20500743	hsa-miR-138-5p	-3,68	0,010294
20538173	U38B	-2,17	0,010296
20503803	hsa-miR-494-3p	-2,26	0,011443
20500182	hsa-miR-99a-3p	-4,03	0,011578
20505790	hsa-miR-885-3p	2,82	0,012195
20519573	hsa-miR-4730	5,08	0,012541
20501161	hsa-miR-30c-1-3p	-4,63	0,014424
20500440	hsa-miR-10b-5p	-2,12	0,014561
20500769	hsa-miR-126-3p	-2,28	0,014579
20518817	hsa-miR-4442	2,67	0,014836
20518625	hsa-miR-3937	2,73	0,015343
20517911	hsa-miR-3659	-3,2	0,015397
20501160	hsa-miR-29c-3p	-5,43	0,015502
20500720	hsa-miR-23b-5p	-2,43	0,016497
20525697	hsa-miR-6868-5p	-3,43	0,016667
20500457	hsa-miR-199b-5p	-9,2	0,016766
20515610	hsa-miR-3180-3p	2,04	0,017739
20532627	ACA17	-2,85	0,017813
20505745	hsa-miR-874-5p	-2,79	0,017828
20500777	hsa-miR-138-1-3p	-3,2	0,019113
20500741	hsa-miR-135a-3p	2,78	0,020296
20500463	hsa-miR-205-3p	-2,85	0,021422
20521825	hsa-miR-5585-3p	3,35	0,02315
20500186	hsa-miR-101-3p	-2,31	0,023416
20500459	hsa-miR-203a	-2,24	0,02541
20504421	hsa-miR-654-3p	-6,43	0,025591
20525639	hsa-miR-6838-5p	-4,2	0,025997
20532568	14q1-4	-2,59	0,026028
20517832	hsa-miR-23c	-2,9	0,026364
20523018	hsa-miR-6086	-2,31	0,027616
20506003	hsa-miR-934	2,68	0,028142
20518425	hsa-miR-3180	2,14	0,028609
20525384	hsa-miR-6716-3p	8,75	0,030137
20503797	hsa-miR-492	3,35	0,030473
20532594	14q11-22	-2,13	0,033251
20518818	hsa-miR-4443	2,04	0,034421
20521810	hsa-miR-664b-5p	3,27	0,03455

20525585	hsa-miR-6812-5p	-2,11	0,034831
20515611	hsa-miR-548w	2,48	0,035095
20504556	hsa-miR-550a-3-5p	-2,01	0,036639
20506823	hsa-miR-1295a	-3	0,036729
20518901	hsa-miR-4505	2,06	0,036825
20534131	ENSG00000263442	-2,25	0,036907
20534152	ENSG00000264591	-2,25	0,036907
20534159	ENSG00000265325	-2,25	0,036907
20534163	ENSG00000265607	-2,25	0,036907
20534183	ENSG00000266646	-2,25	0,036907
20534187	ENSG00000266755	-2,25	0,036907
20538261	U84	-2,25	0,036907
20500432	hsa-miR-139-5p	-2,34	0,037146
20525414	hsa-miR-6726-5p	2,48	0,037563
20528493	hsa-miR-7641	-3,56	0,039987
20525468	hsa-miR-6753-3p	2,34	0,040925
20538268	U8	-2,21	0,04319
20525030	hsa-miR-6514-3p	6,01	0,043522
20526885	hsa-miR-7162-3p	-2,02	0,044692
20538200	U51	-2,3	0,046877
20500157	hsa-miR-27a-3p	-2,84	0,047301
20538141	U18A	-2,62	0,048596
20518783	hsa-miR-378e	-5,77	0,049564

Tabla 9. Genes desregulados en las muestras de estadio IV con respecto a los controles.



Gráfica 11. Scatter plot del análisis de las muestras de los casos con estadio IV y los controles



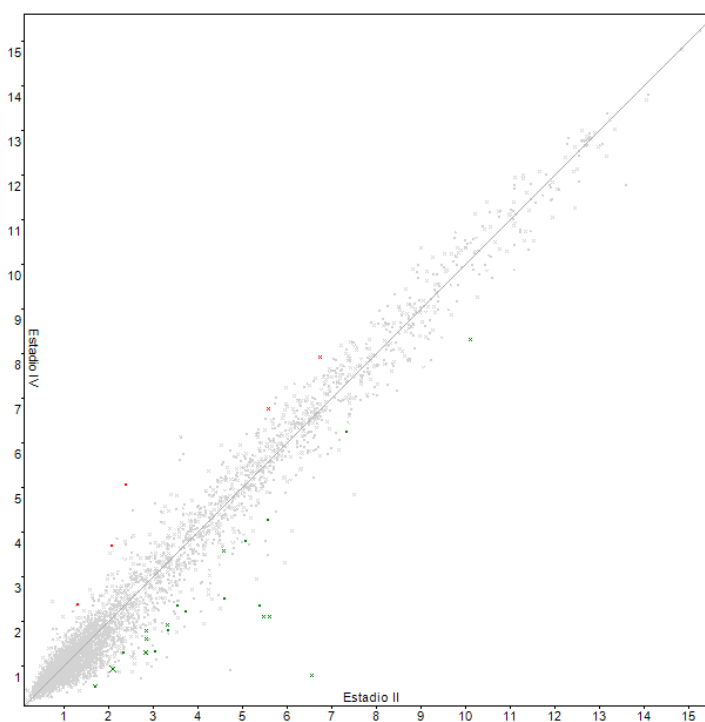
Gráfica 12. Volcano plot del análisis de las muestras de los casos con estadio IV y los controles

También comparamos la expresión diferencial entre estadio IV y estadio II donde 26 genes resultaron desregulados, 21 sobre expresados y 5 infra expresados (Tabla 10).

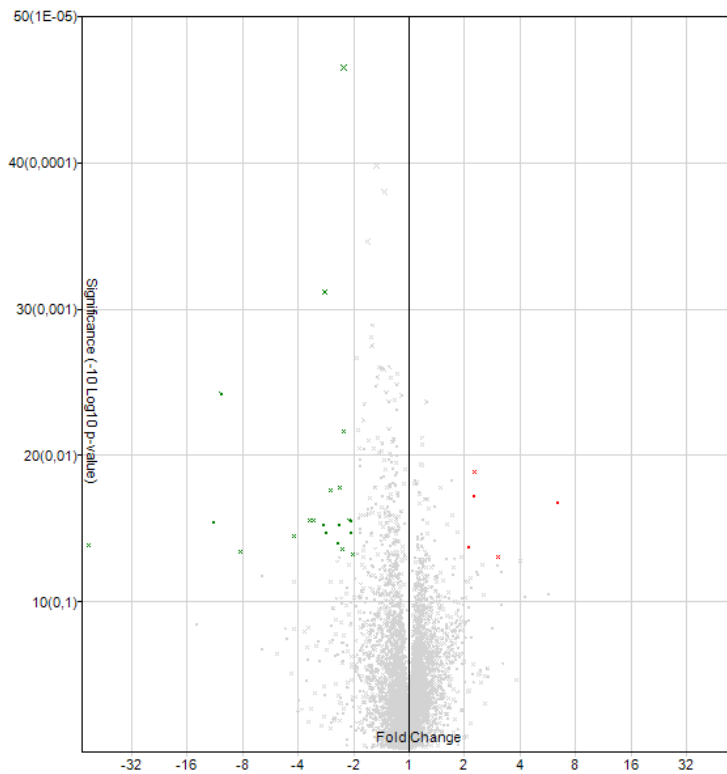
Transcript Cluster ID	Transcript ID Array	Fold Change	ANOVA (valor p estadio IV vs estadio II)
20511559	hsa-miR-2115-3p	-2,25	0,000022
20532596	14qll-24	-2,87	0,000764
20515619	hsa-miR-3065-3p	-10,45	0,003798
20525586	hsa-miR-6812-3p	-2,25	0,006843
20538176	U41	2,25	0,012931
20534379	hsa-mir-31	-2,38	0,016582
20517915	hsa-miR-3663-5p	-2,66	0,017352
20517816	hsa-miR-3609	2,23	0,018936
20521810	hsa-miR-664b-5p	6,37	0,021121
20515635	hsa-miR-3194-5p	-3,31	0,027652
20518815	hsa-miR-4440	-2,11	0,027667
20503105	hsa-miR-486-5p	-3,47	0,027858
20500468	hsa-miR-212-5p	-2,07	0,027942
20506818	hsa-miR-1290	-11,45	0,028668
20500777	hsa-miR-138-1-3p	-2,4	0,029618

20500435	hsa-miR-7-5p	-2,92	0,030083
20518806	hsa-miR-4433-5p	-2,08	0,033723
20504351	hsa-miR-610	-2,81	0,033849
20525485	hsa-miR-6762-5p	-4,23	0,035595
20519549	hsa-miR-4717-3p	-2,44	0,039481
20500393	hsa-miR-196a-5p	-54,91	0,041185
20500464	hsa-miR-210-5p	2,1	0,042329
20501172	hsa-miR-299-5p	-2,3	0,043767
20515618	hsa-miR-3065-5p	-8,19	0,045456
20518835	hsa-miR-4455	-2,02	0,047272
20523016	hsa-miR-6084	3,03	0,049574

Tabla 10. Genes desregulados en las muestras de estadio IV con respecto a las muestras con estadio II.



Gráfica 13. Scatter plot del análisis de las muestras de los casos con estadio IV y las muestras con estadio II.



Gráfica 14. Volcano plot del análisis de las muestras de los casos con estadio IV y las muestras de casos con estadio II.

4.3.3 Expresión diferencial mujeres y hombres

Analizamos la expresión diferencial de microARNs entre mujeres y hombres de las 16 muestras analizadas con los microarrays. En el primer análisis no tuvimos en cuenta la pertenencia al grupo de casos o controles de la muestra, obteniendo un total de 39 genes diferentemente expresados, 14 sobre expresados y 25 infra expresados (Tabla 11).

Transcript Cluster ID	Transcript ID (Array Design)	Fold Change	ANOVA p-value (mujeres vs hombres)
20525697	hsa-miR-6868-5p	-4,47	0,00005
20519488	hsa-miR-4684-3p	-2,26	0,000054
20521783	hsa-miR-5571-5p	2,16	0,000944
20526178	hsa-miR-7110-5p	2,19	0,00101
20532598	14qll-26	2,74	0,001047
20517690	hsa-miR-4310	2,33	0,00131
20523018	hsa-miR-6086	-2,51	0,001568
20500718	hsa-miR-15b-5p	-2,09	0,002303
20503886	hsa-miR-505-5p	-2,18	0,002416

20526885	hsa-miR-7162-3p	-2,81	0,003219
20519659	hsa-miR-4778-5p	-2,22	0,003482
20525418	hsa-miR-6728-5p	-2,13	0,004151
20521813	hsa-miR-5580-3p	-22,6	0,004211
20525529	hsa-miR-6784-5p	2,06	0,004922
20532599	14qll-26	2,48	0,00561
20525639	hsa-miR-6838-5p	-4,24	0,00746
20518623	hsa-miR-3935	-2,18	0,011931
20525692	hsa-miR-6865-3p	3,02	0,013401
20504316	hsa-miR-548a-3p	2,58	0,013511
20517810	hsa-miR-3605-5p	-7,39	0,013541
20525563	hsa-miR-6801-5p	-12,21	0,013667
20515603	hsa-miR-3175	2,31	0,013816
20500123	hsa-let-7f-5p	-2,6	0,015902
20504285	hsa-miR-564	-2,18	0,019703
20500780	hsa-miR-149-5p	-2,48	0,020386
20506790	hsa-miR-1238-3p	2,03	0,020654
20519461	hsa-miR-4667-5p	-3,55	0,0214
20525585	hsa-miR-6812-5p	-2,18	0,022017
20518841	hsa-miR-4461	-2,12	0,023266
20502237	hsa-miR-20b-5p	-2,17	0,029543
20501309	hsa-miR-133b	31,67	0,030078
20500800	hsa-miR-206	25,4	0,030653
20524995	hsa-miR-6499-5p	-2,17	0,031237
20504556	hsa-miR-550a-3-5p	-2,28	0,031294
20505799	hsa-miR-374b-5p	-3,78	0,032141
20509227	hsa-miR-1909-3p	2,14	0,04076
20504433	hsa-miR-421	-3,4	0,04412
20519576	hsa-miR-4732-5p	-2,01	0,047291
20515646	hsa-miR-3201	2,02	0,047485

Tabla 11. Genes desregulados al comparar las muestras de mujeres con las de los hombres indiferentemente al grupo de casos o controles al que pertenecieran.

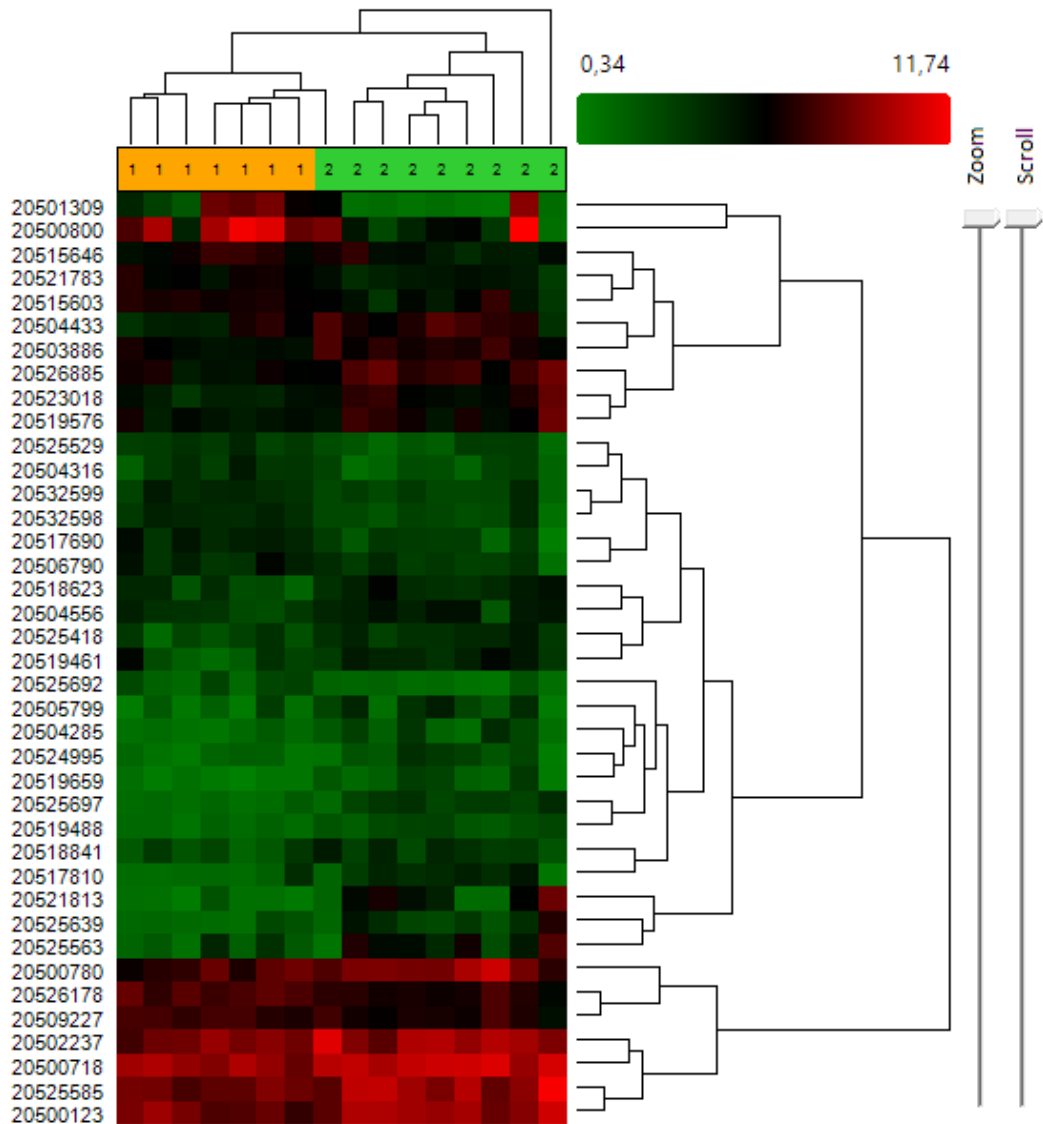
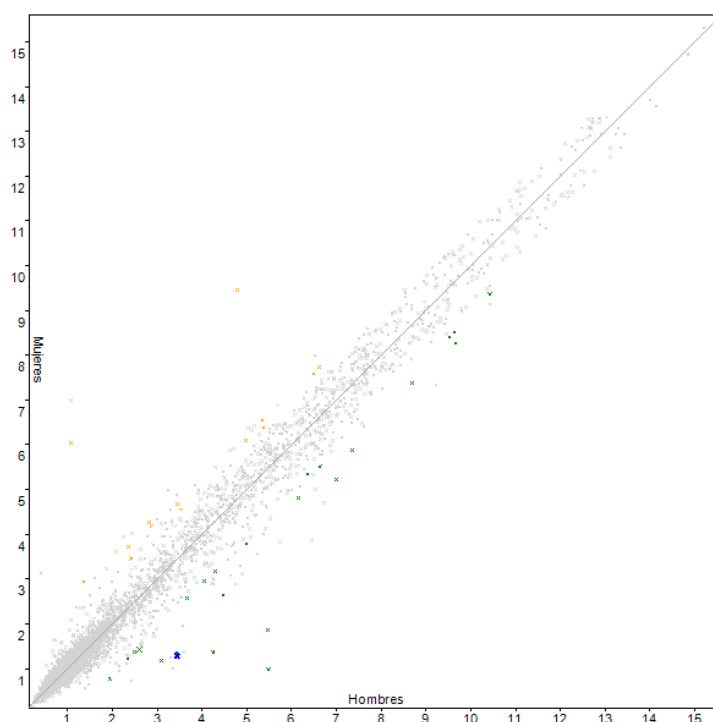
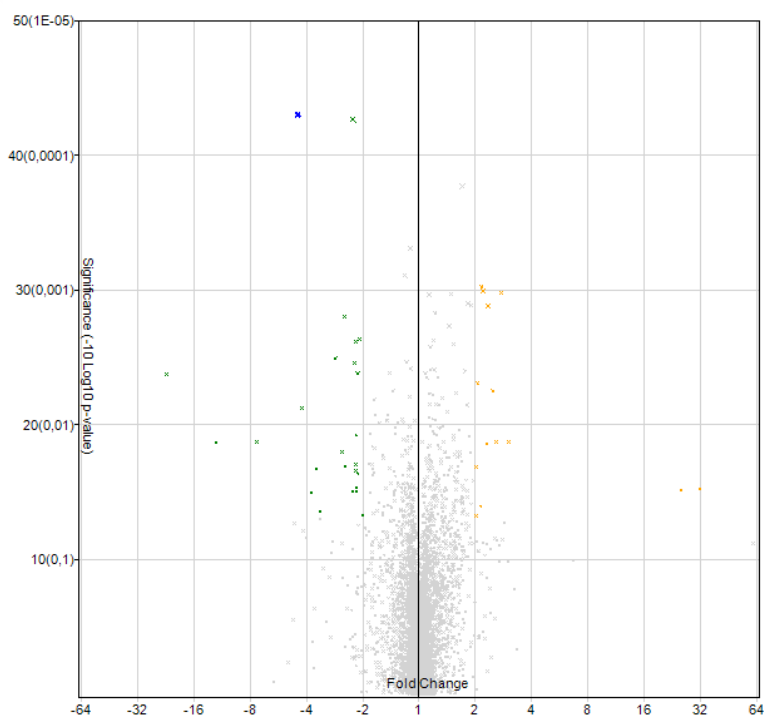


Figura 36. Análisis no supervisado del análisis de expresión diferencial entre mujeres, representadas por las columnas con el número 1, y hombres, representados por las columnas con el número 2, independientemente del tipo de muestra.



Gráfica 15. Scatter plot mujeres y hombres con independencia del tipo de muestra



Gráfica 16. Volcano Plot de mujeres y hombres con independencia del tipo de muestra.

4.3.4 Expresión diferencial por sexos en las muestras de los controles

En un segundo análisis estudiamos las muestras del grupo control comparando la expresión diferencial de hombres sanos y mujeres sanas, obteniendo un total de 21 genes desregulados, 8 estaban sobre expresados y 13 infra expresados (Tabla 12).

Transcript Cluster ID	ID Transcript	Fold Change	ANOVA p value (mujeres control vs hombres control)
20515599	hsa-miR-1193	2,19	0,000123
20506839	hsa-miR-1247-3p	-2,3	0,004746
20500436	hsa-miR-7-1-3p	-5,79	0,005767
20517686	hsa-miR-4306	-2,39	0,006957
20521820	hsa-miR-5583-5p	2,31	0,008176
20537565	hsa-mir-6821	2,05	0,009374
20519655	hsa-miR-4776-5p	-2,43	0,012509
20525461	hsa-miR-6750-5p	-3,37	0,013299
20519425	hsa-miR-4646-5p	-2,12	0,013588
20501183	hsa-miR-30e-3p	-4,03	0,014964
20506828	hsa-miR-1303	-3,57	0,017589
20502237	hsa-miR-20b-5p	-2,36	0,02321
20506775	hsa-miR-1228-3p	3,73	0,024893
20503107	hsa-miR-487a-5p	-3,34	0,02562
20525466	hsa-miR-6752-3p	2,14	0,026763
20538262	U85	2,08	0,027369
20518931	hsa-miR-4530	2,29	0,028002
20504582	hsa-miR-766-5p	-3,24	0,028608
20519566	hsa-miR-4726-5p	-4,04	0,038041
20525417	hsa-miR-6727-3p	2,09	0,045673
20500179	hsa-miR-98-5p	-3,23	0,049184

Tabla 12. Genes desregulados al comparar las muestras de mujeres con las muestras de los hombres en el grupo de los controles.

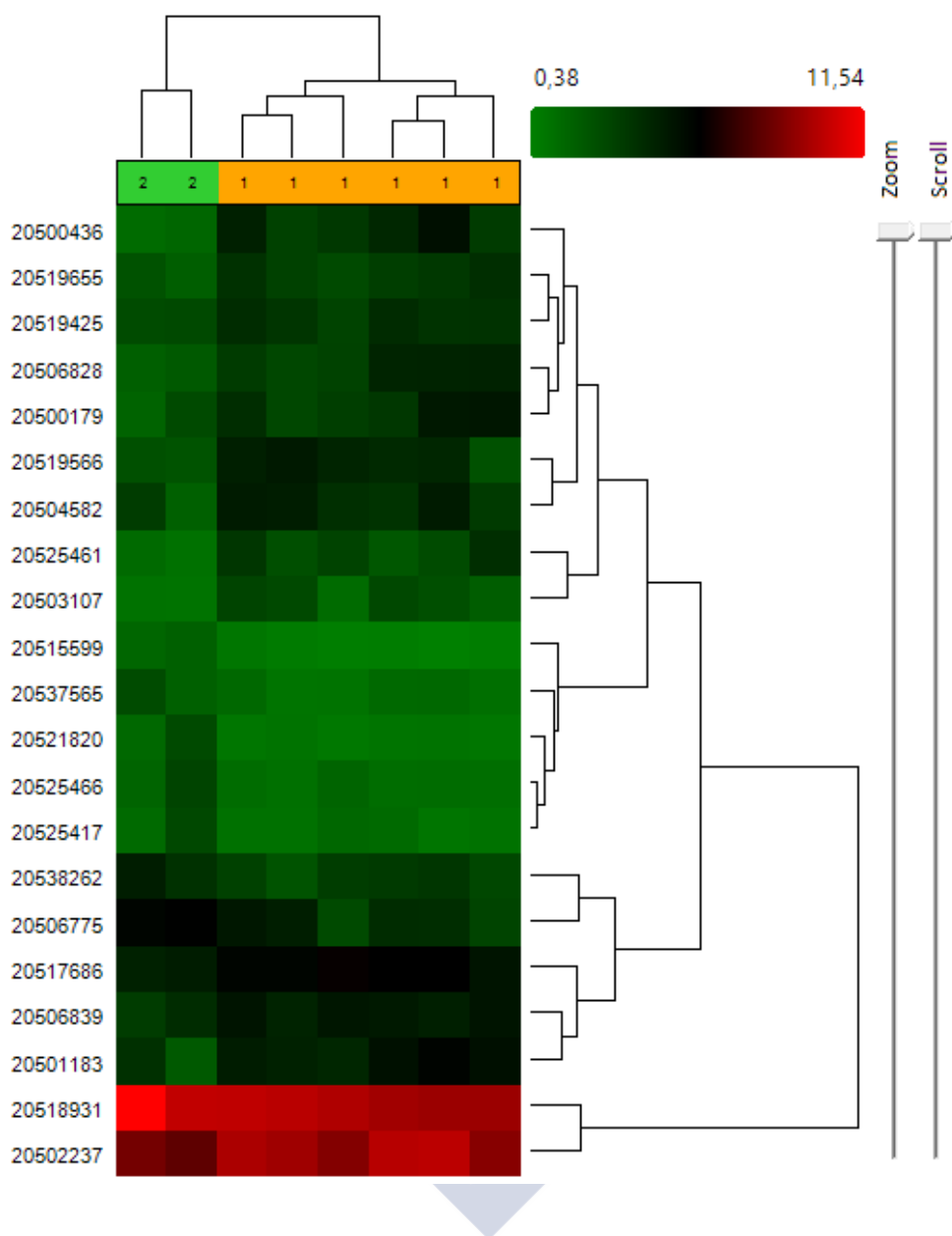
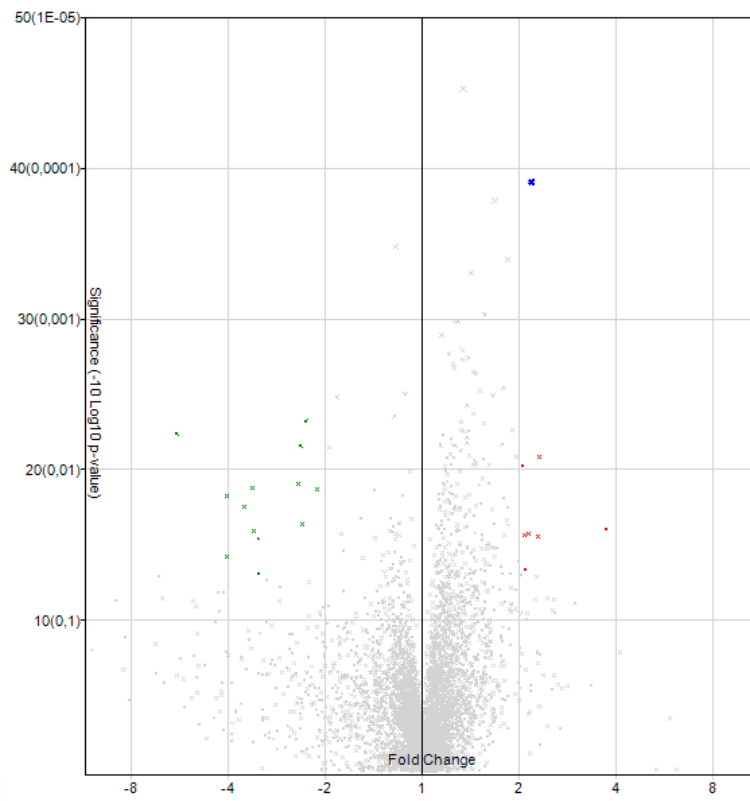
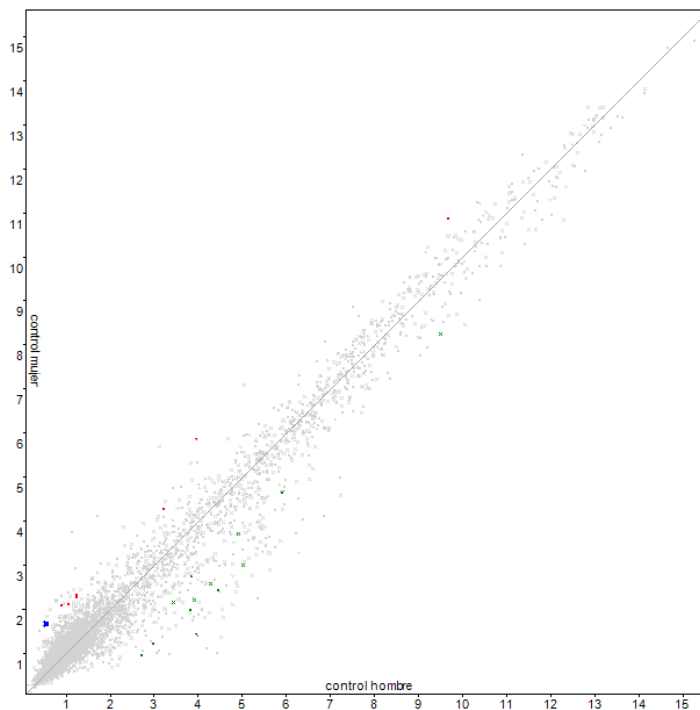


Figura 37. Análisis no supervisado, el grupo de las columnas con el número 2 corresponde a las mujeres del grupo de controles sanos, y aquellas con el número 1 corresponde con el grupo de los controles de los hombres sanos.



Gráfica 17. Volcano plot en el análisis de expresión diferencial entre el grupo de controles de mujeres y hombres sanos.



Gráfica 18. Scatter plot en el análisis de expresión diferencial entre el grupo de controles de mujeres y hombres sanos.

4.3.5 Expresión diferencial COCE en lengua y controles

La localización mayoritaria en las muestras del grupo de casos analizadas fue en la lengua. Para poder comprobar después con otros estudios de expresión diferencial del COCE en lengua hicimos un análisis entre dichas muestras (n=3) y el resto de los controles (n=8). El resultado fue un total de 50 genes desregulados, 26 infra expresados y 24 sobre expresados (Tabla 13).

Transcript Cluster ID	Transcript ID (Array Design)	Fold Change	ANOVA p-value (casos lengua vs controles)
20525453	hsa-miR-6746-5p	-13,55	0,000425
20500181	hsa-miR-99a-5p	-2,93	0,000506
20504362	hsa-miR-617	-12,87	0,000925
20529568	hsa-miR-7977	-2,74	0,001075
20532897	ENSG00000201853	2,15	0,001586
20525022	hsa-miR-6510-3p	-14,71	0,001817
20517735	hsa-miR-4274	2,33	0,003591
20504559	hsa-miR-1224-5p	-3,25	0,005956
20506003	hsa-miR-934	2,29	0,006324
20519438	hsa-miR-4654	2,29	0,006804
20525473	hsa-miR-6756-5p	-2,85	0,007209
20525633	hsa-miR-6780b-5p	2,48	0,008322
20504556	hsa-miR-550a-3-5p	-4,27	0,009567
20525697	hsa-miR-6868-5p	-3,58	0,010285
20537043	hsa-miR-4787	2,01	0,010305
20503896	hsa-miR-509-3p	-9,77	0,011943
20519524	hsa-miR-4706	2,94	0,01397
20525611	hsa-miR-6825-5p	3,32	0,014577
20525701	hsa-miR-6870-5p	2,31	0,014881
20521783	hsa-miR-5571-5p	2,55	0,015981
20529782	hsa-miR-8072	2,66	0,016273
20524036	hsa-miR-6126	2,6	0,016805
20518852	hsa-miR-4467	2,61	0,017015
20525556	hsa-miR-6797-3p	-2,08	0,019544
20518785	hsa-miR-4417	3,19	0,020747
20509224	hsa-miR-1908-5p	2,29	0,023167
20503809	hsa-miR-497-5p	-3,44	0,023367
20521813	hsa-miR-5580-3p	-25,68	0,023453
20500460	hsa-miR-204-5p	-2,73	0,023769
20505965	hsa-miR-509-3-5p	-6,07	0,025568
20532670	ACA41	-2,04	0,025614
20501206	hsa-miR-363-3p	-3,99	0,025827

20518880	hsa-miR-4486	2,05	0,026905
20518834	hsa-miR-4454	-2,31	0,026975
20500780	hsa-miR-149-5p	-3,48	0,027094
20503105	hsa-miR-486-5p	-2,2	0,028086
20517679	hsa-miR-4299	2,58	0,033596
20519681	hsa-miR-4788	2,1	0,035099
20504316	hsa-miR-548a-3p	2,05	0,037559
20523018	hsa-miR-6086	-2,99	0,037746
20538295	mgU6-53	-2,11	0,039467
20515603	hsa-miR-3175	2,56	0,040172
20518431	hsa-miR-3910	2,42	0,041457
20505745	hsa-miR-874-5p	-2,88	0,042814
20525563	hsa-miR-6801-5p	-9,87	0,044448
20532671	ACA41	-2,02	0,044568
20526180	hsa-miR-7111-5p	2,78	0,046212
20519702	hsa-miR-4800-3p	2,11	0,046676
20505608	hsa-miR-675-5p	2,47	0,047521
20500135	hsa-miR-19a-3p	-9,47	0,048786

Tabla 13. Genes desregulados en las muestras de COCE extraídas de la lengua en comparación con las muestras de controles sanos.



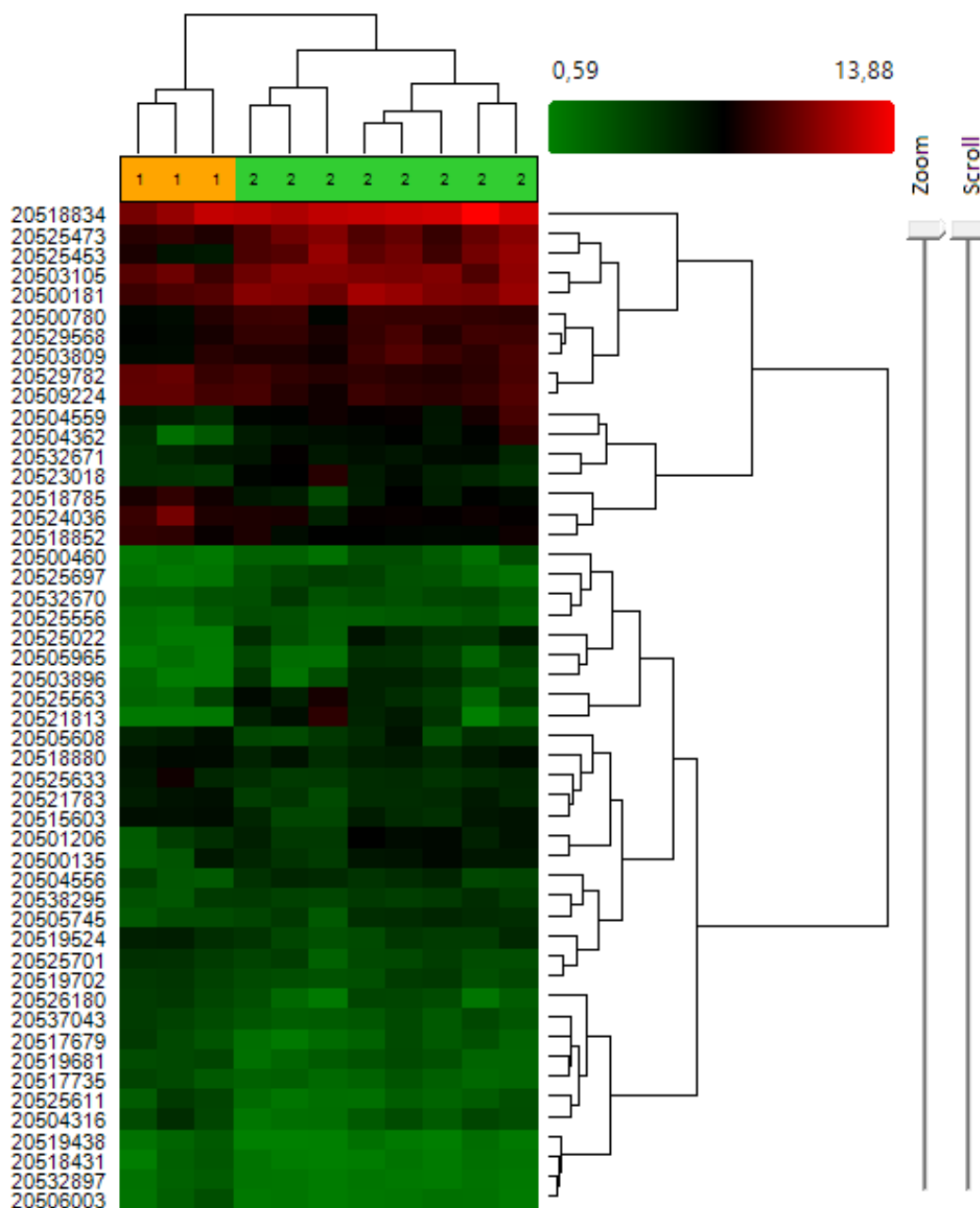
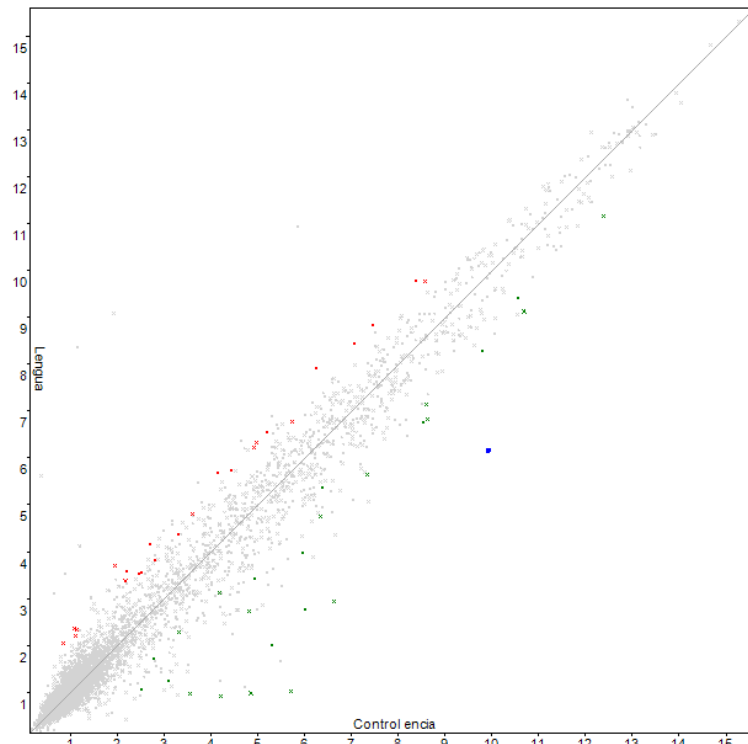
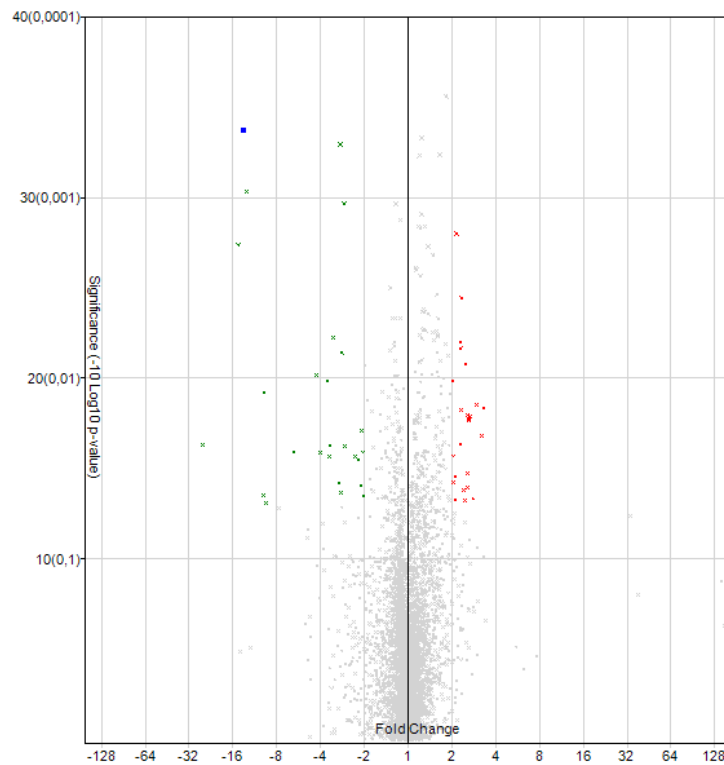


Figura 38. Análisis no supervisado. La columna con el número 1 indica las muestras de lengua y la columna con el número 2 las muestras controles.



Gráfica 19. Scatter plot de las muestras de COCE localizadas en la lengua y muestras control.



Gráfica 20. Volcano plot de las muestras de COCE localizadas en la lengua y las muestras control.

4.4 MicroARNs desregulados: dianas y mecanismos moleculares

De los 97 genes desregulados seleccionamos aquellos microARNs desregulados con un valor de significancia menor de 0,001, quedándonos con un total de 18 microARNs diferentemente expresados, para relacionarlos con los mecanismos moleculares en los que pueden estar implicados (Tabla 14).

Transcript ID Array Design	Fold Change	ANOVA p-value (casos vs controles)
hsa-miR-6746-5p	-11,62	8,73E-07
hsa-miR-617	-22,46	0,000002
hsa-miR-6510-3p	-14,32	0,000019
hsa-miR-6825-5p	4,17	0,000096
hsa-miR-99a-5p	-2,56	0,000125
hsa-miR-5196-5p	2,38	0,000176
hsa-miR-4417	4,45	0,000183
hsa-miR-1224-5p	-3,55	0,000192
hsa-miR-204-5p	-2,75	0,000259
hsa-miR-7111-5p	4,03	0,000311
hsa-miR-497-5p	-2,84	0,00033
hsa-miR-6870-5p	2,07	0,000333
hsa-miR-27b-3p	-2,14	0,00037
hsa-miR-664a-3p	-2,11	0,000386
hsa-miR-6765-5p	2,12	0,0004
hsa-miR-5580-3p	-23,23	0,000534
hsa-miR-7977	-2,08	0,000819
hsa-miR-8072	2,19	0,000997

Tabla 14. MicroARNs desregulados en las muestras de COCE con respecto a los controles con un valor p inferior a 0,001.

Los microARNs con una expresión disminuida en los casos comparados con los controles con un valor de significancia inferior a 0,001 fueron 11: el miR-6746-5p, miR-617, miR-6510-3p, miR-99a-5p, miR-1224-5p, miR-204-5p, miR-497-5p, miR-27b-3p, miR-664a-3p, miR-5580-3p, miR-7977.

Los microARNs con una expresión aumentada en los casos comparados con los controles con un valor de significancia inferior a 0,001 fueron 7: miR-6825-5p, miR-5196-5p, miR-4417, miR-7111-5p, miR-6870-5p, miR-6765-5p, miR-8072.

Al estudiar los microARNs cuya expresión tenía un valor p inferior a 0,001 observamos que solo 6 de ellos tenían dianas conocidas y todos ellos estaban infra expresados. Las dianas de estos microARNs pueden verse en la tabla 15.

MicroARN	Dianas
hsa-miR-99a-5p	FZD7, CAMK2D, FZD5, ROCK1, THBS1, PIK3CB, HSPB2, IGF1R, FZD8, RPS6, CASP3, CCND1, PTPN11, RAC1, CDKN1A, SMO, MTOR
hsa-miR-1224-5p	PPP1R12B, AKT1, MYC, FGFR1
hsa-miR-27b-3p	PPP1CA, CAMK2D, BRAF, HBEGF, MET, ITGB1, NRAS, THBS1, PIK3CB, CAV1, PPP1CC, MAPK14, PXN, ROCK2, FRS2, FZD3, MSN, ITGB5, TP53, VAV2, CBLB, FZD4, PPP1R12A, DROSHA, PIK3R3, CCND1, CTNNB1, HIF1A, PRKX, MAPK3, FN1, CDKN1A, PDPK1, VEGFA, MAPK1, MDM2, WNT9A, CD44
hsa-miR-204-5p	PDCD4, EZR, PIK3CB, IQGAP1, HSPG2, PLCG1, CCND1, FLNB, ITPR1, PLAUR, FZD1, ITPR2, MDM2, ITGB3
hsa-miR -497-5p	BRAF, ACTB, PDCD4, SOS2, SMAD2, PTCH1, WNT5A, PIK3R2, PPP1CC, ACTG1, ROCK2, FRS2, FZD6, IQGAP1, IGF1R, RPS6, HSPG2, AKT2, TFAP4, MMP2, CCND1, MYC, MMP9, IGF2, ITPR1, FGF2, CDC42, AKT3, PIK3CA, FN1, CDKN1A, MAP2K1, SDC4, SMO, HGF, MTOR, VEGFA, MAPK1, GRB2, CD63, MDM2, WNT9A, CD44.
hsa-miR-617	ACTB, TWIST2

Tabla 15. Dianas de microARN con valor p inferior a 0,001

Para buscar los mecanismos moleculares en los que pueden estar implicados estos microARNs utilizamos el software de Diana Tools, el miRPath v3.0, que calcula, en función de los microARNs implicados y el número de posibles genes a los que afecte, el valor p de los mecanismos moleculares comunes más probables.

El Diana Tools miRPath v3.0 reveló un total de 51 mecanismos moleculares donde estaban implicados al menos 3 de los 6 microARNs estudiados (Tabla 16). Entre ellos destacan 16 relacionados con el cáncer (31,37%): proteoglicanos en el cáncer, carcinogénesis viral, glioma, cáncer de pulmón, leucemia mieloide crónica, cáncer pancreático, cáncer colo rectal, cáncer de próstata, metabolismo del carbono en el cáncer, cáncer de vejiga, leucemia mieloide aguda, carcinoma de células renales, cáncer de endometrio, mecanismos en el cáncer, melanoma y cáncer tiroideo.

Mecanismos moleculares	Valor p
Proteoglycans in cancer	2,03E-15
Prion diseases	2,58E-12
Fatty acid biosynthesis	3,24E-07
Hippo signaling pathway	3,24E-07
Viral carcinogenesis	7,11E-07
Glioma	1,03E-06
Protein processing in endoplasmic reticulum	1,03E-06
Thyroid hormone signaling pathway	1,24E-05
TNF signaling pathway	1,77E-05
TGF-beta signaling pathway	3,57E-05
Non-small cell lung cancer	8,35E-05
Chronic myeloid leukemia	8,44E-05
Signaling pathways regulating pluripotency of stem cells	0,00016016

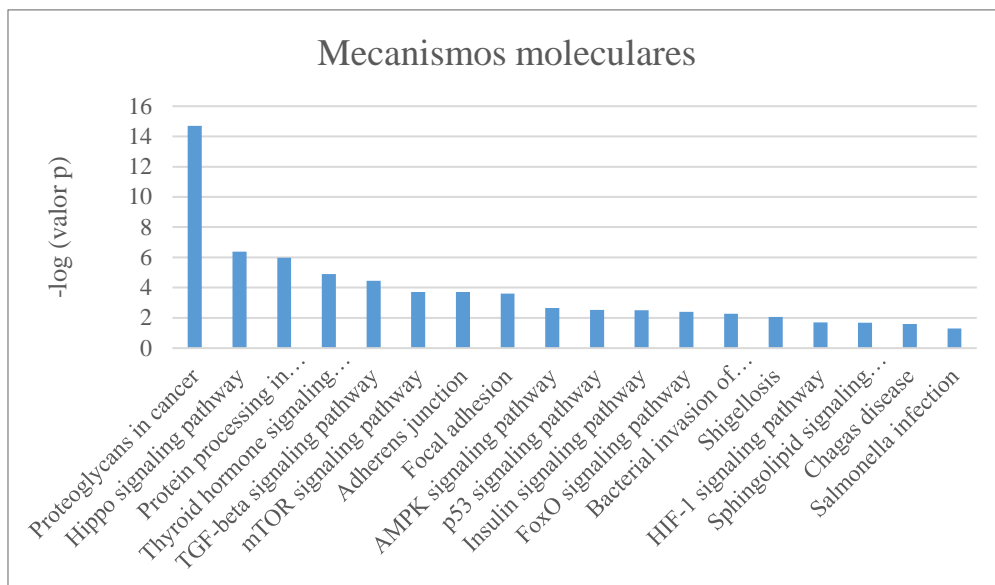
mTOR signaling pathway	0,00019149
Adherens junction	0,00019149
Focal adhesion	0,00024435
Pancreatic cancer	0,00034629
Neurotrophin signaling pathway	0,00047118
Colorectal cancer	0,00047118
Central carbon metabolism in cancer	0,00071494
Prostate cancer	0,00081506
Lysine degradation	0,00081543
Estrogen signaling pathway	0,00081543
Bladder cancer	0,00081543
Cell cycle	0,00098958
Hepatitis B	0,00101924
AMPK signaling pathway	0,00219882
p53 signaling pathway	0,00299835
Insulin signaling pathway	0,00313483
Acute myeloid leukemia	0,00330299
Renal cell carcinoma	0,00383771
FoxO signaling pathway	0,00401634
Other types of O-glycan biosynthesis	0,00415899
Endometrial cancer	0,00489696
Pathways in cancer	0,0054266
Melanoma	0,0054266
Bacterial invasion of epithelial cells	0,0054266
Oocyte meiosis	0,00677645
Shigellosis	0,00880962
Ubiquitin mediated proteolysis	0,00917906
Prolactin signaling pathway	0,00949088
HIF-1 signaling pathway	0,01990143
ECM-receptor interaction	0,02020899
Sphingolipid signaling pathway	0,02058487
Progesterone-mediated oocyte maturation	0,02353258
Chagas disease (American trypanosomiasis)	0,0254043
Thyroid cancer	0,02562068
NOD-like receptor signaling pathway	0,04405569
Steroid biosynthesis	0,04559925
Glycosaminoglycan biosynthesis - keratan sulfate	0,04559925
Salmonella infection	0,04980363

Tabla 16. Resultado del miRPath v3.0 sobre los seis microARNs (miR-99a-5p, miR-1224-5p, miR, 27b-3p, miR 204-5p, miR-497-5p, miR-617) y sus posibles mecanismos moleculares.

Los mecanismos en los que estaban implicados los seis microARNs fueron 18 (Tabla 17) y si observamos la gráfica 21 donde están los mecanismos moleculares ordenados de mayor valor de significancia a menor, podemos observar que los proteoglicanos en el cáncer es el mecanismo más probable con diferencia. También podemos ver la implicación de dichos microARNs en otros mecanismos moleculares cuya función se ha visto afectada en procesos cancerosos como pueden ser el mecanismo de señalización del TGF beta, mTOR o p53.

Mecanismo molecular	valor p
Proteoglycans in cancer	2,03E-15
Hippo signaling pathway	4,24E-07
Protein processing in endoplasmic reticulum	1,03E-06
Thyroid hormone signaling pathway	1,24E-05
TGF-beta signaling pathway	3,57E-05
mTOR signaling pathway	0,000191493
Adherens junction	0,000191493
Focal adhesion	0,000244352
AMPK signaling pathway	0,002198823
p53 signaling pathway	0,002998352
Insulin signaling pathway	0,003134828
FoxO signaling pathway	0,004016341
Bacterial invasion of epithelial cells	0,005426597
Shigellosis	0,008809618
HIF-1 signaling pathway	0,01990143
Sphingolipid signaling pathway	0,020584868
Chagas disease	0,025404305
Salmonella infection	0,049803629

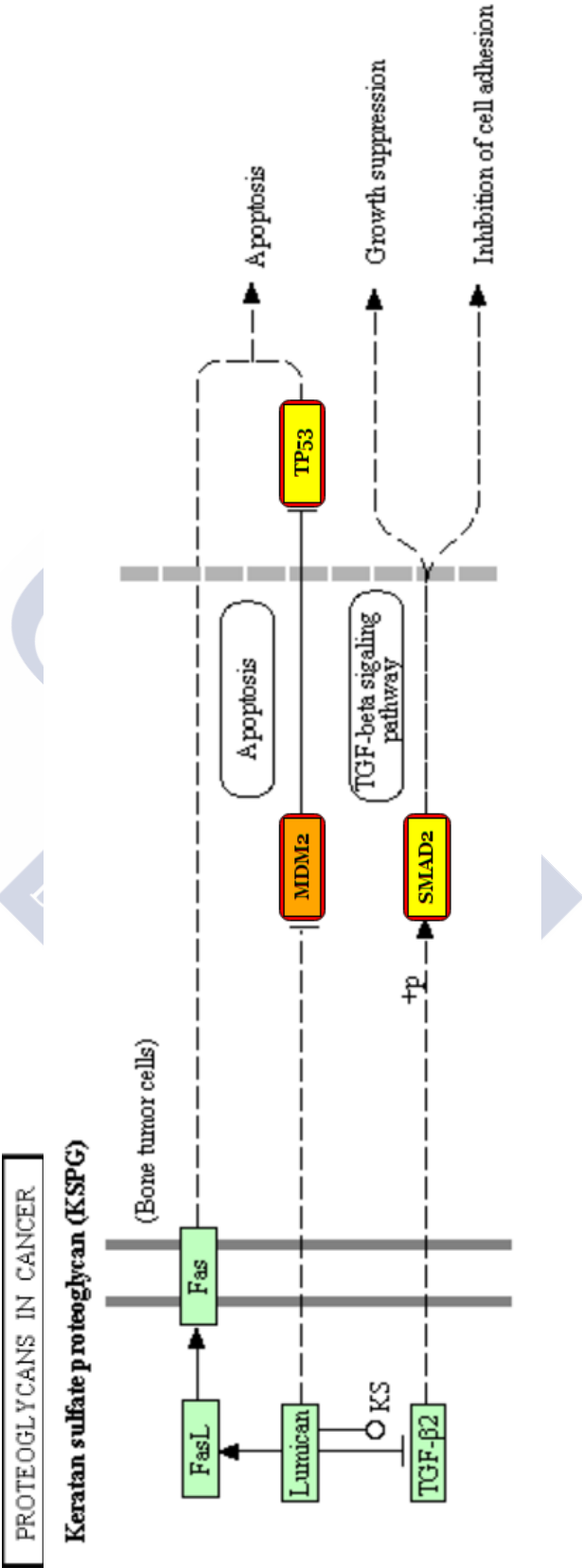
Tabla 17. Mecanismos moleculares en los que están implicados los seis microARNs y el valor p de menor a mayor.

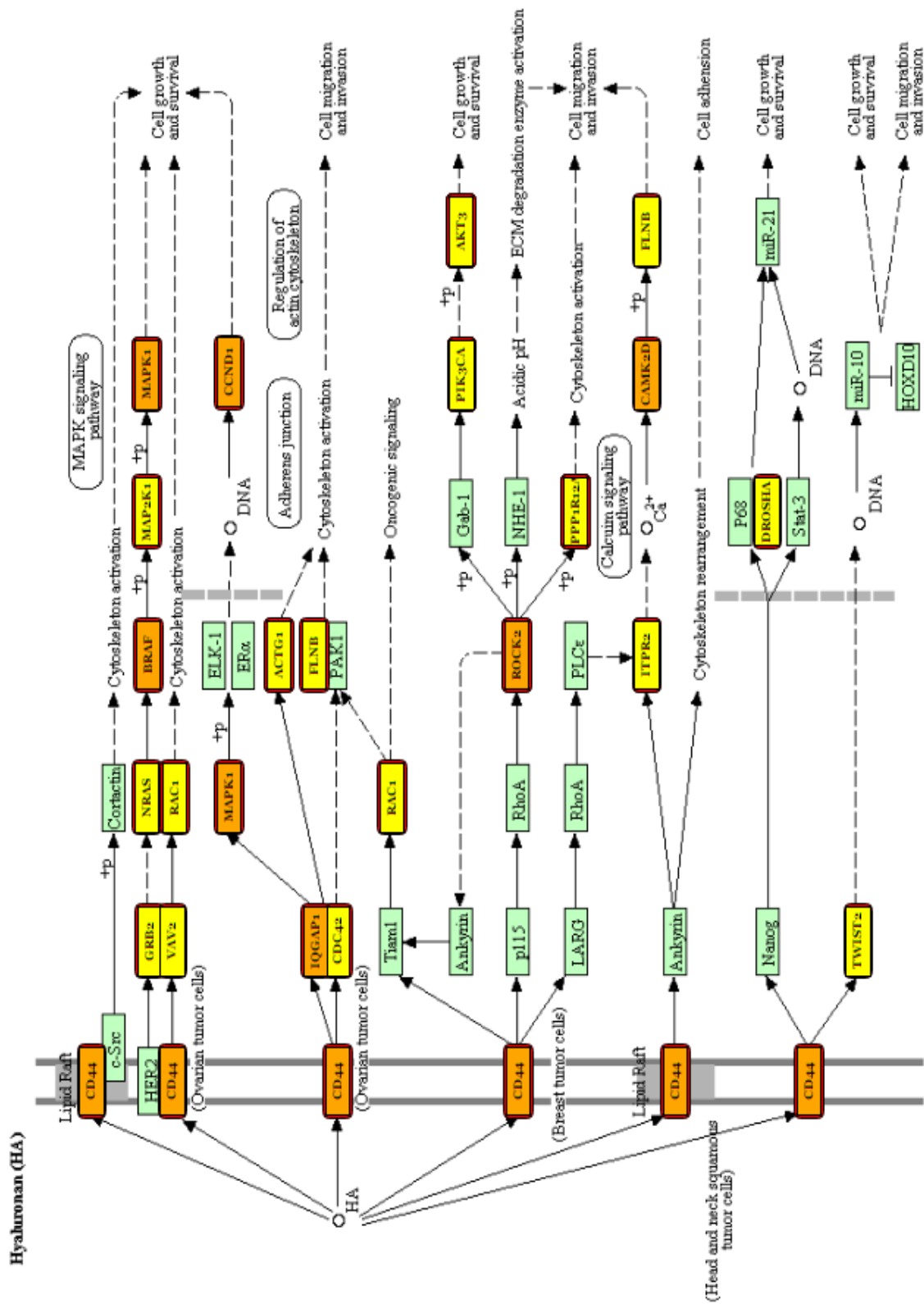


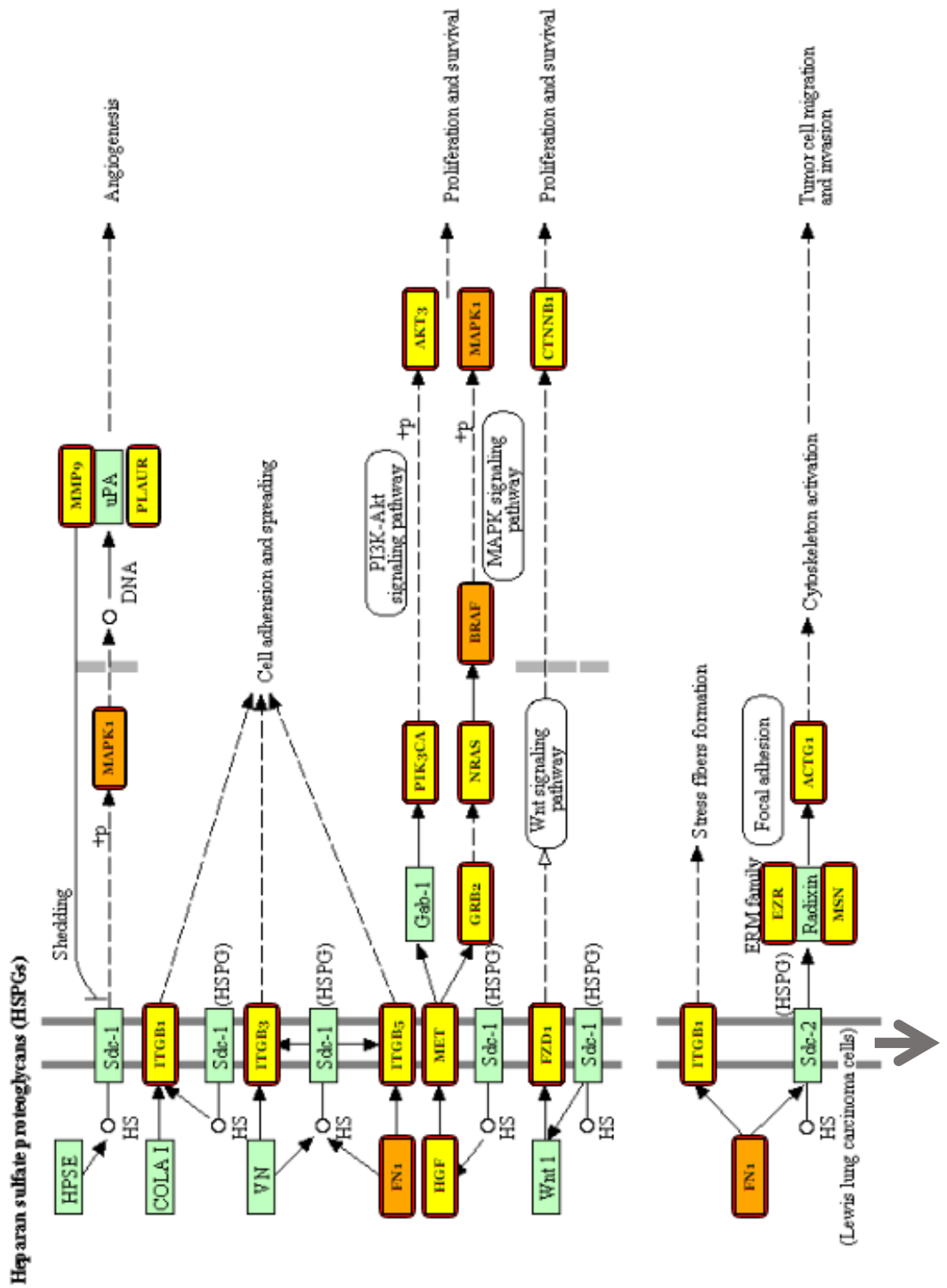
Gráfica 21. Normalizando el valor p se puede apreciar qué mecanismo tiene mayor nivel de significancia.

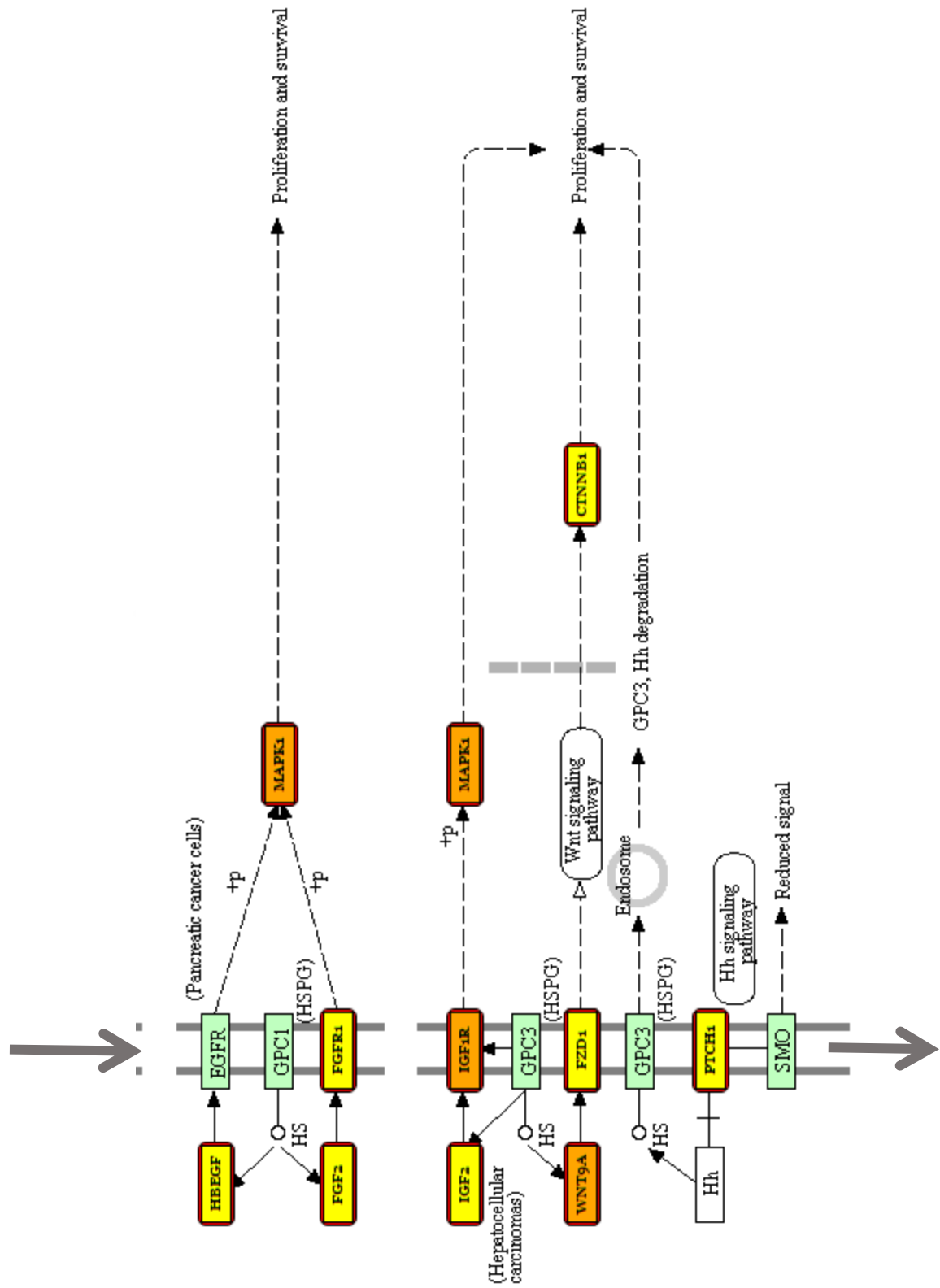
Además del número de genes implicados y el valor p el programa facilita un esquema donde se observan dichos mecanismos moleculares en los que están implicadas las dianas de nuestros microARNs coloreando en amarillo que afectadas por un sólo microARN desregulado y de color naranja aquellas dianas afectadas por más de uno.

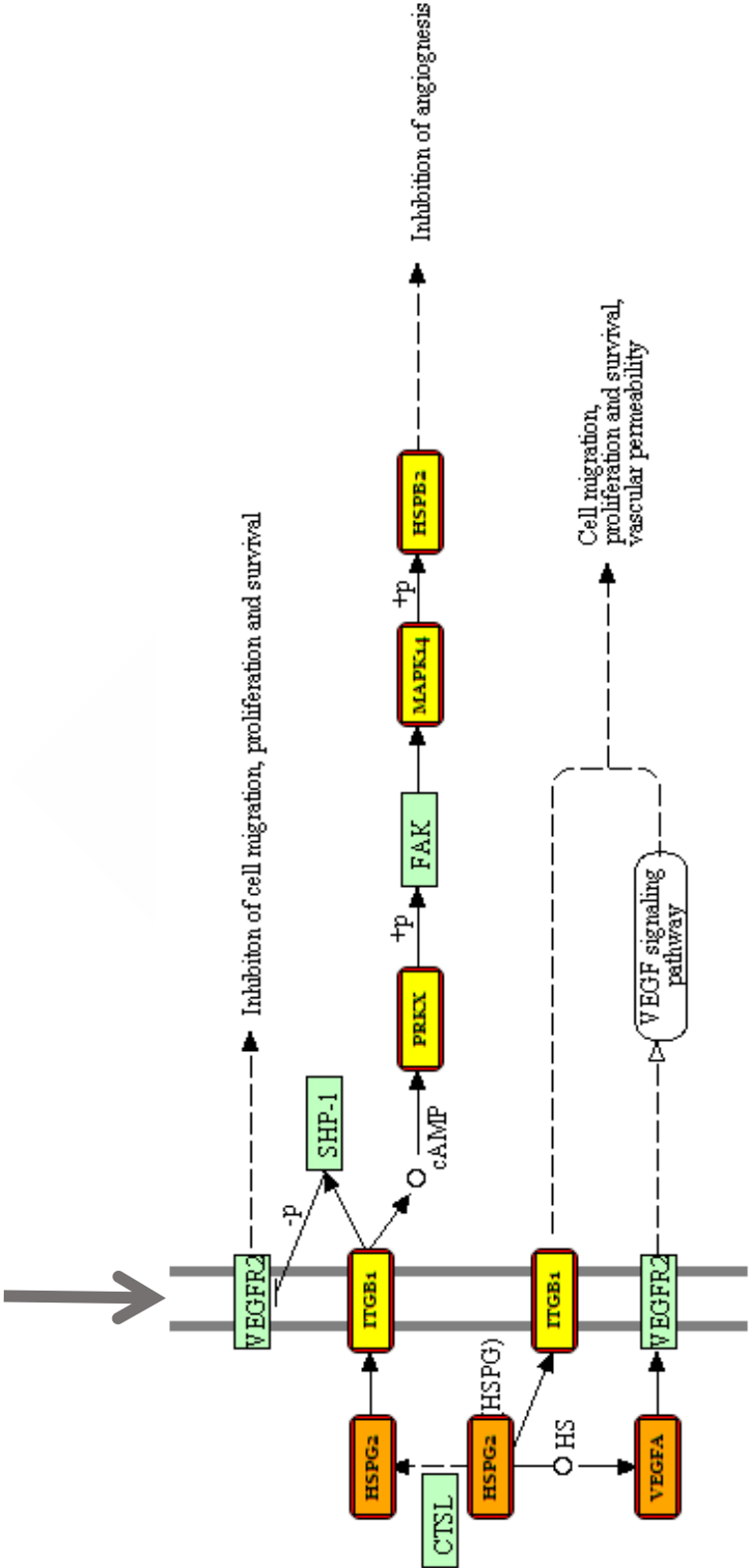
Los posibles genes dianas de los microARNs anteriormente nombrados están implicados en el mecanismo molecular de proteoglicanos en el cáncer, siendo total de 88 genes, y sus funciones pueden apreciarse en la figura 39.











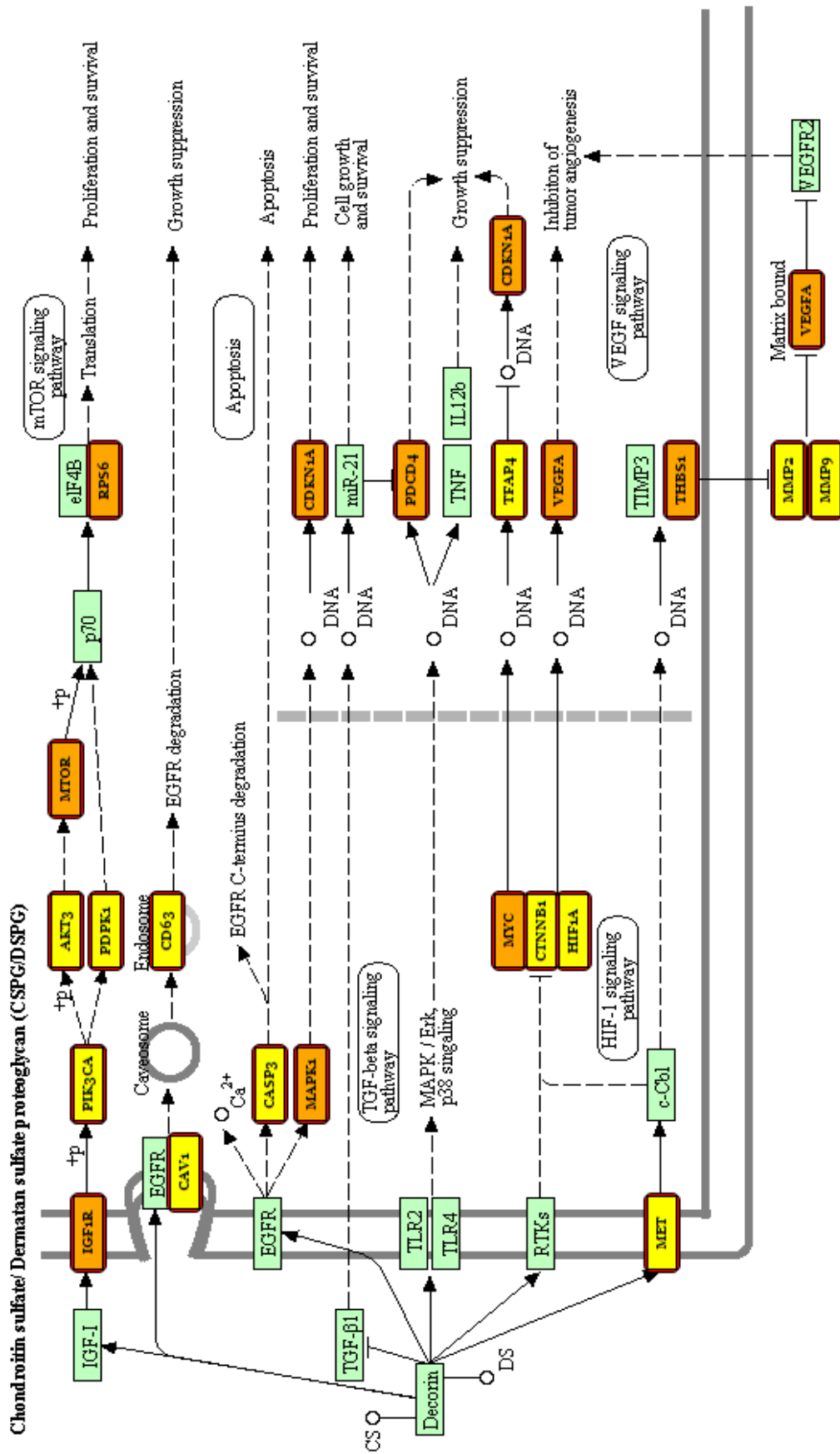


Figura 39. Imágenes obtenidas en el análisis KEGG del mirPath v.3 sobre los mecanismos moleculares de proteoglicanos en el cáncer.

En el mecanismo de señalización TGF beta (Figura 40) se puede observar un total de 33 genes dianas que pueden estar afectados por nuestros microARNs, entre los que destaca el MYC, posible diana de los microARNs hsa-mir-497-5p y hsa-miR-1224-5p, estudiado como biomarcador de diferentes tumores entre ellos el COCE (137).

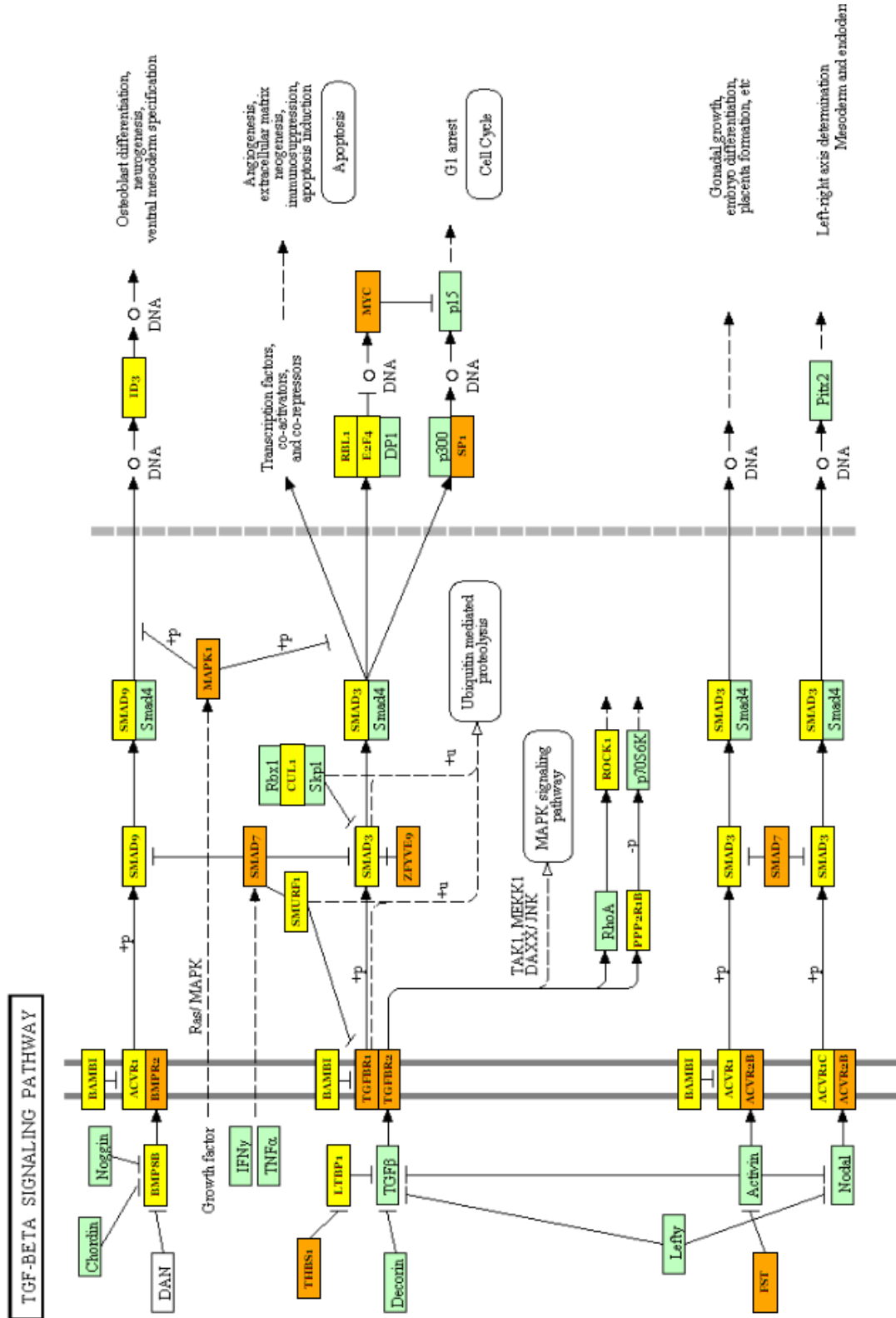


Figura 40. Mecanismo de señalización del TGF beta. Obtenida en el análisis KEGG del mirPath v.3.

Para el mecanismo de señalización de mTOR el miRPath v.3 reveló un total de 31 posibles genes diana y su papel en dicho mecanismo puede apreciarse en la figura 41.

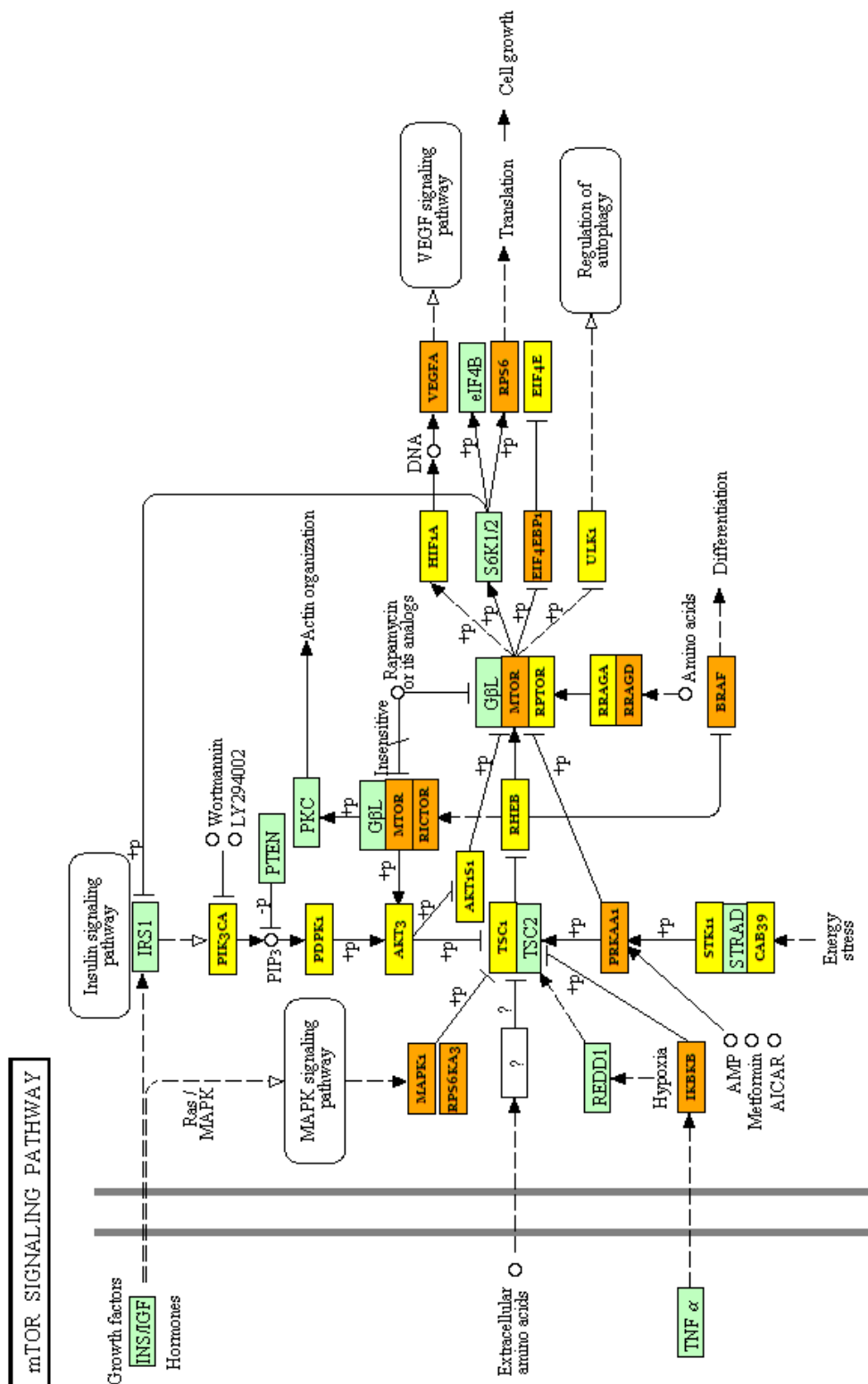


Figura 41. Mecanismo molecular de señalización de mTOR. Obtenida en el análisis KEGG del miRPath v.3.

Para el mecanismo de señalización de p53 el miRPath v.3 reveló un total de 31 posibles genes diana donde destaca el TP53 propuesto en el COCE como biomarcador (138). Las funciones en dicho mecanismo de cada gen pueden apreciarse en la figura 42.

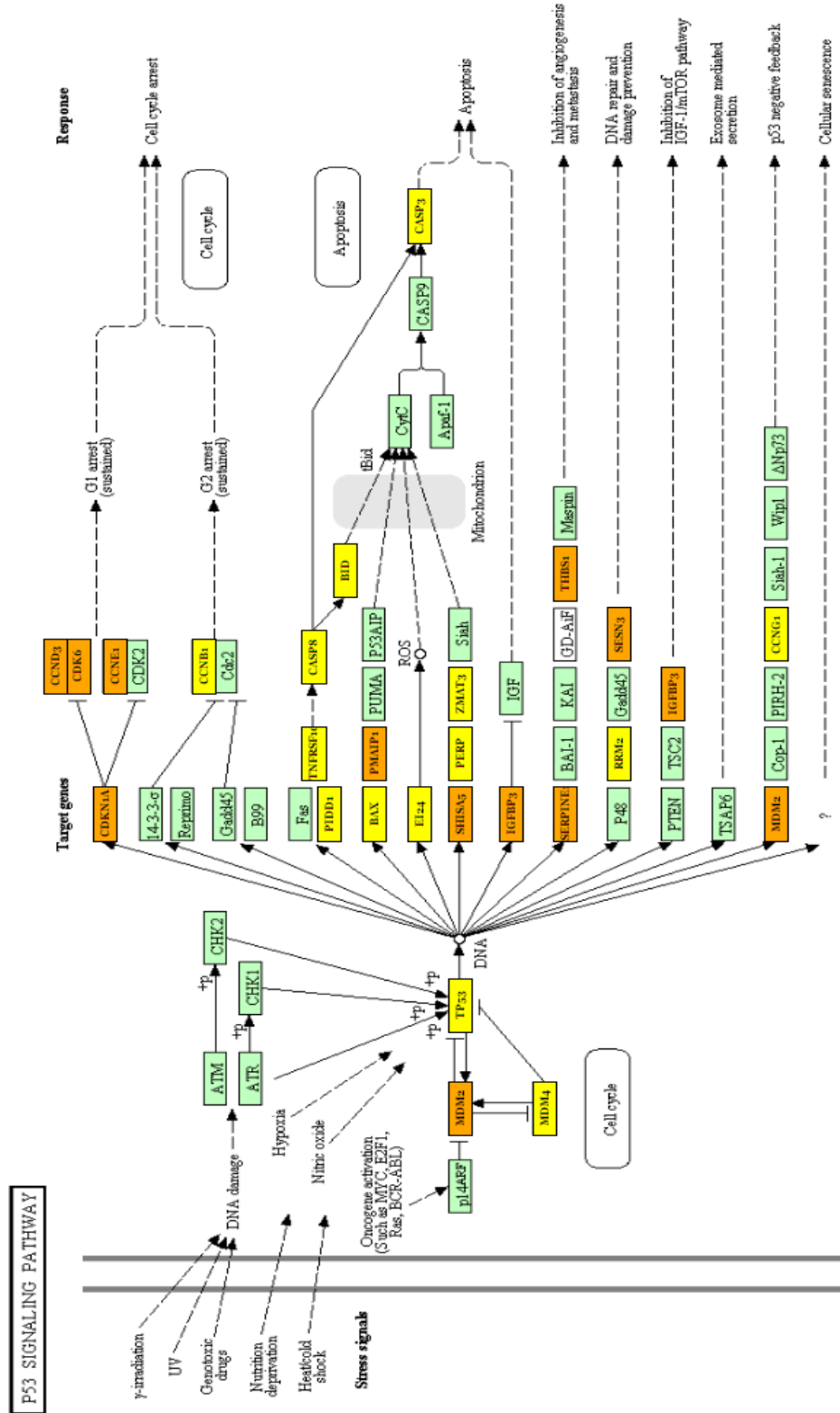


Figura 42. Mecanismo de señalización del p53. Obtenida en el análisis KEGG del MirPath v.3.

5.Discusión





5.1 Estudios de expresión diferencial de microARNs

En nuestro estudio hemos analizado 16 muestras, 8 casos de COCE y 8 muestras de encía queratinizada sana, para establecer un perfil de expresión diferencial usando microarrays. El resultado fueron un total de 81 microARNs de los cuales 45 presentaban una expresión menor y 36 una expresión mayor en los casos en comparación con los controles.

El perfil de expresión obtenido en nuestro estudio no coincide con los resultados de otros estudios de expresión diferencial de microARNs en el COCE (8, 13, 28, 121, 126, 139) como un patrón común sino, más bien, existen algunas coincidencias con algunos microARNs.

El trabajo que más se parece al nuestro es el de Soga et al. donde se analizan 29 muestras de COCE y 7 controles con microarrays (768 sondas), con un total de 177 miARNs desregulados. Nosotros destacamos aquellos microARNs que tenían un valor de p inferior a 0,001, ellos publicaron aquellos que tenían un *fold change* superior a 4 (miR-31* y miR-31, miR-135b, miR-193a-5p, miR-103, miR-224, miR-93, miR-200c, miR-183, miR-203, miR-21 y miR-223) e inferior a -4 (miR-133a, miR-376c, miR-411, miR-30a-3p, miR-489, miR-139-5p, miR-483-5p, miR-30e-3p, miR-409-3p, miR-let-7c, miR-486-5p). El miR-139-5p también aparece infra expresado en nuestro estudio, así como el miR-486-5p (121).

Yang et al. estudiaron la expresión diferencial de microARNs, con una tecnología de microarrays con capacidad para identificar 754 microARNs, usando tejido congelado de 7 leucoplasias no progresivas y 8 progresivas. Posteriormente, corroboraron sus resultados con qRT-PCR usando muestras de saliva. Obtuvieron un total de 25 microARNs diferentemente expresados, 12 sobre expresados y 13 infra expresados. De este perfil de expresión diferencial sólo un microARN coincide con nuestro estudio, el miR-99a-5p que aparece infra expresado en aquellas leucoplasias progresivas en comparación con las no progresivas. El miR-19a-3p aparece como infra expresado en los casos de nuestro estudio mientras que en el estudio de Yang et al. aparece como sobre expresado en leucoplasias progresivas (25).

Manikandan et al. analizaron con microarrays 29 muestras de tumores primarios de COCE y 9 muestras controles, usando el miRCURY LNATM microRNA Array que cuenta con 1168 sondas, obteniendo 46 microARNs desregulados de los cuales corroboraron 10 con qRT-PCR. Ninguno de los microARNs desregulados en este estudio coinciden con los nuestros (13).

Park et al. midieron la expresión con qRT-PCR de 314 microARNs en saliva de 50 pacientes con COCE y 50 pacientes sanos. Los resultados revelaron dos miARNs, el miR-125a y el miR-200a, infra expresados significativamente en la saliva de pacientes con COCE. En nuestro estudio ninguno de los dos microARNs aparecen desregulados (140).

Otro estudio de microARNs en saliva es el de Momen-Heravi et al. cuya tecnología usada es el NanoString nCounter miRNA capaz de detectar 700 sondas de microARNs. El total de muestras analizadas fue de 34 pacientes, 9 con COCE antes del tratamiento, 8 con COCE en remisión, 8 con liquen plano oral y 9 pacientes sanos. En total 13 microARNs fueron determinados como desregulados en saliva de pacientes con COCE en comparación con los pacientes sanos, 11 infra expresados (miR-136, miR-147, meR-1250, miR-148a, miR-632, miR-668, miR-877, miR-503, miR-220a, miR-323-5p) y 2 sobre expresados (miR-24, miR27b) (124). Aunque la muestra era escasa establecieron el miR-27b como un biomarcador efectivo para distinguir pacientes con COCE comparados con aquellos sanos, con liquen plano o

pacientes en remisión, con una sensibilidad del 85.7% y una especificidad del 100% (124). Como se observa no coincide con los hallazgos de Park et al. y tampoco con los nuestros.

Ries et al. buscaron microARNs desregulados en muestras de sangre de pacientes con COCE. Utilizaron microarrays que identificaba 1205 sondas de microARNs. El tamaño de la muestra fue de 57 pacientes con COCE y de 33 pacientes sanos. Los resultados revelaron un total de 30 microARNs desregulados destacando tres de ellos, dos microARNs sobre expresados, el miR-3651 (*fold change* = 2,5) y el miR-494 (*fold change* = 4,7), y uno infra expresado, el miR-186 (*fold change* = 2) (139). Ninguno de estos microARNs aparece como desregulado en nuestro trabajo.

Otros trabajos utilizan una muestra más variada a la hora de analizar la expresión diferencial como es el grupo de Zahran et al. que, mediante qRT-PCR, estudian tres microARNs en muestras salivales, el miR-184, el miR-21 y el miR-145, en 20 personas sanas, 40 pacientes con lesiones pre malignas (20 con displasia y 20 sin ella) de al menos tres años de seguimiento, 20 pacientes con COCE y otros 20 pacientes con estomatitis aftosa recurrente. Quizá por la heterogeneidad de la muestra y el número limitado de los microARNs medidos, la conclusión del estudio es que el miR-184 puede ser un marcador para identificar en saliva pacientes con COCE pero que es necesario una muestra mayor para corroborarlo (120). Ninguno de los microARNs medidos en este estudio aparece desregulado en nuestras muestras de COCE.

Yu et al. publicaron una revisión sobre estudios de expresión diferencial de carcinomas escamosos en lengua. La revisión recopila cinco artículos, dos con tejido congelado y tres con líneas celulares, que midieron la expresión con microarrays. Los resultados son muy dispares, y en algunos casos contradictorios (131). En la siguiente tabla publicada en dicho trabajo (Tabla 18) puede observarse las diferencias en los resultados sobre la expresión:



Estudio	Método	Muestra	Sobre expresados	Infra expresados
Wong et al. (2008) (141)	Microarray	Carcinoma de células escamosas de lengua		miR-133a, miR-133b
Li et al. (2009) (9)	Microarray	Carcinoma de células escamosas de lengua	Let-7a, miR-16, miR-203, miR-21, miR-27a, miR-27b, miR-31, miR-17-5p, miR-195, miR-23a	miR-103, miR-189, miR-61, miR-148a, miR-184, miR-26b, miR-320, miR-451, miR-494, miR-513, miR-519b, miR-525, miR-202, miR-342
Li et al. (2009) (142)	Microarray	Líneas celulares (UM1, UM2)	miR-18b, miR-19a, miR-20b, miR-31, miR-106 ^a miR-148b, miR-197, miR-203, miR-205, miR-342, miR-370, miR-532, miR-560, miR-564, miR-564-pre, miR-566, miR-574, miR-595, miR-619-pre, miR-638, miR-638-pre, miR-662-pre,	miR-7, miR-30a-5p, miR-30e-3p, miR-34b, miR-34c, miR-96, miR-99a, miR-99b, miR-100, miR-125a, miR-125b, miR-130a, miR-130b, miR-138, miR-155, miR-181c, miR-181d, miR-221, miR-222, miR-224, miR-503, miR-565, miR-594
Yu et al. (2010) (143)	Microarray	Líneas celulares Tca8 /113	let-7c, let-7d, let-7e, let-7g, miR-20b; miR-23a, miR-30d, miR-181d, miR-188, miR-214, miR-373, miR-432, miR-498, miR-518c, miR-584, miR-608, miR-628,	miR-21, miR-342
Sun t al. (2012) (8)	Microarray	Líneas celulares CAL27-resCAL27	let-7d, miR-122, miR-193a-5p, miR-30c-1, miR-342-3p, miR-342-p5, miR-452, miR-483-3p, miR-518b, miR-628-3p, miR-663, miR-675, miR-877	let-7b, let-7e, let-7f, let-7i, miR-15b, miR-200b, miR-20a, miR-21, miR-27b, miR-886-3p, miR-93, miR-98

Tabla 18. Extraída del estudio de Yu et al. (131) donde pueden observarse los resultados de los estudios de expresión diferencial recopilados con los microARNs desregulados y el tipo de muestra utilizada.

Si nos fijamos en las investigaciones de Li et al. (2009) (9) con respecto al de Yu et al. (143), el miR-21 aparece como sobre expresado en el primer caso e infra expresado en el segundo. De los dos artículos que utilizaron tejido congelado ninguno de los microARNs desregulados coincide con los nuestros (9, 143).

Un trabajo posterior a esta revisión de microarrays con 15 muestras tumorales de carcinoma de lengua y 3 controles, reveló una expresión diferencial de 3 microARNs sobre expresados (miR-424, miR-542-3p, miR-454) y 3 infra expresados (miR-494, miR-490-5p, miR-486-5p). En este caso nuestros datos coinciden en un microARN, el miR-486-5p, cuya expresión también

era menor en las muestras con carcinoma de lengua comparadas con los controles sanos con un *fold change* = -2,2 (144).

En este estudio analizan 19 citologías de pacientes con cáncer de lengua y 20 de sujetos normales utilizando qRT-PCR, e identificando el miR-21 (sobre expresado) y miR-375 (infra expresado) como biomarcadores del cáncer de lengua, con una sensibilidad del 100% y especificidad del 64%. En nuestro caso si comparamos los casos de lengua con los controles de encía ninguno de los dos microARNs se encuentra desregulado (145).

Duz et al. miden la expresión de microARNs en 3 casos de carcinoma de lengua y 4 controles sanos con microarrays, obteniendo un total de 419 microARNs desregulados, de los cuales corroboran con qRT-PCR el miR-139-5p revelando una expresión significativamente disminuida en los carcinomas de lengua. Si nos fijamos en nuestros resultados al comparar las muestras de carcinoma de lengua con los controles sanos, este microARN no aparece desregulado, pero sí en la comparación de los casos con COCE y controles sanos, cuya expresión también disminuye (*fold change* = -2,35) (146).

El grupo de Liu et al. publicó un estudio en el 2010 donde analizaban la expresión del miR-31 en la saliva de 45 pacientes con carcinoma oral, 10 con leucoplasia verrucosa y 24 individuos sanos con qRT-PCR. Los resultados revelaron una expresión mucho mayor del miR-31 en los casos con COCE, proponiéndolo como biomarcador de esta patología (107). La expresión del miR-31 no presentaba variación en nuestro estudio, ni por localización, ni por estadíos, ni en la comparación general de casos y controles.

Los trabajos acerca de microARNs concretos en el COCE analizados de manera aislada para corroborar sus funciones y efectos en líneas celulares como son el miR-9, miR-127 o el miR-145 tampoco han sido hallados como desregulados en nuestro estudio (73, 147, 148).

Los resultados de expresión diferencial en cáncer de cabeza y cuello también son dispares. En esta revisión recopilan los estudios sobre expresión diferencial de microARNs analizando aquellos que se vieron desregulados en al menos dos estudios independientes. Los microARNs sobre expresados fueron: let-7i, miR-7, miR-16, miR-18a, miR-106b-25 *cluster*, miR-130b, miR-142-3p, miR-146a, miR-155, miR-184, y los infra expresados fueron: miR-100, miR-125a, miR-125b, miR-133a, miR-200a, miR-221 y miR-375 (15). En nuestro estudio ninguno de estos microARNs estaba desregulado.

En el estudio de Nagadia et al. sobre la expresión diferencial en cáncer de cabeza y cuello dan solución a la disparidad en los resultados clasificando la expresión determinada de los microARNs en función del fenotipo que presenta, si se trata de un epitelio normal, displasia, carcinoma in situ, carcinoma de células escamosas y metástasis (72) (Figura 43). Ninguno de los microARNs que se ve en la figura coincide con los nuestros.

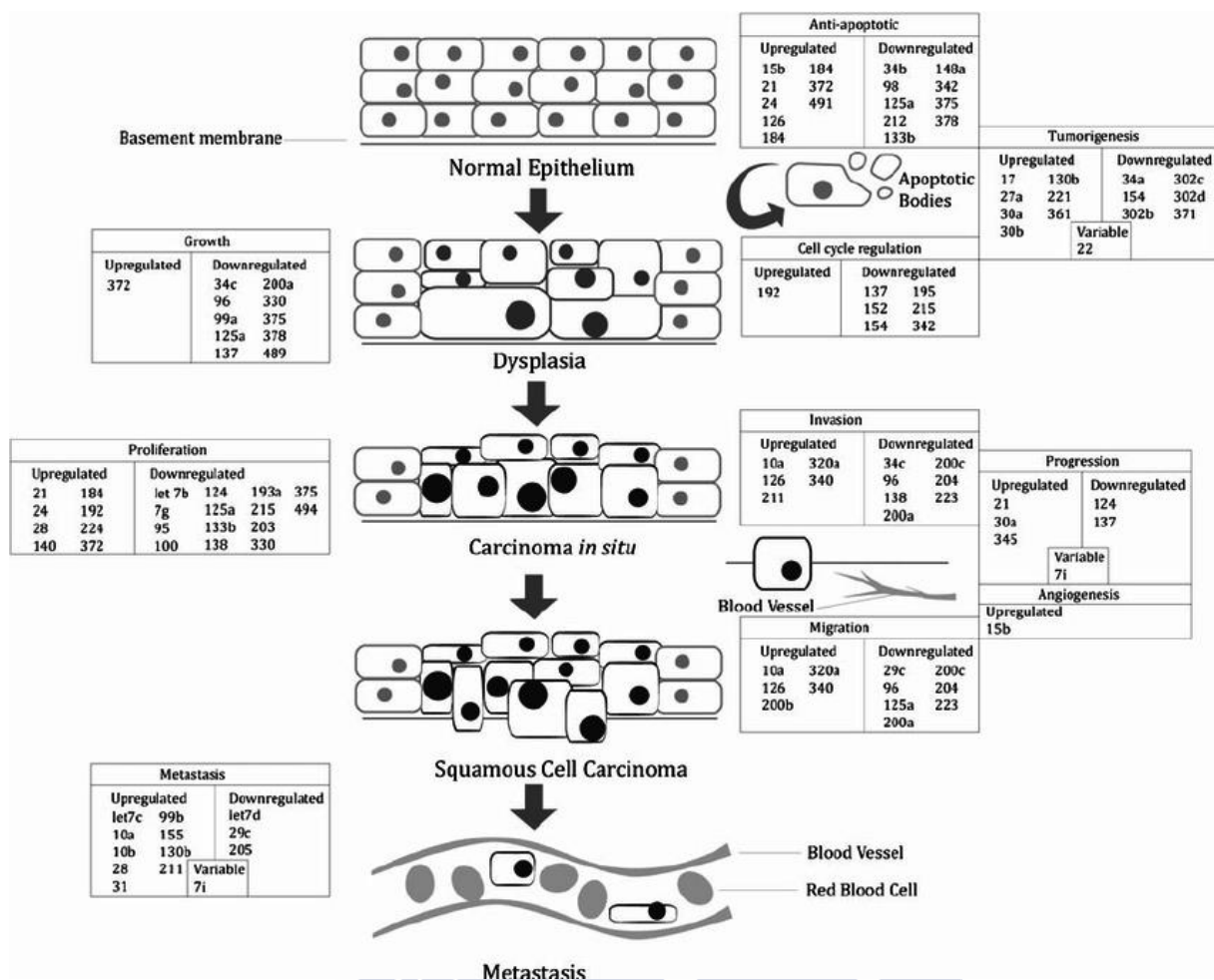


Figura 43. Nagadia et al. resume en esta imagen la expresión diferencial de microARNs en función de si el tejido se encuentra normal, con displasia, si es carcinoma *in situ*, carcinoma de células escamosas o metástasis.

Las diferencias en los resultados de los estudios de expresión diferencial con muestras exclusivamente de COCE, a parte de las que ya conocemos por el tipo de población utilizada, se cree que son debidas a los especímenes usados y su manejo (protocolo de las muestras tras la cirugía, muestras en parafina, condiciones de cultivo de las líneas celulares), al protocolo de extracción del ARN total (tipo de método escogido y marca) o la tecnología de escaneado (voltaje, poder del láser, etc.) (149).

Otra de las razones que podría explicar la disparidad de datos es el número de sondas que contiene cada plataforma de microarrays y el año en el que fueron llevados a cabo las investigaciones ya que el número de microARNs nuevos aumenta periódicamente. El número de sondas de los estudios de microarrays antes citados abarcaban desde unos 700 a unos 1600 microARNs y nuestra placa puede llegar a identificar 2570 sondas de microARNs humanos maduros. Aunque hemos obtenido un perfil de expresión con significancia alta muchos de los microARNs diferentemente expresados están aún por estudiar. De los 81 miARNs desregulados sólo 39 tienen dianas conocidas.

Las líneas celulares son utilizadas para estudiar el comportamiento de determinados microARNs sobre motilidad celular, adhesión o apoptosis, pero su uso para la identificación de

un patrón de expresión en procesos patológicos es cuestionado por algunos autores, ya que estas presentan su propio patrón de expresión diferencial (15, 20, 73). Por ejemplo, las líneas celulares 1385Ln y 686Tu han sido establecidas previamente como líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello con niveles de miR-138 en 1385Ln significativamente más bajos que en 686 Tu (12). Además, debemos considerar la diferencia que existe entre líneas celulares, cuyo ciclo celular es modificado para poder ser mantenidas en cultivos, y el tejido fresco del paciente, influenciado por señales moleculares e interacciones celulares dentro del organismo.

Otros autores han sugerido también que los análisis estadísticos usados pueden ser causa de disparidad en los resultados, incluso los parámetros que se escogen para estudiar un microARN u otro a veces es el valor de p otras veces es el *fold change*. Si comparamos métodos de ultrasecuenciación, los algoritmos usados para identificar los microARNs dentro del genoma son tan variados que normalmente se recomienda usar entre 4 y 5 para validar un resultado (150).

5.2 Influencia del tiempo de almacenamiento sobre el ARN total extraído

La calidad de los estudios sobre expresión diferencial con microARNs depende de la cantidad de material usado y lo robusto que sea el método de extracción para reproducir los resultados (151). Todas las plataformas requieren una concentración mínima de ARN total para el análisis de los microARNs, que suele ser entre 100-200 ng/microlitro. Algunas plataformas de ultrasecuenciación recomiendan además que la calidad del ARN total tenga un RIN de por lo menos 6 (152).

El proceso para aislar ARN de una muestra congelada tiene un coste no despreciable que incluye el kit de extracción y la maquinaria adicional necesaria en función del método escogido, y es el primer paso fundamental para llevar a cabo el resto del estudio. Saber qué factores influyen sobre las muestras congeladas es importante para no perder el tiempo en muestras que quizá no valgan. Además, el análisis de cada muestra de manera aislada a medida que se va consiguiendo, supondría un coste muy elevado del estudio, ya que los kits vienen para una cantidad de muestras concretas y tienen fecha de caducidad.

Uno de los obstáculos que encontramos a la hora de extraer ARN de tejido congelado de la cavidad oral es el procesado de la muestra. La mayoría de los protocolos recomiendan la congelación en nitrógeno líquido una vez extraído el tejido del paciente en el menor tiempo posible. Los biobancos públicos representan una herramienta de gran valor gracias a su labor de almacenamiento y conservación de muestras (153). En nuestro caso las muestras que procedían del biobanco llevaban muchos años congeladas y sin utilizar el nitrógeno líquido previo a la congelación. Por ello también buscamos una alternativa a la primera parte del procesado de la muestra con una pieza de mano y una fresa como se explica en la parte de métodos.

La extracción de ARN de calidad es un paso complicado, y los protocolos de preservación y extracción tienen que ser ajustados en muchos casos (154). Los métodos automatizados para la extracción de ARN de tejido congelado de mucosa oral han mostrado mejores resultados que los manuales (155). Sin embargo, adquirir esta tecnología si no se tiene en el laboratorio previamente, encarece enormemente el proyecto. La pieza de mano (Dremel @200 Series) y la fresa diamantada (Muela de Diamante 2 mm Dremel®) usadas en este estudio, ha supuesto una

mejora desde el punto de vista económico y de tiempo, ya que las fresas son esterilizables, se puede obtener un buen número de ellas por un precio muy asequible y en torno a los dos minutos la muestra puede estar totalmente homogeneizada. El uso de la pieza de mano en los controles dio buenos resultados con concentraciones y RIN altos, con una media de RIN de 8.41 y una media de concentración de 458,68 ng/microlitro.

Los resultados obtenidos al analizar las muestras congeladas en diferentes años sugieren que la concentración extraíble de ARN total disminuye con el paso del tiempo. No hemos encontrado trabajos que hagan mención a cómo afecta el tiempo de almacenamiento a la concentración extraíble de ARN total. Hemos hallado un artículo que evalúa el RIN del ARN total extraído conservado a -80°C , realizando mediciones el mismo día de la extracción, a los 14 días y a los 10 meses, concluyendo que el RIN no variaba en ese período de tiempo (72).

Algunos estudios han revelado fragmentación de ARN tras 5 años a pesar de las condiciones de conservación a -70°C o -80°C (156-158). En nuestro estudio, al dicotomizar la variable de “tiempo de congelación” en menores y mayores a 5 años, en relación a la concentración siguen existiendo diferencias estadísticamente significativas ($p=0,001$, concentración media menores de 5 años = 1206,67 ng/microlitro y mayores de 5 años = 180,33 ng/microlitro). Sin embargo, cuando comparamos esta variable dicotomizada (tiempo de congelación a 5 años) con el RIN, no encontramos diferencias estadísticamente significativas ($p=0,087$). Walter et al. extrajeron ARN total de tumores tiroideos conservados en distintas fechas hasta un período de 10 años, y como nosotros, no hallaron cambios en el RIN con el paso del tiempo (159), como tampoco lo hizo Rudloff et al. en muestras de tejido de páncreas congeladas desde el 2001 al 2008 (160).

Seguramente la degradación se ve más influenciada por el manejo de la muestra antes de la congelación que por el tiempo que pasa congelada. En este estudio de Stiekema et al. una parte del tejido esofágico fue congelado en nitrógeno líquido tras la extracción y otra parte del tejido extraído fue congelado dos horas después de la cirugía. Los resultados del RIN fueron de una media de 6.7 para el tejido inmediatamente congelado y de 2.5 para el tejido que tardó dos horas en ser congelado (161). Otros estudios apuntan a características de isquemia o específicas de tejido que afectan a la calidad de la muestra ya que, por ejemplo, las muestras del tracto gastrointestinal, en general, parecen tener un ARN de calidad más baja cuando se compara con las muestras de otros órganos. Esto puede ser debido a las enzimas digestivas o a la colonización bacteriana (162).

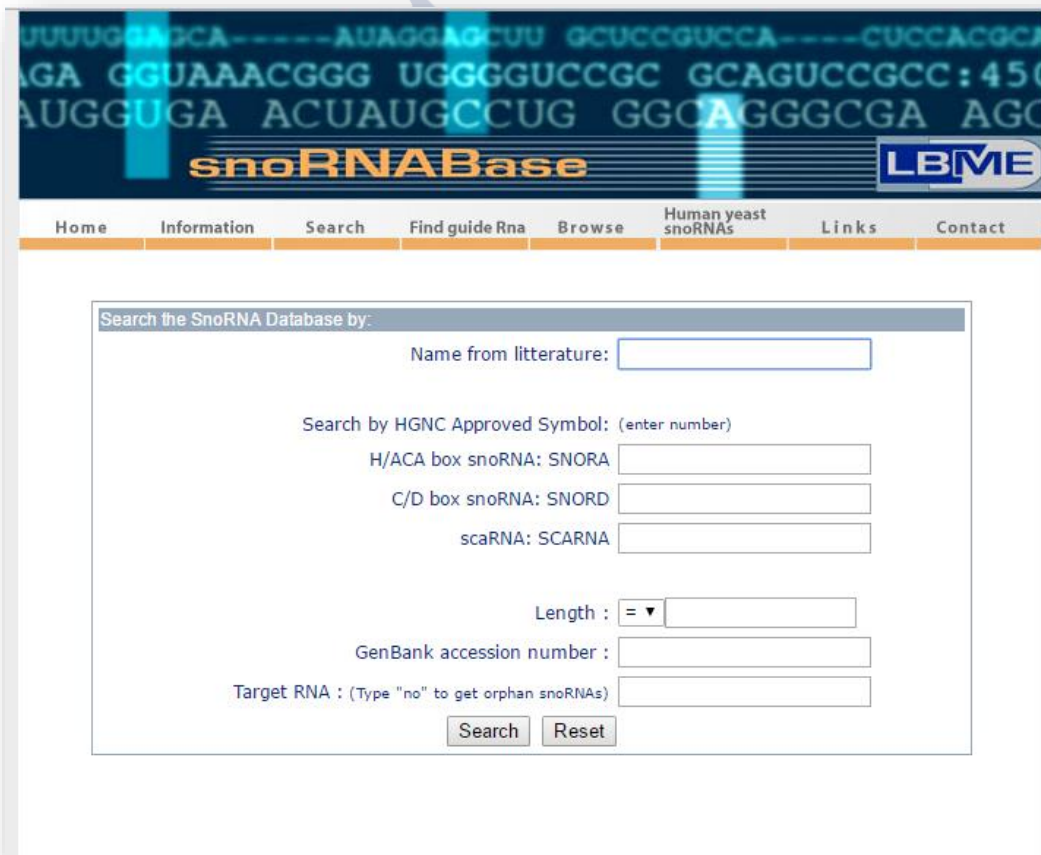
El kit mirVanaTMmiRNA Isolation fue escogido como método de extracción porque permite analizar todos los ARNs de una muestra incluidos los que contienen menos de 200 nucleótidos y aunque existen otros métodos que permiten también aislar dichos ARNs, por razones históricas el mirVanaTMmiRNA Isolation kit es el más usado (151).

Tradicionalmente, la cantidad de ARN que se puede extraer de un tejido, varía en función del tipo de tejido (163), sin embargo, nosotros no hemos hallado diferencias estadísticamente significativas al relacionar la concentración o el RIN de las muestras con el tipo de tejido del que provenían. De hecho, en contraposición a lo que cabía esperar, la encía queratinizada y la de la zona retromolar fueron muestras de las que se obtuvo de media más concentración de ARN total (encía = 687,63 ng/microlitro; retromolar = 653,50 ng/microlitro) que, por ejemplo, de la mucosa yugal (mucosa = 322 ng/microlitro).

5.3 Genes desregulados

Además de los microARNs la placa de microarrays ha revelado otros ARNs pequeños que están desregulados en el COCE, aquí nombrados por su valor p de menor a mayor: el 14q1-4, 14q11-22, ACA17, ENSG00000263442, ENSG00000264591, ENSG00000265325, ENSG00000265607, ENSG00000266646, ENSG00000266755, U84, mgh18S-121, U18A, U8, ENSG00000207118, 14q11-12, U28.

Estos pequeños ARNs pertenecen a la familia de los ARNs nucleolares (snoARN) y fueron buscados en la base de datos snoRNA-LMBE-db (<https://www.snorna.biotoul.fr/>, acceso el 30 de septiembre de 2016) (Figura 44). Dicha base de datos facilita la longitud del snoARN, cuáles son las proteínas a las que se unen, un pequeño resumen del origen de su descubrimiento, así como su secuencia (164).



The image shows the search interface of the snoRNA database. At the top, there is a header with the text 'snoRNABase' and 'LBME'. Below the header is a navigation menu with links: Home, Information, Search, Find guide Rna, Browse, Human yeast snoRNAs, Links, and Contact. The main search area is titled 'Search the SnoRNA Database by:' and contains several input fields: 'Name from literature:', 'Search by HGNC Approved Symbol: (enter number)', 'H/ACA box snoRNA: SNORA', 'C/D box snoRNA: SNORD', 'scaRNA: SCARNA', 'Length: = [dropdown]', 'GenBank accession number:', and 'Target RNA: (Type "no" to get orphan snoRNAs)'. There are 'Search' and 'Reset' buttons at the bottom of the search form.

Figura 44. Base de datos snoRNA-LMBE-db.

Recordemos que los snoARN son ARNs no codificantes que suelen encontrarse en secuencias intrónicas del gen del que proceden, aunque también pueden provenir de un transcrito independiente y que de una misma secuencia intrónica puede salir un snoARN o varios (96). Actúan en complejos ribonucleoproteicos influyendo en la biogénesis de los ribosomas (97). Se dividen en dos grupos, la caja C/B y la H/ACA (*C/D box* y *H/ACA box*), cuya diferencia son los sitios de unión de las proteínas y las modificaciones químicas que catalizan (95).

El ACA17 es un snoARN que pertenece a la familia de la caja H/ACA y cuya expresión en las muestras de COCE fue menor (*fold change* = -2,32) que en las muestras control. Se localiza en el cromosoma 9 y es el único de la familia H/ACA (Figura 45) desregulado en nuestro estudio, ya que el resto pertenecen a la familia C/D.

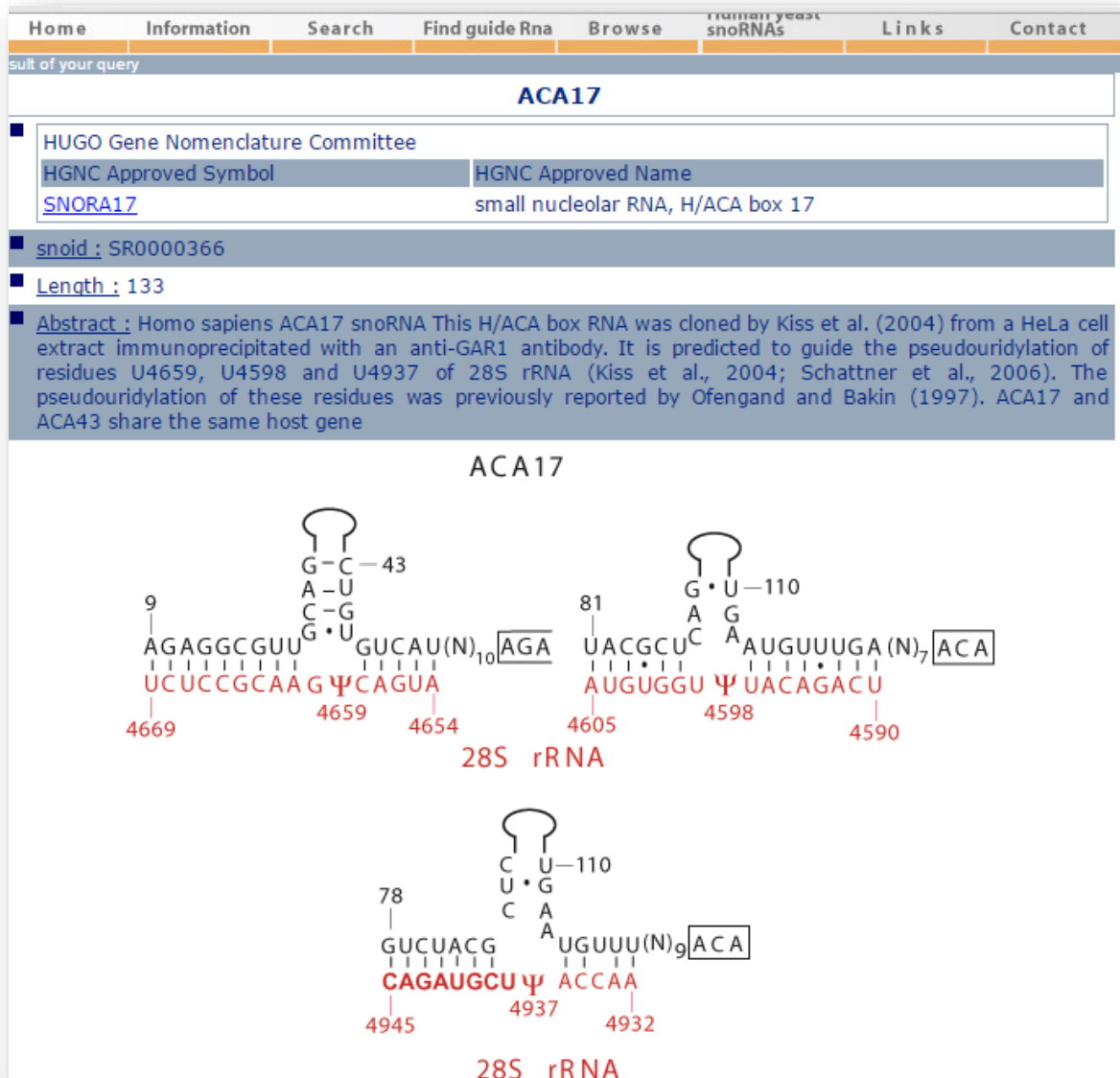


Figura 45. Datos del snoARN ACA17 extraída del snoRNABase.

El 14q1-4 (*fold change* = -3,3), 14q11-12 (*fold change* = -2,65) y 14q11-22 (*fold change* = -2,21) pertenecen a la familia C/D box, con 74 nucleótidos los dos primeros y 71 el último. Actualmente sus dianas no son conocidas y pertenece grupo 14q(II) formado por un total de 31 snoARNs que se encuentran en intrones del gen MEG8 (*maternally expressed 8*). Este gen alberga distintos transcritos de ARN no codificante, incluidos microARNs, y se expresa preferentemente en el músculo esquelético (165).

El U84 (*fold change* = -2,08), sin diana conocida, tiene un total de 78 nucleótidos. La secuencia intrónica de la que procede es el BAT1 (*spliceosome RNA helicase DDX393*) una proteína que pertenece a la familia de helicasas implicadas en procesos de metabolismo de ARN ribosómico. La falta de unión al complejo riboproteico hace pensar en otra función reguladora para este snoARN (166).

El mg18S-121, también conocido como Z17A, (*fold change* = -2,84) tiene un total de 72 nucleótidos (Figura 46) y su diana conocida es la subunidad ribosomal 18S. Su función es la de guiar la metilación 2'O-ribose de 18S rARN U121. Procede de la secuencia intrónica de la RPL2A (*ribosomal subunit protein L2A*), una proteína ribosomal (167).

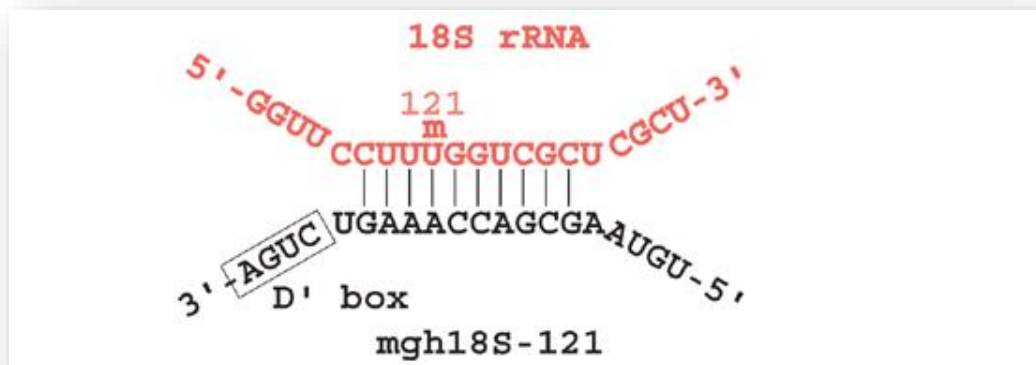


Figura 46. Zona de unión del snoRNA mgh18S-121 a su diana extraída del snoRNABase.

El U18A (*fold change* = -2,29) tiene un total de 70 nucleótidos (Figura 47) y se encuentra en la secuencia intrónica de la proteína ribosómica RPL4 y su función es guiar la metilación 2'O de la ribosa de 28S rARN A1313 (168, 169).

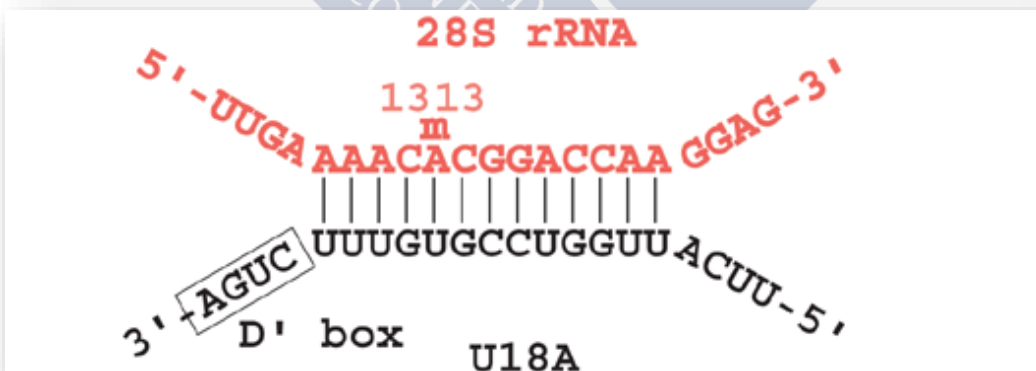


Figura 47. Zona de unión del snoRNA U18A a su diana extraída del snoRNABase.

El U8 (*fold change* = -2,02), con 136 nucleótidos, es transcrito desde una unidad transcripcional independiente, se desconoce la diana a la que se une, pero sí se ha estudiado que la proteína *Xenopus* X29 regula los niveles de expresión de este snoARN (170). También hemos hallado investigaciones sobre su papel en el clavado y embalaje endonucleótico del pre-rARN (171).

El U28 (*fold change* = -2,37) es un snoARN con 75 nucleótidos que guía la metilación 2'O ribosa en la 18S rARN C1391. El U28 sale de una secuencia intrónica conservada del gen U22, este gen localizado en el cromosoma 11, ha sido estudiado detalladamente porque el corte alternativo de este transcrito da lugar al pequeño ARN no codificante que se encarga de la maduración de la subunidad ribosomal 18S (172).

Los genes ENSG00000263442, ENSG00000264591, ENSG00000265325, ENSG00000265607, ENSG00000266646 y ENSG00000266755 están compuestos por 78 nucleótidos cada uno y su expresión fue 2,08 veces menor en muestras de COCE que en los controles. Todos ellos son snoARNs que se hallan en el cromosoma 6 pero ni su diana ni su función han sido estudiadas. El único snoARN cuya expresión aumentó en los casos con respecto a los controles sanos es el ENSG00000207118 (*fold change* = 3,03). Su localización en el genoma se encuentra en el cromosoma 11 y su diana se desconoce.

La expresión anormal de los snoARNs no parece estar estudiada en el COCE aunque sí en otros tipos de cáncer como leucemia (173), colo rectal (174) y pancreático (175). En esta revisión recopilan la expresión diferencial de snoARNs en diferentes enfermedades entre ellas cáncer de cabeza y cuello, y hallan el SNORA71C, que pertenece a la familia de H/ACA, como infra expresado. Los snoARNs desregulados en nuestro estudio no coinciden con los que recopila esta revisión (176).

Una complejidad añadida a la interpretación de estos datos de ARNs desregulados es la aparición de fragmentos pequeños de ARN con motivos de las cajas C/D y H/ACA con funciones de bloqueo traduccional similar a los microARNs y asociados en pruebas de inmunoprecipitación a la Argonauta 2 (AGO2). Recordemos que la proteína Argonauta es uno de los componentes que se une al miARN para formar el complejo RISC, necesario para inducir el silenciamiento de mARNs. Así pues, han surgido una serie de miARNs que silencian mARNs conocidas y que se originan a partir de precursores que muestran las cajas C/D o H/ACA, y por lo tanto estos miARNs coinciden con los snoARNs. Ejemplos de snoARNs que coinciden con estos miARNs son el SNORD12b/HBII-99B (miR-1259), SNORD126 (miR-1201), SNORA34/ACA34 (miR-1291), SNORA81/HBI-61 (miR-1248), SNORA36B/ACA36B (miR-664) (95). Ninguno de estos microARNs o snoARNs ha mostrado una expresión desregulada en nuestro estudio.

5.3.1 MicroARNs desregulados

Para buscar los microARNs desregulados utilizamos la base de datos del miRPub (Diana Tools) que recopila los estudios sobre los microARNs publicados (135). La información sobre las dianas estudiadas para cada microARN fue buscada en las bases de datos www.pubmed.gov y <http://www.uniprot.org/>, acceso el 30 de septiembre de 2016).

hsa-miR-617: Este microARN de 22 nucleótidos se localiza en el cromosoma 12 y su secuencia es AGACUCCCAUUUGAAGGUGGC. La expresión de este microARN fue de 22,46 veces menor en las muestras de COCE en comparación con los controles.

No hemos encontrado en la literatura información sobre este microARN en el COCE, pero sí en estudios de expresión diferencial en el cáncer cervical y de pulmón que coincide con nuestro resultado ya que la expresión en las formas cancerosas estaba disminuida en comparación con los controles sanos (177, 178). En el cáncer de ovario, sin embargo, se ha revelado como un biomarcador para la quimio resistencia (179).

Las dianas conocidas posibles del miR-617 en los mecanismos moleculares que revela el miR Path v3.0 son un total de 41, de las cuales destaca el TWIST2 (*twist related protein 2*), proteína conocida en la maduración de osteoblastos como controladora negativa de los mismos, así como represora de la expresión de las citoquinas proinflamatorias. En el COCE ha demostrado ser una proteína cuya expresión se relaciona con fenotipos agresivos del cáncer (180) lo cual coincide con nuestros hallazgos.

hsa-miR-99a-5p: Este microARN presentó una expresión disminuida en nuestro estudio en comparación con los controles sanos, se localiza en el cromosoma 21 y su secuencia es AACCCGUAGAUC CGAUCUUGUG. Su expresión también aparece disminuida en el cáncer de vejiga, cáncer de próstata, de mama y glioblastoma (181-183). En el COCE su baja expresión se ha relacionado con crecimiento y supervivencia de células cancerosas (184), coincidiendo con nuestros resultados. En el sarcoma sinovial, sin embargo, su expresión en comparación con pacientes sanos se ha visto aumentada (185).

La diana estudiada en este microARN es el IGF-1R (*insulin like growth factor 1 receptor*) en el cáncer de mama, proteína hallada en la superficie celular cuya función está relacionada con el crecimiento celular y activación de células madre (186).

Una curiosidad de este microARN son las investigaciones que llevan a cabo Mac Lellan et al. con la finalidad de analizar la expresión diferencial de microARNs en muestras de sangre de pacientes sanos, fumadores y en ayunas. Dicho grupo utilizó qRT-PCR con 742 microARNs. Los resultados revelaron que el miR-99a-5p fue uno de los microARNs que podía ser utilizado como control endógeno ya que permanecía con la expresión inalterada independientemente del grupo al que perteneciera (187).

hsa-miR-4417: Este microARN localizado en el cromosoma 1 mostró una expresión 4,45 veces mayor en las muestras de COCE comparado con los controles sanos de nuestro estudio. Su secuencia es GGUGGGCUUCCCGGAGGG. El papel oncogénico de este microARN coincide con los resultados de un trabajo de cáncer de mama con microarrays en muestras de parafina, ya que la expresión del miR-4417 se asoció con el cáncer de mama hereditario relacionado con la mutación de BRCA1 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) y BRCA2 (*breast cancer type 1 susceptibility protein*) (188). La BRCA1 es una ligasa que juega un papel clave en la reparación del ADN dañado y se requiere para la progresión normal del ciclo celular y la BRCA2 participa en la activación de la fase de síntesis del ciclo celular.

hsa-miR-1224-5p: Este microARN aparece en las muestras de COCE expresado 3,55 veces menos que en los controles. Localizado en el cromosoma 3 su secuencia es GUGAGGACUCGGGAGGUGG. Aunque este microARN se ha estudiado como desregulado en diversos cánceres, en algunos aparece como sobre expresado y en otros como infra expresado. En el glioma se presenta como un supresor tumoral cuya expresión está relacionada

positivamente con la supervivencia del paciente ya que suprime la proliferación e invasión celular y promueve la apoptosis (189).

Ensayos de luciferasa revelan que actúa sobre el gen CREB1 (*cyclin AMP-responsive element-binding protein 1*), así como todos los genes que se encuentran en una posición posterior en el genoma, MMP9 (metaloproteinasa 9) y Bcl-2 (*B-cell-lymphoma-2*) (189). La sobre expresión del CREB1 revierte el efecto del miR-1224-5p en la proliferación, invasión y apoptosis de células de glioma. El CREB1 es un factor de transcripción que regula el crecimiento, homeostasis y supervivencia celular (190) y se ha estudiado en terapia antitumoral también para el COCE (191). La Bcl-2 es una proteína cuya expresión anormal se asocia con procesos que mantienen la supervivencia en células cancerosas y aumentan la proliferación celular (65). El aumento de expresión de la MMP9 se ha relacionado con procesos inflamatorios y con algunos cánceres. Esta metaloproteinasa se clava en la matriz extracelular y juega un papel crítico en la apoptosis celular, angiogénesis, crecimiento tumoral y metástasis (192).

Un trabajo de expresión diferencial con muestras congeladas y microarrays revela una expresión aumentada en pacientes con cáncer colo rectal en comparación con los controles sanos de este microARN (193). Otro estudio con muestras de cáncer de pulmón producido por asbesto mide la expresión diferencial de miARNs en 26 muestras congeladas tumorales y 8 muestras controles del mismo paciente, resultando en el primer grupo el miR-1224-5p como infra expresado (194).

hsa-miR-204-5p: Este microARN se localiza en el cromosoma 9 y su secuencia es UUCCCUUUGUCAUCCUAUGCCU. En nuestro estudio resulta 2,75 veces menos expresado en las muestras de COCE en comparación con los controles sanos. Estos hallazgos coinciden con los estudios de expresión diferencial del cáncer gástrico, del cáncer de cuello uterino y en estudios sobre líneas celulares de glioma donde el miR-204-5p aparece infra expresado en células tumorales (195-197).

Una de las dianas estudiadas de este microARN es el CREB1, anteriormente descrito, cuya relación se ha estudiado en el cáncer colo rectal (198). Otro gen estudiado es el SIX1 (*sine oculis homeobox homolog 1*), una proteína relacionada con la progresión del cáncer por inducir la EMT. La relación entre el miR-204-5p y el SIX1 se ha estudiado en líneas celulares del cáncer de mama donde dicho microARN puede suprimir la invasión y migración de las células cancerosas (199).

La sobre expresión del miR-204-5p suprimió la proliferación celular del carcinoma tiroideo papilar induciendo el arresto del ciclo celular y apoptosis. Ensayos de luciferasa en líneas celulares de dicho carcinoma revelaron la IGFBP5 (*insulin-like growth-factor binding protein 5*) como su diana (200) y cuya sobre expresión revirtió parcialmente el efecto inhibitorio del crecimiento del miR-204-5p. Estos hallazgos, sin embargo, son diferentes para el COCE, ya que la expresión disminuida de la IGFBP5 se relaciona con el desarrollo neoplásico de los queratinocitos (201), coincidiendo con lo obtenido en nuestros resultados.

Otras dianas estudiadas en el cáncer gástrico del miR-204-5p, también infra expresado, son el USP47 y RAB22A. La USP47 (*ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase 47*) es una proteína que actúa como reguladora del crecimiento celular y como reparadora del ADN dañado para mantener la integridad del genoma. La RAB22A (*ras-related protein Rab-22A*) es una proteína

implicada en la endocitosis y transporte intracelular de proteínas (202). Ésta última diana también ha sido estudiada en el cáncer colo rectal cuya infra expresión inhibe la proliferación e invasión tumoral y aumenta la sensibilidad a los quimioterapéuticos (203).

hsa-miR-497-5p: este microARN, cuya expresión en nuestros resultados aparece disminuida en las muestras de COCE, se localiza en el cromosoma 17 y su secuencia es CAGCAGCACACUGUGGUUUGU. La expresión de este microARN ha sido negativamente asociada con la supervivencia en el carcinoma de células escamosas orofaríngeo (204). Nuestros resultados no coinciden con esta afirmación ya que en el análisis que compara los casos que estaban en estadio IV en el momento de la extirpación de la muestra y los controles sanos, el miR-497-5p aparece disminuido, 2,92 veces menos con respecto a los controles ($p=0,001549$).

Si recurrimos a la herramienta bioinformática este microARN puede llegar a regular hasta 1370 dianas, sin embargo, la única corroborada con ensayos de luciferasa en líneas celulares es el SMAD3 (*mothers against decapentaplegic homolog 3*), una proteína importante que funciona como factor de transcripción del factor de crecimiento TGF beta (205).

hsa-miR-27b-3p: este microARN se localiza en el cromosoma 9, su secuencia es UUCACAGUGGCUAAGUUCUGC. Ha sido estudiado en células de glándulas mamarias como silenciador de la proteína KHSRP (*far upstream element-binding protein 2*). El silenciamiento de dicha proteína es necesario para que se produzca la EMT (transición epitelio-mesenquimal) que confiere características necesarias para la progresión maligna a las células cancerosas. La KHSRP controla el corte alternativo de un grupo de pre-mARNs para favorecer un fenotipo epitelial específico (206). Esto sugiere que el miR-27b-3p se sobre expresa en situaciones de progresión tumoral, aunque los hallazgos de otros trabajos, incluidos el nuestro, no coinciden con esta afirmación. Los estudios de expresión diferencial en muestras de cáncer coinciden con los nuestros, ya que se relaciona la expresión baja del miR-27b-3p con una baja supervivencia en el cáncer de mama (207), y en el adenocarcinoma de esófago su expresión se encuentra disminuida con respecto al tejido sano normal (208).

Las investigaciones en líneas celulares de cáncer gástrico revelan otra diana para este miR, la proteína ROR1 (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptors 1*) cuyo papel oncogénico se ha visto en varios tumores malignos. La sobre expresión del miR-27b-3p redujo la expresión de la ROR1 disminuyendo a su vez la proliferación celular (209).

hsa-miR-7797: este microARN cuya secuencia es UUCCCAGCCAACGCACCA, se localiza en el cromosoma 3 y su expresión en las muestras de COCE ha sido inferior, 2,08 veces menos, que en las muestras de controles sanos. El estudio de este microARN en líneas celulares de leucemia mieloide reveló un aumento de este microARN en comparación con células normales. La diana propuesta en este mismo estudio para este microARN fue el factor de transcripción *poly(rc) binding protein 1*, ya que la transfección del miR-7797 conllevó a una disminución de ésta proteína (210).

hsa-miR-1237-5p: localizado en el cromosoma 11 este microARN de 21 nucleótidos, CGGGGGCGGGGCCGAAGCGCG, presentó una expresión aumentada en las muestras de COCE en comparación con los controles sanos. Estos resultados coinciden con el grupo de Zheng et al. que analizaron líneas celulares de carcinoma de esófago con microarrays

comparándolos con líneas celulares normales para estudiar la expresión diferencial de microARNs. Uno de los microARNs que se expresó más en las células cancerosas fue el miR-1237-5p (211).

hsa-miR-509-3p: la secuencia de este microARN es UGAUUGGUACGUCUGUGGGUAG y se localiza en el cromosoma X. La expresión de este miR en muestras de COCE fue de 4,82 veces inferior que en los controles sanos. Este microARN aparece también como infra expresado en muestras de cáncer de ovario, el efecto de su expresión se ha estudiado en líneas celulares cancerosas dando lugar a una disminución de la migración celular (212), aumentando la sensibilidad al cisplatino e induciendo la apoptosis (213). En el epiteloma intra ocular en un estudio de expresión diferencial con líneas celulares también se encontraron con este microARN infra expresado (214).

La sobre expresión del miR-509-3p en células normales produce el arresto del ciclo celular en la fase G1 e inhibe la formación de colonias y migración, mediante la proteína CDK2 (*cyclin dependent kinase 2*) (215). La proteína CDK2 se ha estudiado como biomarcador del COCE (216), así como en el cáncer de cabeza y cuello (217).

El miR-509-5p disminuye también la expresión de la proteína Rack1 (*receptor for activated C kinase 1*) (215) que ha demostrado ser un marcador de pronóstico pobre para el COCE (218). La expresión del Rack1 contribuye a la progresión del COCE, el mecanismo que utiliza ha sido estudiado en modelos in vitro e in vivo. El aumento de expresión del Rack1 en los diferentes estadios tumorales del COCE está relacionado con el aumento del mecanismo de señalización AKT/mTOR/S6 (219).

Otra de las dianas estudiada en este microARN fue el oncogén MAP3K8 (*mitogen-activated protein kinase 8*), cuya infra expresión en líneas celulares de cáncer renal disminuyó la proliferación y migración celular (220). Esta proteína no parece haber sido estudiada en el COCE.

hsa-miR-149-3p: Este microARN de 21 nucleótidos, AGGGAGGGACGGGGCUGUGC, se localiza en el cromosoma 2 y su expresión ha sido 2,13 veces superior en el COCE en comparación con los controles sanos.

Los resultados coinciden con otros estudios de expresión diferencial de microARNs en procesos patológicos. La expresión analizada con microarrays (2042 sondas) en líneas celulares de glioma también reveló una expresión superior en la patología comparado con células de queratinocitos normales (221). En un estudio de expresión diferencial con qRT-PCR que medía 94 sondas específicas de microARNs, el miR-149-3p aparece sobre expresado en pacientes con hepatitis C comparado con controles sanos (222).

hsa-miR-509-3-5p: este microARN se localiza en el cromosoma X, su secuencia es UACUGCAGACGUGGCAAUCAUG, y la expresión de este miR se ha visto disminuida, *fold change* = -4,82, en las muestras de COCE en comparación con los controles sanos.

En el estudio de Chikooree et al. de expresión diferencial de microARNs con microarrays analizaron 3 muestras de tejido congelado de fibrosis oral submucosa y 3 muestras de tejido sano, donde este microARN también apareció como infra expresado (223). Si bien en otros

estudios de COCE no hemos hallado evidencias de este microARN, en líneas celulares de melanoma el miR-509-3-5p fue relacionado con la EMT catalogándose como oncogén (224), y en el carcinoma de ovario aparece significativamente sobre expresado con respecto a los controles sanos (225).

hsa-miR-509-5p: Este microARN de 21 nucleótidos, UACUGCAGACAGUGGCAAUCA, se localiza en el cromosoma X y su expresión ha sido 2,11 veces menor en las muestras de COCE comparada con las muestras de controles sanos. La expresión disminuida de este microARN se ha observado en estudios de expresión diferencial del cáncer de ovario y renal (226, 227).

En el cáncer de pulmón la expresión de este miR disminuye la invasión y progresión celular a través de la FOXM1 (*forkhead box protein M1*) (228). No hemos hallado trabajos que relacionen esta proteína con el COCE, pero sí en otros tumores malignos y su asociación entre la expresión y el pronóstico de los pacientes es contradictoria. Sin embargo, un meta-análisis que recopila estudios de cáncer de mama, gástrico y hepatocelular entre otros, ha hallado la expresión de la FOXM1 como un marcador de pronóstico desfavorable en pacientes que padecen tumores sólidos malignos. Esta proteína forma parte de una familia de factores de transcripción y regula la expresión de genes relacionados con el ciclo celular (229).

Otra de las dianas que se le atribuyen a este microARN es la Mdm2 (*mouse double minute 2*). La Mdm2 ha sido estudiada en procesos cancerosos ya que su expresión conlleva a una disminución de la proteína p53. Los estudios de la proteína p53 han revelado un papel inductor en la expresión del miR-509-5p (230).

La NBS1 (*nibrin*) es la proteína encargada de detectar las roturas de doble cadena en el genoma y por lo tanto las mutaciones a nivel de esta proteína pueden afectar a la estabilidad del mismo. La relación entre los SNPs en este gen y la posibilidad de desarrollar cáncer colo rectal se analizó en el estudio de Li et al. y se concluyó que la variación nucleotídica afecta a la región 3'UTR donde el miR-509-5p tiene afinidad, afectando a los niveles de expresión y actividad de la NBS1 (231).

hsa-miR-486-5p: localizado en el cromosoma 8, este microARN cuenta con una secuencia de 22 nucleótidos, UCCUGUACUGAGCUGCCCCGAG. En nuestro estudio su expresión disminuida en el COCE, *fold change* = -3,38, coincide con otros hallazgos de expresión diferencial en el COCE y en el carcinoma de lengua como hemos descrito anteriormente (121, 144). Aunque la expresión disminuida de este miR no es común en todos los procesos cancerosos.

La expresión de este microARN en muestras de cáncer de pulmón parece disminuir con respecto a los controles sanos y la diana estudiada en líneas celulares ha sido la PIK3R1 (*phosphatidyl inositol 3-kinase regulatory subunit alpha*) (232). Si bien la expresión disminuida de la PIK3R1 en el carcinoma hepatocelular, mediada por el miR-486-5p, suprimió el crecimiento tumoral (233), en el cáncer laríngeo la expresión de esta proteína se ha hallado disminuida (234). En los estudios de cáncer de mama el PIK3R1 se ha estudiado como diana del miR-21, un aumento del PIK3R1 se ha relacionado con disminución de la migración celular e invasión, así como la reversión de la EMT (235).

En el cáncer colo rectal este microARN también presenta una expresión disminuida y su diana estudiada es la Neuropilina-2 (236). La Neuropilina-2 es una glucoproteína transmembrana que transmite señales a través de la membrana celular, y que también ha sido estudiada en el carcinoma de células escamosas esofágico como promotora de la tumorigénesis y metástasis (237). Otra diana del miR-486-5p estudiada en el adenocarcinoma gástrico fue el FGF9 (*fibroblast growth factor 9*), miembro de la familia de los factores de crecimiento de fibroblastos. Una disminución de la expresión del miR-489-5p en este tumor se relacionó significativamente con pacientes con un pronóstico pobre (238). En el adenocarcinoma ductal pancreático la expresión de este microARN analizada en sangre con controles sanos, reveló el miR-486-5p como un biomarcador para el cáncer pancreático (239).

hsa-miR-3175: localizado en el cromosoma 15, este microARN está formado por 22 nucleótidos, CGGGGAGAGAACGCAGUGACGU. La expresión de este miR ha sido superior, 2,63 veces más, en las muestras de COCE comparadas con los controles sanos.

La HOXB1 ha resultado ser la diana del miR-3175 en células de glioma, donde la infra expresión del gen HOXB1 en líneas celulares favoreció la proliferación e invasión celular, así como inhibición de la apoptosis (240). Pertenece a la familia de los genes denominados “*homebox*” que codifican para diferentes factores de transcripción implicados en la morfogénesis. La proteína HOXB1 ha sido estudiada también en líneas celulares de COCE donde se halló un patrón de metilación en el promotor que inhibía la expresión de este gen (241).

hsa-miR-1290: la expresión de este miR en las muestras de COCE fue 3,7 veces superior comparado con los controles, está localizado en el cromosoma 1 y su secuencia es UGGAUUUUUGGAUCAGGGA.

Estos resultados en la expresión coinciden con las investigaciones en líneas celulares de cáncer gástrico, donde el miR-1290 ha demostrado promover la proliferación celular y la migración actuando sobre la FOXA1 (*hepatocyte nuclear factor 3-alpha*) (242). En trabajos sobre líneas celulares de cáncer de pulmón la expresión aumentada de este microARN supuso un incremento en la invasión y metástasis (243). Los estudios con muestras de cáncer de mama también revelaron una expresión aumentada de este microARN (244). El análisis del miR-1290 en muestras de sangre de pacientes con cáncer cervical, comparado con controles sanos, reveló un aumento de la expresión en los pacientes con procesos cancerosos (245).

En líneas celulares de carcinoma laríngeo analizaron las dianas de este oncomiR, la MAF y la ITPR2 (246). La proteína del gen MAF (*transcription factor Maf*) ha sido estudiada en procesos como desarrollo celular de las fibras del cristalino, aumento de la susceptibilidad de las células T a la apoptosis o diferenciación terminal de los condrocitos (247). La ITPR2 (*inositol 1,4,5-triphosphate receptor type2*) es un regulador clave en el transporte del calcio transmembrana, actividad esencial para la proliferación y el ciclo celular, dicha proteína se ha encontrado aumentada en pacientes con leucemia comparados con controles sanos (248). La ITPR2 libera el calcio del retículo endoplásmico aumentando el acúmulo de calcio en las mitocondrias debido a la disminución del potencial de la membrana mitocondrial, favoreciendo a su vez la acumulación de especies de oxígeno reactivas y la senescencia inducida por oncogenes (249).

En el carcinoma de células escamosas esofágico el miR-1290 promueve la progresión del cáncer a través del factor nuclear I/X (NFIX) (250). Este factor de transcripción no ha sido muy estudiado en cánceres, pero sí sus mutaciones en síndromes como el *Marshall-Smith-Syndrome* caracterizado por anomalías craneofaciales, maduración ósea anormal, retraso en el desarrollo y dificultades respiratorias (251).

En el cáncer de colon la diana estudiada para este microARN es la KIF13B (*kinesin-like protein 13B*), una proteína clave para el transporte de la VEGF2 (*vascular endothelial growth factor 2*), desde el aparato de Golgi hacia la membrana, necesaria para la estimulación de la angiogénesis (252). El miR-1290 ha mostrado una expresión aumentada en muestras de cáncer de colon, dicha sobre expresión parece conducir a la formación de células multinucleadas. Otro mecanismo también estudiado en el cáncer de colon con este microARN es el de Wnt que se activa con el aumento del miR-1290 y aumenta a su vez los factores de transcripción c-Myc y Nanog (253).

La expresión de este miR, en contraposición con lo que hemos visto hasta ahora, en muestras de pacientes con fibrosis oral submucosa se ha visto disminuida (223).

hsa-miR-139: este microARN ha sido estudiado en numerosos experimentos, se localiza en el cromosoma 11 y su secuencia madura es mayor que los demás microARNs GUGUAUUCUACAGUGCACGUGUCUCCAGUGUGGCUCGGAGGCUGGAGACGCGG CCCUGUUGGAGUAAC. Este micro ARN en estudios de expresión diferencial de carcinoma de lengua y cáncer de cabeza y cuello ha mostrado siempre una expresión disminuida (254), coincidiendo con nuestros resultados (*fold change* = -3,07). Las dianas estudiadas en este microARN en el COCE han sido aquellas implicadas en el mecanismo de señalización Akt a través del cual este microARN induce apoptosis celular (255).

La expresión disminuida en tejido canceroso de este microARN ha sido contrastada en diferentes estudios de cáncer colo rectal, glioblastoma o digestivo (256-258). En el cáncer colo rectal se han identificado dos dianas la NOTCH1 (*neurogenic locus notch homolog protein 1*) y la BCL2 (259), y en el glioblastoma tres, la IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*), AMY-1 (*alpha amylase isozyme*) y PGC-1beta (*peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1-beta*) (258). Si bien no hemos hallado estudios que relacionen el miR-139 y el NOTCH1 en el COCE, sería interesante valorar dicha diana ya que, recordemos, es un gen que se ha visto mutado en pacientes con COCE (50).

El análisis de este microARN en líneas celulares ha revelado que se expresa gracias a la acción de la proteína p53 quien induce su transcripción. La sobre expresión del miR-139 condujo a la disminución de la proteína oncogénica PDE4E (*phosphodiesterase 4D*) implicada en la promoción de múltiples tumores (260).

hsa-miR-1908-5p: localizado en el cromosoma 11 con una secuencia de 21 nucleótidos, CGGCGGGGACGGCGAUUGGUC, este miR presenta una expresión 2,02 veces superior en las muestras de COCE comparado con los controles sanos. Los estudios de líneas celulares de cáncer de pulmón han hallado este microARN como infra expresado y sugieren que una de las dianas de este microARN es el Akt (261).

En el osteosarcoma, sin embargo, la expresión de este microARN aumentada es marcador de pronóstico pobre (262). La diana estudiada en este tipo de cáncer es el PTEN (*phosphatidylinositol 3,4,5 triphosphate 3-phosphatase*) (263), lo cual se ha comprobado con ensayos de luciferasa, y en otros procesos como en el glioblastoma (264).

La expresión del miR-1908 se ha visto aumentada en los adipocitos de manera natural y se ha estudiado que la transcripción de dicho microARN puede deberse al efecto de la proteína NF-kappaB que se une a su promotor (265).

hsa-miR-663b: localizado en el cromosoma 2 este microARN tiene la siguiente secuencia GGUGGCCCGGCCGUGCCUGAGG. Todos los estudios que hemos encontrado sobre cáncer de este microARN revelan una expresión aumentada, resultado que coincide con el nuestro (*fold change* = 3,48). Para el cáncer colo rectal se comparó con ultrasecuenciación muestras de tejido de cáncer colo rectal y controles sanos (266). En el cáncer de vejiga se identificó en muestras de sangre analizadas con RT-PCR como biomarcador del cáncer junto con el miR-497 (267).

El único artículo que hemos encontrado que habla sobre las dianas de este miR utilizó líneas celulares de leucemia linfocítica crónica para comprobar que el miR-663b disminuía la expresión de la CCL17 (*C-C motif chemokine 17*, implicada en mecanismos de señalización célula-célula), DDR1 (*epithelial discoidin domain-containing receptor 1*, funciona como receptor de superficie en la célula y regula la unión a la matriz extracelular, la migración, supervivencia y proliferación celular), PIK3CD (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit delta isoform*, implicada en el desarrollo celular de las células natural killer y migración hacia las zonas de inflamación) y de CD40 (*tumor necrosis factor receptor superfamily member 5*, induce la secreción de inmunoglobulinas en macrófagos y células B) (268).

hsa-miR-4521: localizado en el cromosoma 11, cuenta con una secuencia de 22 nucleótidos, GCUAAGGAAGUCCUGUGCUCAG, y su expresión ha sido 8,73 veces menor en las muestras con COCE comparadas con los controles sanos. Este microARN ha sido hallado como infra expresado en la leucemia linfocítica crónica, así como en pacientes con cáncer de pulmón. Ambos análisis fueron llevados a cabo con microarrays en muestras de tejido tumoral y sano de pacientes (269).

hsa-miR-99a-3p: este microARN de 22 nucleótidos, CAAGCUCGCUUCAUGGGUCUG, se localiza en el cromosoma 21, su expresión fue de 3,92 veces inferior en las muestras con COCE comparadas con los controles sanos. La sobre expresión de este gen en estudios sobre cáncer colo rectal con qRT-PCR revelaron una tasa de supervivencia mayor y una sensibilidad también mayor a la quimioterapia (270). Al comparar las muestras de COCE en estadio IV y los controles sanos la expresión es aún inferior con un *fold change* = -4,03.

hsa-miR-3180-3p: La secuencia de este miR es UGGGGCGGAGCUUCCGGAGGCC y está localizado en el cromosoma 16. La expresión de este microARN fue de 2,08 veces superior en las muestras de COCE comparado con las muestras de tejido sano. El único trabajo que hemos encontrado con respecto a este microARN es el de expresión diferencial con microarrays en muestras de tejido sano y pacientes con fibrosis oral submucosa donde la expresión se observó disminuida en esta patología (223).

hsa-miR-451a: la expresión disminuida en las muestras de COCE de nuestro análisis (*fold change* = -3,28), coincide con la infra expresión demostrada en el resto de los estudios sobre cánceres analizados. Este miR se localiza en el cromosoma 17 y su secuencia es AAACCGUUACCAUACUGAGUU.

En el carcinoma celular escamoso hipofaríngeo el miR-451a analizado en líneas celulares demostró inhibir la migración e invasión celular mediante acción directa sobre la diana ESDN (*discoïdin*) implicada en procesos de señalización celular (271). Además, se ha relacionado con el aumento a la sensibilidad del tamoxifén en las muestras de cáncer de mama cuyas pruebas fueron realizadas en líneas celulares (272).

En el carcinoma tiroideo utilizaron líneas celulares para demostrar que la sobre expresión de este microARN afectaba al mecanismo de señalización de Akt/mTOR y reducía la expresión de MIF (*macrophage migration inhibitory factor*), c-Myc, y AKT1. Los bajos niveles de miR-451a se relacionan con características clínico-patológicas agresivas de este tumor (273).

Otro estudio con microarrays de 10 muestras de adenocarcinoma de pulmón y muestras de tejido sano relación niveles bajos de miR-451a con metástasis nodular, gran tamaño tumoral y pronóstico pobre. Después utilizaron herramientas de bioinformática para detectar las dianas de este microARN y hallaron la TSC1 (*hamartin*) estudiada como supresor tumoral e implicada en el transporte de proteínas mediado por micro túbulos, así como dianas del mecanismo de señalización de PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptors*) implicado principalmente en el metabolismo de lípidos y glucosa (274).

En el cáncer gástrico, tras corroborar la baja expresión con qRT-PCR, se estudiaron las posibles dianas con líneas celulares de este miR donde concluyeron que afecta a la expresión de mTOR, PIK3CB (*phosphatidylinositol 4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform*) y TSC1 (275). En el cáncer colo rectal la expresión disminuida de este microARN se observó en tumores de estadíos más avanzados (276).

hsa-miR-654-3p: este miR localizado en el cromosoma 14 tiene una secuencia de 22 nucleótidos, UAUGUCUGCUGACCAUCACCUU.

La expresión de este miR disminuyó en las muestras de COCE (*fold change* = -6,05) comparado con las muestras de tejido sano. Esta expresión disminuida en procesos tumorales malignos también fue observada en muestras de tejido congelado de cáncer de pulmón (277) y en líneas celulares de cáncer próstata (278).

hsa-miR-199b-5p: este es un microARN estudiado en diferentes campos, localizado en el cromosoma 9, tiene una secuencia de 23 nucleótidos CCCAGUGUUUAGACUAUCUGUUC y en nuestro estudio la expresión del COCE fue de 8,4 veces inferior comparada con las muestras de tejido sano.

En las células pancreáticas la diana a la que se ha demostrado afectar es la MLK3 (*mitogen-activated protein kinase 3*) cuyo papel se ha estudiado en la organización de microtúbulos durante el ciclo celular (279).

El *Tigecycline* es un antibiótico utilizado para infecciones de piel cuya efectividad en la terapia anticancerosa se está estudiando cada vez más. Los ensayos en líneas celulares de glioma revelan que este compuesto inhibe la proliferación celular estimulando la producción del miR-199b-5p quien a su vez actúa sobre el mecanismo HES1-AKT (280). El HES1 (*Hairy and enhancer of split homolog-1*) es un factor de transcripción que juega un papel regulador en la miogénesis, ciclo celular, proliferación, diferenciación y apoptosis, y también ha sido estudiada como diana del miR-199b-5p en el meduloblastoma (281).

Otras de las dianas estudiadas en la leucemia mieloide aguda para este miARN son la DDR1, recordemos que también era una posible diana para el miR-663b, y la PODXL (*podocalyxin*) implicada en la regulación de la adhesión y la morfología celular, así como en la progresión del cáncer mediante el aumento de la tasa de migración y contactos célula-célula de una manera integrina dependiente (282). En el cáncer de ovario la infra expresión de este microARN se relaciona con tumores resistentes al cisplatino (283).

Por el contrario, en el osteosarcoma y en el carcinoma tiroideo parece estar sobre expresado. Los estudios revelan que en la diferenciación de osteoblastos el miR-199b-5p estimula la osteogénesis a través del mecanismo de señalización GSK-3 β / β -catenin (284), esto parece explicar por qué en el osteosarcoma la expresión del miR-199b-5p aumenta comparándolo con controles sanos (285). En el carcinoma tiroideo en los estudios de expresión diferencial con microarrays se relaciona la expresión aumentada del miR-199-5p con un aumento de la invasividad celular (286).

hsa-miR-29c-3p: localizado en el cromosoma 1 y cuya secuencia es UAGCACCAUUUGAAAUCGGUUA, este microARN presentó una expresión disminuida en las muestras de COCE (*fold change* = -4,81), estos resultados coinciden con un meta análisis sobre carcinoma nasofaríngeo que recopiló un total de 775 muestras cancerosas y 227 no cancerosas, revelando la infra expresión de este miARN para este tumor (287).

En un estudio de expresión de cáncer de cabeza y cuello se analizó la expresión diferencial de microARNs con qRT-PCR y la expresión baja del miR-29c-3p se asoció con tumores de pronóstico poco favorable (288). Al comparar las muestras de casos con un estadio IV con los controles, vemos que la expresión de este miR es aún menor (*fold change* = -5,43).

En los estudios sobre este microARN se ha observado una expresión aumentada durante el proceso de senescencia. El miR-29c-3p parece promover la senescencia de células madre actuando sobre la diana CNOT6 (*CCR4-NOT transcription complex subunit 6*) mediante dos mecanismos, a través del p53-p21 y p16-pRB. La CNOT6 se ha visto implicada en varios procesos como la degradación de ARN mensajero o la represión traduccional al inicio del proceso (289).

hsa-miR-486-3p: este miR de 21 nucleótidos, CGGGGCAGCUCAGUACAGGAU, se localiza en el cromosoma 8. Su expresión en el COCE fue de 4,78 veces menor que en muestras de pacientes sanos.

Un estudio en el cáncer cervical revela que este microARN actúa sobre el gen ECM1 (*extracellular matrix protein 1*) que estimula la proliferación endotelial y promueve la

angiogénesis. La inhibición de esta proteína reprime la proliferación celular y metástasis (290). La expresión diferencial de microARNs analizada en muestras de retinoblastoma también reveló una disminución en la expresión del miR-486-3p (291).

En el carcinoma de pulmón este microARN ha sido estudiado como regulador de la BMP2 (*bone morphogenetic protein-2*) cuya expresión en tejido tumoral pulmonar se relaciona con pronóstico pobre (292).

A diferencia de nuestros resultados y los de los tumores cervicales y de pulmón, un estudio de expresión diferencial entre neoplasia pancreática y pacientes sanos reveló una expresión significativamente elevada del miR-486-3p en procesos neoplásicos (293).

hsa-miR-138-5p: localizado en el cromosoma 23, este miR cuenta con 23 nucleótidos, AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG. Nuestros resultados de expresión diferencial que muestran un miR-138-5p disminuido (*fold change* = -3,75), coincide con el resultado de otros estudios (130, 294, 295).

En estudios de COCE este microARN presenta una expresión disminuida con respecto al tejido oral sano. El mecanismo molecular en el que está implicado fue analizado en líneas celulares y la diana estudiada fue la YAP1 (*Yes-associated protein 1*), la interacción sobre esta proteína fue corroborada con ensayos de luciferasa y la sobre expresión del miR-138-5p redujo el crecimiento tumoral. La YAP1 juega un papel importante en el control del tamaño del órgano utilizando el mecanismo de señalización Hippo (296). En regiones pre malignas de tejido oral se han hallado acumulaciones nucleares del YAP1. La acumulación del YAP y TAZ (*WW domain-containing transcription regulator protein 1*) conllevan a la activación de determinados factores de transcripción, sobre todo los de la familia TEAD (*Transcriptional enhancer factor TEF*) cuya actividad asegura la supervivencia de la célula y estimula el crecimiento en líneas celulares del COCE (297).

En este estudio analizaron 42 muestras de tejido congelado de pacientes con COCE y 8 muestras de tejido sano adyacente y utilizaron qRT-PCR para analizar los microARNs desregulados y el resultado final coincide con nuestro estudio al hallar la expresión del miR-138-5p disminuida (130).

La expresión disminuida de este microARN también se ha observado en el cáncer colo rectal, concretamente, en tumores con afectación nodular, metástasis y pronóstico pobre. La diana estudiada para el miR-138-5p en este cáncer es la PD1L-1 (*programm cell death 1 ligand 1*). La transfección del miR-138-5p en líneas celulares revela una disminución del crecimiento tumoral y una disminución a su vez de la PD1L-1, proteína esencial para la proliferación de las células T y la producción de interleuquina 10 (295).

En el cáncer de páncreas también su expresión aparece como disminuida, tanto en muestras de tejido congelado como en líneas celulares. La sobre expresión del miR-138-5p redujo el crecimiento tumoral en líneas celulares de cáncer de páncreas y el mismo estudio revela la FOXC1 (*forkhead fox protein C1*), estudiada como regulador clave para la viabilidad celular y resistencia al estrés oxidativo, como posible diana de éste microARN, ya que la proteína disminuye cuando la expresión del miR-138-5p aumenta (294).

La sobre expresión del miR-138-5p en líneas celulares de carcinoma hepatocelular condujo a la disminución de la proliferación e invasión del tejido. Los ensayos de luciferasa en dichas células revelaron como diana directa del miR-138-5p a la SOX9 (*sex determining region Y related high mobility group box 9*). El SOX9 es un factor de transcripción implicado en procesos como la condrogénesis, desarrollo del epitelio respiratorio, diferenciación de los melanocitos y la diferenciación de células intestinales (298).

hsa-miR-101-3p: este microARN se localiza tanto en el cromosoma 1 como en el cromosoma 9 y su secuencia es UACAGUACUGUGUAACUGAA. La expresión disminuida en nuestras muestras de COCE, concretamente 2,26 veces menor comparada con muestras de tejido sano, coincide con el resto de los estudios sobre este miR en procesos cancerosos.

En el cáncer de mama este microARN ha sido estudiado como supresor tumoral ya que su expresión se ha encontrado disminuida en líneas celulares al contrario que su diana la AMPK (*AMP- activated protein kinase*), que juega un papel clave en la regulación del metabolismo energético celular y cuya expresión aumentada conduce al aumento de la captación de glucosa, a la glucólisis, y la tumorigénesis. La afinidad del miR-101-3p por la AMPK ha sido demostrada por ensayos de luciferasa (299).

En el carcinoma adenoide quístico de las glándulas salivales la función de este microARN ha sido estudiada en líneas celulares. La expresión ectópica del miR-101-3p produjo una represión en la invasión, proliferación y formación de colonias. En el mismo estudio hallaron las posibles dianas como son la Pim-1, oncogén estudiado en las funciones del ciclo celular, y otras proteínas, como la Survivin, Cyclin D1 y beta-catenina, cuya sobre expresión se observó cuando la expresión del miR-101-3p disminuía (300).

Otra de las dianas estudiadas para este microARN es la COX-2 (ciclooxigenasa 2), encargada de la producción de las prostaglandinas en procesos inflamatorios, cuya expresión en líneas celulares en el carcinoma de células escamosas de esófago se encuentra aumentada. Los ensayos con luciferasa han demostrado esta relación y la sobre expresión del miR-101-3p condujo a la disminución de la COX-2 así como al cese del crecimiento celular (301).

hsa-miR-23b-5p: localizado en el cromosoma 9 este miR cuenta con 22 nucleótidos, su secuencia es UGGGUUCCUGGCAUGCUGAUUU y su expresión en nuestro análisis ha sido inferior en muestras de COCE (*fold change* = -2,06) comparadas con tejido sano.

Las investigaciones de este microARN en el COCE han demostrado una función de supresión tumoral y una de las dianas sugeridas para el miR-23b-5p es la PAR-2 (*protease-activated receptor-2*) estudiada en la modulación de la respuesta inflamatoria y regulación de la inmunidad innata y adaptativa (302).

En los trabajos de expresión diferencial con microarrays en el cáncer gástrico y en el adenocarcinoma de esófago la expresión del miR-23b-5p se halló disminuida con respecto a los controles sanos (208, 303).

hsa-miR-7641: microARN localizado en el cromosoma 11 con una secuencia de 19 nucleótidos, UUGAUCUCGGAAGCUAAGC, presentó una expresión disminuida en las muestras de COCE (*fold change* = -3,59) comparadas con controles sanos.

Un estudio sobre los microARNs en exosomas de líneas celulares de cáncer de colon, hallan este microARN en todas las vesículas extracelulares (304). La diana estudiada mediante herramientas de bioinformática y ensayos de luciferasa del miR-7641 fue la CXCL1 (*growth regulated alpha protein*) una proteína conocida por promover la neo vascularización y relacionada con la angiogénesis en células mesenquimales normales (305).

hsa-miR-494-3p: microARN de 22 nucleótidos, UUGAUCUCGGAAGCUAAGC, y localizado en el cromosoma 14. En otros estudios de COCE este microARN induce senescencia celular y aumenta la radio sensibilidad en líneas celulares, catalogándolo así como un supresor tumoral, resultados que coinciden con los nuestros (*fold change* = -2,23). Una de las dianas que se le atribuyen es la Bmi1 (*B lymphoma Mo-MLV insertion region 1 homolog*) requerida para mantener el estado de represión transcripcional de muchos genes mediante la remodelación de cromatina y modificación de histonas (306).

El efecto del miR-494-3p en líneas celulares de carcinoma de células escamosas laríngeos, fue estudiado por el grupo de Geng et al. concluyendo que no influía ni en la migración ni en la invasión celular (307).

La presión ejercida en líneas celulares pre osteoblásticas inhibe la proliferación celular, el análisis de microARNs tras la aplicación de fuerza durante 24 horas y el análisis de expresión diferencial con microarrays reveló una disminución de las proteínas FGFR2 (*fibroblast growth factor receptor 2*) y ROCK1 (*rho-associated coiled-coil kinase 1*) a la vez que se produjo un aumento de la expresión del miR-494-3p, lo que después se comprobó con ensayos de luciferasa revelando que tanto la FGFR2 como la ROCK1 son dianas directas de este microARN (308). La FGFR2 ha sido estudiada en el COCE, concretamente en un estudio de expresión diferencial entre 72 lesiones pre malignas, 108 de COCE y 52 muestras de pacientes sanos, como biomarcador de transformación maligna de lesiones orales potencialmente cancerosas (309).

Si bien en el cáncer de próstata la expresión de este microARN parece estar relacionado con la supresión de la proliferación, invasión y migración celular (310), en el glioblastoma este microARN aparece como sobre expresado y su potencial oncogénico se ha asociado a su diana, el supresor tumor PTEN (311).

hsa-miR-139-5p: es un microARN que se localiza en el cromosoma 11, tiene un total de 23 nucleótidos y su secuencia es UCUACAGUGCACGUGUCUCCAGU. La expresión disminuida de este microARN en nuestras muestras de COCE (*fold change* = -2,35) coincide con otros estudios del carcinoma de células escamosas de lengua (146).

Este microARN ha sido analizado en diferentes tumores, así como sus posibles dianas. En el carcinoma de células escamosas de esófago los estudios de expresión diferencial con pacientes comparado con muestras de tejido adyacente sano, mostraron una expresión disminuida del miR-139-5p y la diana estudiada en el mismo trabajo fue la NR5A2 (*Nuclear receptor subfamily 5 group A member 2*) la cual juega un papel importante en el desarrollo embriológico (312). En líneas celulares de cáncer de vejiga se ha visto que la diana directa de este microARN es la MMP11 y que la expresión aumentada del miR-139-5p condujo a la inhibición de la migración e invasión celular (313). En líneas celulares del cáncer colo rectal, la expresión del miR-139-5p inhibió la EMT, aumentó la sensibilidad a la quimioterapia y

disminuyó la expresión de la BCL2 (*apoptosis regulator Bcl-2*) la cual regula la muerte celular controlando la permeabilidad de la membrana mitocondrial (257). El estudio en modelos animales de ratones *knock-out* para este microARN observó la expresión aumentada de NF-kB, MAPK y STAT3 que promovieron la inflamación intestinal y cáncer colo rectal (314). En líneas celulares de cáncer de pulmón la expresión del miR-139-5p inhibió la proliferación celular y causó apoptosis actuando sobre el oncogén c-Met (315), aunque otros estudios sobre el mismo tipo de células señalan a la IGF1R (*insulin-like growth factor 1 receptor*) como la diana de este microARN (316). Utilizando líneas celulares de glioblastoma multiforme el grupo de Yue et al. reveló que el miR-139-5p actuaba como un supresor tumoral inhibiendo la expresión de la ZEB1 (*Zinc finger E-box-binding homeobox 1*) y la ZEB2 los cuales son grandes reguladores de la metástasis tumoral (317).

En el cáncer de mama la expresión disminuida de este microARN se ha relacionado con tumores agresivos (318) y en el de colon con tumores de pronóstico pobre (319).

hsa-miR-885-3p: este microARN de 22 nucleótidos se localiza en el cromosoma 3 y su secuencia es AGGCAGCGGGGUGUAGUGGAUA. La expresión en nuestro estudio fue de 2,4 veces mayor en las muestras con COCE comparadas con los controles. La sobre expresión de este microARN también se ha visto en entidades malignas como el mesotelioma (320).

En líneas celulares de cáncer de colon este microARN parece favorecer la angiogénesis actuando sobre la proteína BMPR1A (*bone morphogenetic protein receptor type-1a*), la cual a su vez regula factores pro angiogénicos (321).

hsa-miR-146b-5p: este microARN localizado en el cromosoma 10 cuenta con 22 nucleótidos y su secuencia es UGAGAACUGAAUCCAAGGCU. En nuestro estudio la expresión fue de 2,19 veces mayor en las muestras de COCE. El grupo de Xiao et al. halló aumentada la expresión de este microARN cuando comparaban leucoplasias orales que se transformaron en malignas con leucoplasias orales que permanecieron sin cambios con el paso del tiempo (322). En el carcinoma papilar tiroideo la sobre expresión del miR-146b-5p favoreció la migración y la invasión tumoral (323), y en el osteosarcoma la metástasis y la quimio resistencia (324).

Quizá uno de los datos más interesantes sobre este microARN es que su expresión en tejido adyacente a tumores gástricos extirpados predijo la recaída y la pobre supervivencia de los pacientes junto con la disminución de su diana NOVA1 (*RNA-binding protein nova-1*) (325).

El grupo de Zhang et al. utilizó micro vesículas para transportar este microARN y distribuirlo en líneas celulares hematopoyéticas observando que ello conducía a desarrollar leucemia y que la diana sobre la que actuaba era el supresor tumoral NUMB (*protein numb homolog*) (326).

Una excepción en la expresión diferencial la vemos en los tumores de gliomas donde el miR-146b-5p fue positivamente relacionado con la supervivencia en pacientes y, en líneas celulares, se observó una disminución de la proliferación celular y un aumento de la apoptosis actuando sobre la diana TRAF6 (*TNF receptor-associated factor 6*) (327).

hsa-miR-5585-3p: este microARN de 22 nucleótidos se localiza en el cromosoma 1 y su secuencia es CUGAAUAGCUGGGACUACAGGU. La expresión de este miR fue de 2,35 veces superior en muestras con COCE. La expresión de este microARN se ha relacionado con una supervivencia más corta en pacientes con glioblastoma (328).

hsa-miR-19a-3p: este microARN de 23 nucleótidos ha presentado una expresión 3,23 menor en las muestras de COCE. Se encuentra en el cromosoma 13 y su secuencia es UGUGCAAUUCUAUGCAAACUGA.

En el cáncer de mama el silenciamiento de este miR aumentó la proliferación celular (329) coincidiendo con otros estudios donde la expresión aumentada del miR-19a-3p en líneas celulares de cáncer de mama inhibió la progresión y metástasis celular actuando sobre el oncogén Fra-1 (*fos related antigen 1*) (330).

En un estudio con microarrays sobre expresión diferencial de microARN en muestras de linfoma folicular en la población china, este microARN también ha mostrado una expresión aumentada (331). Así como en estudios de expresión diferencial con qRT-PCR de cáncer de colon (332).

Una de las dianas estudiadas para este microARN fue la 5-lipooxigenasa. Gracias a ensayos de luciferasa se ha comprobado que es una de las dianas directas del miR-19a-3p, así como del miR-125b-5p (333). Esta proteína funciona como mediador de procesos inflamatorios y es clave para la síntesis de leucotrienos. Los estudios con líneas celulares de cáncer de cabeza y cuello han revelado a la 5-lipooxigenasa como una posible nueva estrategia para el tratamiento del cáncer, ya que la expresión aumentada de ésta inhibió la proliferación celular (334).

hsa-miR-135a-3p: este microARN de 22 nucleótidos presentó una expresión 2,31 veces mayor en el grupo de los casos, se localiza en el cromosoma 3 y su secuencia es UAUAGGGAUUGGAGCCGUGGCG. Ha sido estudiado en líneas celulares de cáncer gástrico utilizando la tecnología de microarrays y, comparado con líneas celulares gástricas normales, el miR-135a-3p presentaba una expresión disminuida (335).

hsa-miR-3934-5p: este microARN de 22 nucleótidos está localizado en el cromosoma 6 y su secuencia es UCAGGUGUGGAAACUGAGGCAG. En nuestro estudio la expresión de este microARN fue de 2,82 veces mayor en el grupo de las muestras de casos en comparación con los controles sanos. El único estudio que hemos hallado sobre este microARN utiliza las herramientas bioinformáticas e hipotetiza un posible efecto antiviral contra la infección del MERS-Cov responsable del Síndrome Respiratorio por coronavirus de Oriente Medio (336).

Nuestro estudio de expresión diferencial reveló un total de 40 microARNs desregulados de los que no hemos encontrado información publicada en la base de datos del miR Pub 3.0.

La identificación de nuevos microARNs se lleva a cabo mediante herramientas de bioinformática tras el uso de tecnología de ultrasecuenciación identificando la ya nombrada forma de horquilla del pre-miARN (Figura 48) en el genoma (337) aunque una de las limitaciones de esta herramienta es que a la hora de identificar las terminaciones 3' y 5' de las regiones no codificantes puede no ser fiable. Después, es necesario corroborar estos resultados bioinformáticos con otros métodos de medición de expresión como son qRT-PCR o

microarrays (338). Los nuevos microARNs también pueden ser descubiertos mediante métodos basados en secuencias homólogas de miARNs conservados, teniendo en cuenta los miARNs maduros de secuencias conservadas en otras especies, o algoritmos desarrollados para predecir nuevos miARNs que luego son corroborados por análisis bioinformáticos (339).



Figura 48. Extraída del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) para el hsa-miR-664a donde se pueden apreciar las dos hebras en el genoma que darían lugar a la forma de horquilla.

Ladewig et al. realizaron un meta análisis de la base de datos de los estudios de ultrasecuenciación en ratones y humanos del cual salieron varios de nuestros microARNs (340) (Tabla 19).

MicroARN	Localización	Secuencia
Hsa-miR-6746-5p	Cromosoma 11	CCGGGAGAAGGAGGUGGCCUGG
Hsa-miR-6825-5p	Cromosoma 3	UGGGGAGGUGUGGAGUCAGCAU
Hsa-miR-5196-5p	Cromosoma 19	AGGGAAGGGGACGAGGGUUGGG
Hsa-miR-7111-5p	Cromosoma 6	UGGGGGAGGAAGGACAGGCCAU
Hsa-miR-6870-5p	Cromosoma 20	UGGGGGGAGAUGGGGGUUGA
Hsa-miR-6765-5p	Cromosoma 14	UGAGGCGGGGCCAGGAGGGUGUGU
Hsa-miR-6805-5p	Cromosoma 19	UAGGGGGCGGCUUGUGGAGUGU
Hsa-miR-6780b-5p	Cromosoma 6	UGGGGAAGGCUUGGCAGGGAAGA
Hsa-miR-6801-5p	Cromosoma 19	UGGUCAGAGGCAGCAGGAAUUGA
Hsa-miR-6753-3p	Cromosoma 11	UGGUCUGUCUCUGCCCUGGCAC
Hsa-miR-6838-5p	Cromosoma 7	AAGCAGCAGUGGCAAGACUCCU
Hsa-miR-6868-5p	Cromosoma 17	ACUGGCAGAACACUGAAGCAGC

Hsa-miR-6738-5p	Cromosoma 1	CGAGGGGUAGAAGAGCACAGGGG
Hsa-miR-6877-3p	Cromosoma 9	CAGCCUCUGCCCUUGGCCUCC
Hsa-miR-6754-39	Cromosoma 11	UCUUCACCUGCCUCUGCCUGCA

Tabla 19. MicroARNs desregulados en nuestro estudio descubiertos por Ladewig et al. donde se puede ver su secuencia y su localización.

El hsa-miR-6510-3p fue descubierto en un estudio de ultrasecuenciación con la plataforma Illumina® GAIIX, para analizar la expresión diferencial de 47 muestras con psoriasis y 20 pacientes sanos. Este microARN fue localizado en el cromosoma 17 y su secuencia es CACCGACUCUGUCUCCUGCAG (341).

El hsa-miR-664a-3p y el hsa-miR-1295a fueron descubiertos analizando muestras de células madre de tejido embrionario en comparación con células diferenciadas con la tecnología de ultrasecuenciación Illumina® (342). El miR-664a-3p se localiza en el cromosoma 1 y su secuencia es UAUUCAUUUAUCCCCAGCCUACA. El miR-1295a se localiza también en el cromosoma 1 y su secuencia es UUAGGCCGCAGAUCUGGGUGA.

El hsa-miR-5580-3p fue descubierto con el uso de un nuevo algoritmo que desarrolló el grupo de Friedländer et al. con la intención de facilitar el manejo de los datos que derivan del uso de la tecnología de ultrasecuenciación. Con ánimo de demostrar la eficacia del algoritmo, los microARNs descubiertos fueron posteriormente corroborados con líneas celulares midiendo su expresión (337). Este microARN presentó una expresión especialmente baja en el grupo de COCE en comparación con los controles, concretamente 23 veces menor, se localiza en el cromosoma 1 y su secuencia es CUGAAUAGCUGGGACUACAGGU.

El miR-8072 se localiza en el cromosoma 12 su secuencia es GGCGGCGGGGAGGUAGGCAG. Fue descubierto en un estudio de ultrasecuenciación de Solexa®. Analizaron la expresión diferencial de los pacientes con sepsis en la unidad de cuidados intensivos y los agruparon en supervivientes y no supervivientes. Los microARNs nuevos que surgieron de este estudio fueron posteriormente corroborados con qRT-PCR (343).

El análisis de expresión diferencial de muestras de cáncer de mama y tejido adyacente reveló nuevos microARNs entre los que están hsa-miR-4788, hsa-miR-4706 y el hsa-miR-3659. En este estudio los autores revelan que sus resultados sugieren que la identidad de un tumor está más relacionada con la expresión desregulada de microARNs que normalmente se expresan en el tejido específico que la expresión de un biomarcador concreto (344). El miR-4788, cuya secuencia es UUACGGACCAGCUAAGGGAGGC, y el miR-4706, cuya secuencia es AGCGGGGAGGAAGUGGGCGCUGCUU, presentaron una expresión mayor en el grupo de los casos que en los controles y se localizan en los cromosomas 3 y 14 respectivamente. El miR-3659, cuya secuencia es UGAGUGUUGUCUACGAGGGCA presentó una expresión 3,3 menor en los pacientes con COCE y se localiza en el cromosoma 1.

El hsa-miR-6126, también conocido como hs_154, fue descubierto en líneas celulares infectadas por el virus *West Nile* cuando estudiaban el efecto que los microARNs tienen sobre la expresión de determinados genes de este virus (345). El miR-6126 se localiza en el cromosoma 16 y su secuencia es GUGAAGGCCCGGCGGAGA.

En un estudio de expresión diferencial de microARNs de células B normales y malignas usando ultrasecuenciación surgieron nuevos microARNs entre los que están el miR-4442, miR-4443 y miR-4495 (346), los cuales aparecen todos sobre expresados en las muestras con COCE. El miR-4443, cuya secuencia es UUGGAGGCGUGGGUUUUU, y el miR-4442, cuya secuencia es GCCGGACAAGAGGGAGG, se localizan en el cromosoma 3 mientras que el miR-4495, cuya secuencia es AAUGUAAACAGGCUUUUUGCU, se localiza en el cromosoma 12.

El hsa-miR-3911 y el hsa-miR-3180 fueron descubiertos en un estudio de ultrasecuenciación cuando analizaban los microARNs de tejido de ovario sano y tejido de cáncer de ovario (347). El miR-3180, cuya secuencia es UGGGGCGGAGCUUCCGGAG, se encuentra en el cromosoma 16 y el miR-3911, cuya secuencia es UGUGUGGAUCCUGGAGGAGGCA, se encuentra en el cromosoma 9.

El hsa-miR-365-5p, hsa-miR-758-3p y el hsa-miR-30c-1-3p son microARNs que se descubrieron en un estudio tras secuenciar librerías de muestras de distintos tejidos de células humanas y aplicando una nueva fórmula computacional (348). El miR-365-5p, cuya secuencia es AGGGACUUUCAGGGGCAGCUGU se localiza en el cromosoma 17, el miR-758-3p, cuya secuencia es UUUGUGACCUGGUCCACUAACC, en el cromosoma 14, y el miR-30c-1-3p, cuya secuencia es CUGGGAGAGGGUUGUUUACUCC, en el cromosoma 1.

En un estudio con ultrasecuenciación utilizando el Illumina's Genome Analyzer II (Illumina®) en líneas celulares de melanoma y en melanocitos se descubrieron nuevos microARNs entre los que estaban el hsa-miR-548w y el hsa-miR-514b-5p (349). El miR-548w, cuya secuencia es AAAAGUAAACUGCGGUUUUUGCCU se encuentra en el cromosoma 16, y el miR-514b-5p cuya secuencia es UUCUCAAGAGGGAGGCAAUCAU, se localiza en el cromosoma X.

El hsa-miR-874-5p fue descubierto en el análisis de expresión de microARNs utilizando 6 líneas celulares de cáncer de cuello de útero (350). Este microARN tuvo una expresión 2,96 veces inferior en las muestras de COCE comparadas con los controles sanos, se localiza en el cromosoma 5 y su secuencia es CGGCCCCACGCACCAGGGUAAGA.

El hsa-miR-6086 es un microARN localizado en el cromosoma X cuya secuencia es GGAGGUUGGGAAGGGCAGAG. Este microARN fue descubierto analizando los microARNs de células madre en diferenciación. En la figura 49 se puede ver el trabajo que realiza la herramienta utilizada en este estudio, el programa *RNAfold*, buscando en el genoma el microARN en cuestión (351).



Figura 49. El programa *RNAfold* busca la secuencia madura en el genoma, subrayada de color gris, y lo identifica como microARN si puede formar la estructura de horquilla (351).

El hsa-miR-3937 localizado en el cromosoma X y cuya secuencia es ACAGGCGGCUGUAGCAAUGGGGG, fue descubierto por primera vez por un grupo que analizaba los microARNs en el núcleo de la célula y en el citoplasma mediante ultrasecuenciación para corroborar el origen nuclear de los microARNs (352).

El hsa-miR-7846-3p fue descubierto cuando se secuenciaron los microARNs de plaquetas (353). Este microARN se localiza en el cromosoma 1 y su secuencia es CAGCGGAGCCUGGAGAGAAGG.

El hsa-miR-7162-3p se localiza en el cromosoma 10, su secuencia es UCUGAGGUGGAACAGCAGC y fue descubierto por el grupo Meunier et al., quien estudió microARNs en mamíferos y luego trasladaron sus secuencias al genoma humano para comprobar su existencia (354).

En la era del *big data* donde las bases de datos son accesibles (miRBase), la información es abundante y en ocasiones no muy ordenada. La clasificación y anotación de microARNs tiene varias formas para un mismo microARN lo que genera duplicidad de datos innecesarios. La falta de consenso, o más bien la evolución sin consenso, de las anotaciones de microARNs, hace que el análisis de un miARN requiera mucho cuidado y control exhaustivo del manejo de cada dato. Una de las dificultades que autores como Budak et al. identifican a la hora de registrar un microARN es que los isomiRs, que provienen de la misma secuencia, pero con distinto corte de maduración, son considerados como microARNs diferentes en la base de datos creando una plétora de microARNs que no es real. Varios autores ven necesaria una revisión de la nomenclatura de los miARNs y un ordenamiento del mismo (339).

5.4 Asociación de miARNs con las variables tumorales

Las alteraciones de microARNs se han asociado con diferentes fenotipos clínicos específicos de tumores tales como recurrencia y progresión, desarrollo de metástasis, y supervivencia post-operatoria (6). Hay estudios de COCE que no muestran diferencia en la expresión del microARN en función de la raza, consumo de tabaco o alcohol, sexo o afectación de VPH (virus del papiloma humano) (355). Otros autores encuentran microARNs diferentemente expresados según el sexo, quimio resistencia o índice de masa corporal (8, 147).

Además del análisis de expresión diferencial de casos y controles, hemos querido analizar las muestras para hallar asociación en la expresión de microARNs con las distintas características ya observadas por autores anteriores. Por lo tanto, hemos comparado la expresión entre tumores de estadio II y IV y controles sanos, así como muestras entre hombres y mujeres y muestras control, y carcinoma de lengua y muestras de pacientes libres de tumor.

En el estudio de Scapoli et al. analizan con microarrays la expresión diferencial de microARNs en el COCE de 8 pacientes sin metástasis y 7 pacientes con metástasis. Hallan un total de 19 microARNs desregulados significativamente, 13 sobre expresados (miR-489, miR-129, miR-23a, miR-214, miR-23b, miR-92, miR-25, miR-210, miR-212, miR-515, miR-146b, miR-21, miR-338) y 6 infra expresados (miR-520h, miR-197, miR-378, miR-135b, miR-224, miR-34a). Ninguno de estos microARNs aparece desregulado al comparar muestras de COCE de estadio IV con controles (126).

Carvalho et al. identificaron el miR-205 y el miR-203 como marcadores precisos para detectar metástasis (356). Como se observa no coincide con los resultados de Scapoli et al. y al compararlo con nuestros resultados vemos necesaria la precisión de la hebra de los microARNs identificados por Carvalho et al. ya que el miR-205-3p y el miR-205-5p presentan una expresión mayor en los casos de estadio IV comparados con los controles. Sin embargo, por la falta de especificación 3p ó 5p no podemos establecer una coincidencia.

La expresión del miR-29b está positivamente relacionada con estadios avanzados y pobre supervivencia en pacientes con COCE en el estudio de Yang et al. (357), sin embargo, en nuestro trabajo este microARN no aparece desregulado.

La disminución de determinados microARNs como el miR-206 (358) en el COCE estuvo significativamente relacionada con metástasis nodular y características clínico patológicas agresivas y pobre supervivencia. Otro ejemplo son los microARNs miR-205 y let-7d cuya baja expresión se asocia con ocurrencia loco-regional y una supervivencia menor (72). Ninguno de estos datos coincide con los nuestros o con los de Scapoli et al.

Aquellos estudios que han hallado diferencias de expresión entre hombres y mujeres apuntan a una expresión mayor del let-7d en hombres comparado con mujeres, resultado que no coincide con el nuestro (13). Otros estudios como el de Duttagupta et al. encontraron cuatro microARNs significativamente sobre expresados en el grupo de las mujeres en comparación con el de hombres, el miR-584-3p, miR-1323, miR-940 y miR-923, así como tres microARNs cuya expresión fue mayor en hombres que en mujeres, el miR-100, miR-184 y miR-923. Nosotros no hemos hallado expresión diferencial para ninguno de estos microARN al comparar las muestras de hombres con las de mujeres.

El escaso número de muestras y las múltiples variables no han hecho posible la relación entre un microARN y una variable determinada, pero hemos realizado dichos análisis para comparar resultados con los de otros estudios simplemente por ver similitudes.

Debido a la diferencia entre los resultados de expresión diferencial de microARNs para detectar personas con cáncer oral o características asociadas a determinados microARNs, no podemos dejar de nombrar otros artículos que hablan de variaciones epigenéticas como son los polimorfismos o las metilaciones en los promotores de determinados microARNs.

Los polimorfismos son la variación de nucleótidos en una parte específica del ADN que afecta por lo menos al 1% de la población. Los SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) son el tipo de variación más común en el genoma humano, que afecta a las secuencias codificantes y puede influir en la diversidad de población, susceptibilidad a la enfermedad y respuesta individual a los medicamentos. Dichos SNPs pueden alterar la expresión y/o maduración de los microARNs bien modificando la transcripción en el transcrito primario, en el procesamiento de pri-miARN y pre-miARN y afectando a la interacción miARN-mARN (359). Los estudios sobre polimorfismos han hallado SNPs en el miARN-499 asociado con metástasis en el COCE (360), así como un SNP en el pre-miR-146 que se ha asociado con la progresión del cáncer oral (115).

Los SNPs en los genes que afectan a la maquinaria de producción de microARNs han sido estudiados en cáncer de cabeza y cuello en proteínas como DICER o AGO, asociando dichos SNPs al riesgo de padecer cáncer de cabeza y cuello (23, 361).

La metilación de los promotores emite una señal que es fácil de detectar y la metilación diferencial ha sido estudiada en el cáncer de cabeza y cuello en comparación con el tejido normal sano, como en el caso del promotor del miR-9 (66). Los aumentos de los niveles de metilación del miR-137 fueron relacionados con tasas bajas de supervivencia en el COCE por el grupo de Wiklund (147).

5.5 Dianas de los microARNs en el COCE

La regulación genética postranscripcional llevada a cabo por microARNs es compleja. Cada ARN mensajero puede ser regulado por diferentes microARNs y un microARN puede actuar sobre diferentes mARNs (362). Además, la función oncogénica o supresora tumoral de cualquier miARN puede variar, un mismo miARN puede estar implicado en distintas vías y contribuir a diferentes efectos biológicos en distintos tipos celulares (20).

En la revisión de Min et al. (129) se recopilan los miARNs asociados con genes en el carcinoma oral de células escamosas y en el cáncer de cabeza y cuello. Si bien los microARNs no coincide ninguno con nuestros resultados, sí algunas dianas como la PDCD4, CD44, IGF1R, MYC, MMP2, MMP9, mTOR o Akt (Tabla 20).

miARN	Sobre expresado (+) / Infra expresado (-)	Dianas / Mecanismos moleculares
-------	---	---------------------------------

miR-21	(+)	PDCD4, TPML, RECK, CLU, DKK2-Wnt/beta-catenin, Smad7-TGF-beta1, HA/CD44-Nanog/Stat3-PDCD4,IAPs
miR-31	(+)	FIH-HIF-EVGF
miR-31*	(+)	FGF3, RhoA
miR-134	(+)	WWOX
miR-146a	(+)	IRK1, TRAF6, NUMB
miR-155	(+)	CDC73
miR-7	(+)	RECK, IGF1R-Akt
miR-9	(-)	CXCR4- Wnt/beta-catenin
miR-17/20a	(-)	ITGbeta8
miR-29a	(-)	MMP2
miR-34	(-)	F2F3, survivin, VEGF, SERT6
miR-99a	(-)	IGF1R
miR-124	(-)	ITGB1
miR-125b	(-)	ICAM2
miR-138	(-)	FOSL1, VIM, ZEB2, EZH2, RhoC, RoCK2
miR-140-5p	(-)	ADAM10, ERBB4, PAX6, LAMC1
miR-145	(-)	c-Myc, Cdk6
miR-181a	(-)	K-ras, Twist1
miR-205	(-)	IL-24, caspase-3/-7, Axin-2
miR-218	(-)	mTOR-Rictor-Akt
miR-320	(-)	HIF-1alpha-NRP1-VEGF
miR-357	(-)	CIP2A-MYC, AEG-1/MTDH
miR-419-5p	(-)	GIT1, EGFR-ERK1/2-MMP2/9
miR-483-3p	-	AP15, BRIC5, RAN
miR-196a	(+)	MAMDC2
miR-26a/b	(-)	TMEM184B

Tabla 20. Extraída de la revisión de Min et al., esta tabla especifica la expresión desregulada de cada microARN y sus dianas o mecanismos moleculares sobre los que influye.

La transformación maligna del tejido se produce por un cúmulo de cambios en estadios específicos y no por eventos aislados. Así, el grupo de Janiszewska et al. presenta en su revisión un modelo progresivo sobre desarrollo del carcinoma oral en cabeza y cuello y sus moléculas implicadas y reguladas por microARNs (Figura 50) (15).

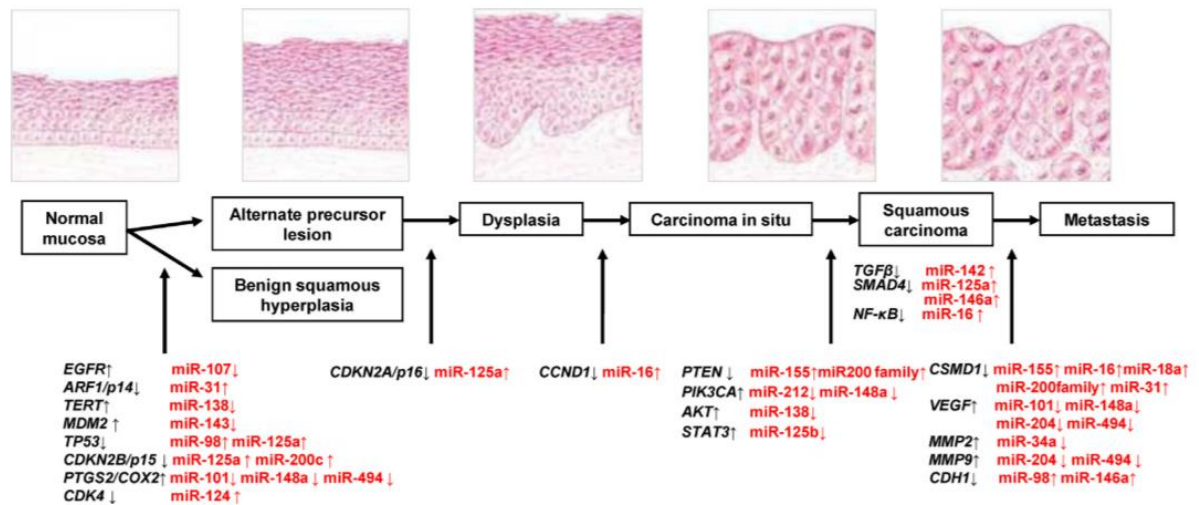


Figura 50. En esta imagen se puede observar como la expresión de los microARNs, con sus dianas, en diferentes momentos del desarrollo tumoral afectan a la progresión del mismo (15).

Para los microARNs cuyas dianas no se conocían, usamos la herramienta *MR-microT de Diana Tool* (disponible en http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index, acceso el 30 de septiembre de 2016) pero los resultados para un solo microARN era de cientos de dianas, por lo que se requiere un análisis bioinformático más profundo con comprobación experimental posterior, cosa que no es objetivo de este trabajo.

En el estudio de Ren et al. analizan el efecto del microARN-139 en líneas celulares de cáncer de lengua Tca8113. Dicho microARN regula el cáncer mediante el mecanismo de señalización Akt inhibiendo la proliferación celular de las líneas celulares del cáncer oral. En nuestro trabajo el microARN-139 también aparece infra expresado en las muestras de los casos (*fold change* = -3,7, *p* = 0,003268) (255).

El PDCD4 es un gen relacionado con la muerte celular programada, es un inhibidor de la transformación neoplásica, estudiado como diana del miR-21 (15), revelando así su efecto oncogénico. En nuestros resultados aparece como dianas del miR-497-5p y el miR-204-5p, ambos infra expresados en las muestras de COCE.

El CD44 es gen diana de los microARNs 497-5p y 27b-3p, es una glucoproteína de superficie implicada en las interacción, proliferación, diferenciación, migración celular y angiogénesis. La sobre expresión de esta proteína se ha relacionado con el cáncer en general y en particular como un marcador de iniciación tumoral medible en saliva. Y su concentración ha sido estudiada como marcador de riesgo de cáncer oral (114, 363). Por lo tanto, la infra expresión de dichos microARNs, patente en nuestros resultados, dispararía la expresión del CD44.

El IGF1R (*insuline like growth factor 1 receptor*) es una proteína que se halla en la superficie celular, es un receptor transmembrana activado por dos hormonas, la IGF1 y la IGF2. Su función está relacionada con el crecimiento tisular. Ha sido estudiada en el cáncer debido a sus propiedades antiapoptóticas que le confieren resistencia al cáncer ante determinados

quimioterápicos. También ha sido de gran interés científico su relación con los microARNs y el cáncer oral, en especial con la familia microARN-99 (128, 363). En nuestro análisis se revela como diana de los microARNs miR-497-5p y miR-99a-5p, este último coincidiendo con estudios anteriores.

El MYC pertenece a una familia de oncogenes estudiados en el cáncer cuya función estimula el crecimiento permitiendo el paso durante el ciclo celular de la fase G0/ G1 a la S. Se ha estudiado como diana del miR-357 en el cáncer oral, y en nuestro análisis de dianas tanto el miR-497-5p como el miR-1224-5p, que aparecen infra expresados, pueden inhibir la traducción de dicho gen (20).

Las matrices metaloproteinasas (MMP) MMP1, MMP2, MMP3 y MMP9 son proteínas observadas a altas concentraciones en tejido canceroso de COCE (61). Su participación consiste en la degradación de la matriz extracelular y su aumento se ha asociado con metástasis e invasión tumoral (62). En nuestro caso tanto la MMP2 como la MMP9 son dianas de un mismo microARN infra expresado, el miR-497-5p, aunque otros autores las relacionan con el miR-29a como diana de la MMP2 (61).

5.6 Mecanismos moleculares de los microARNs desregulados

El *KEGG Pathway* (*Kyoto Encyclopedia of Gene and Genomes*) es una colección de mapas de mecanismos que representan nuestro conocimiento en la interacción molecular y redes sobre el metabolismo, procesamiento de la información genética (transcripción, traducción, etc.), procesamiento de la información del desarrollo (transporte de membrana, transducción de la señal, interacciones de las señales moleculares), procesos celulares (motilidad y crecimiento celular, transporte, catabolismo, etc.), sistemas del organismo (sistema inmune, sistema nervioso, digestivo, etc.), enfermedades humanas, desarrollo de drogas y/o medicamentos (interacciones moleculares de antibióticos, neoplásicos, etc.).

En la base de datos del KEGG Pathway (<http://www.kegg.jp/kegg/kegg2.html>, acceso el 30 de septiembre de 2016) podemos hallar microARNs relacionados con el cáncer, en humanos, de pulmón, esofágico, hepatocelular, de mama, de ovario y de vejiga, sin embargo, ni el de cabeza y cuello ni el carcinoma oral de células escamosas tiene un mecanismo publicado como tal de microARNs y sus dianas (acceso el 30 de septiembre de 2016).

Después de analizar la expresión diferencial de los microARNs usamos el miRPath v3.0. Este software analiza los microARNs introducidos buscando los genes a los que puede afectar y los mecanismos moleculares en los que puede estar implicado, utilizando los mapas del KEGG.

Muchos de los miARNs desregulados en nuestro trabajo son recientes y todavía no hay investigaciones sobre sus posibles dianas o los efectos que produce su expresión en el tejido. En nuestro estudio, de los 18 microARNs desregulados con mayor valor de significancia ($p \leq 0,001$) sólo 6 tenían dianas conocidas, todos infra expresados. Los resultados con dichos microARNs han revelado varias vías en las que sus dianas están implicadas, entre los que se hallaban los proteoglicanos en el cáncer, el mecanismo de señalización Hippo, el procesamiento de las proteínas en el retículo endoplásmico, mecanismo de señalización de la hormona tiroidea, mecanismo de señalización TGF-beta, mecanismo de señalización mTOR, uniones de

adherencia, adhesión focal, mecanismo de señalización de AMPK, p53, insulina FoxO, HIF-1 y esfingolípidos. Esto confirma la asociación entre los miARNs infra expresados y los oncogenes.

Los proteoglicanos son el constituyente principal del tejido conectivo que en condiciones fisiológicas presentan carga negativa gracias a sus grupos sulfato y ácido urónico. Los tipos principales de proteoglicanos son el queratán sulfato, heparán sulfato, ácido hialurónico, condroitín sulfato y dermatán sulfato. Podemos encontrarlos unidos a la membrana plasmática o a la matriz extracelular, que presenta sitios de unión a determinadas moléculas, permiten la movilidad y migración de las células además de filtrar sustancias que pueden ser transportadas al interior de la misma. Otra de sus funciones es resistir la compresión y retrasar o impedir el movimiento de células tumorales y microorganismos. Los proteoglicanos en el microambiente tumoral han mostrado ser macromoléculas clave que contribuyen al desarrollo de distintas características en la progresión del cáncer como son la proliferación, angiogénesis o metástasis. Proteoglicanos como el ácido hialurónico actúa con la proteína CD44 promoviendo la migración y el crecimiento celular del tumor, mientras que otros interactúan con factores de crecimiento y citoquinas conduciendo a la invasión tumoral (364). Proteoglicanos como el Perlecan, que pertenece al grupo de proteoglicanos del heparán sulfato, o el Sulfatase 2 (SULF2), han sido estudiados en el cáncer oral debido a su alta expresión en lesiones cancerosas y precancerosas (365, 366).

El mecanismo de señalización Hippo influye en el tamaño que alcanza un órgano en desarrollo, así como en procesos de proliferación celular y homeostasia. Las modificaciones postranscripcionales de las moléculas que componen el mecanismo de señalización Hippo, como son YAP/TAZ, MAT 1/2 y LATS 1/2, han sido asociados a características clínicas tumorales como un pronóstico pobre o metástasis tumoral (367, 368).

El mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) pertenece a una familia de proteínas que se encarga de controlar el inicio de la transcripción, la formación de ribosomas, la organización del cito esqueleto y de la regulación de la proliferación, crecimiento y muerte celular. El mecanismo de señalización en el que participa el mTOR se ve desregulado en el cáncer mediante la mutación o amplificación de la PI3K, pérdida de función del PTEN o la sobre expresión de otras proteínas como la S6K1, la 4EBP1, o la Akt (369). En el cáncer oral la expresión de Akt se ha relacionado con la disminución del miR-218 (370), en nuestros resultados del miRPath v3.0 el Akt aparece como posible diana también del miR-497-5p y del miR-99a-5p.

El mecanismo de señalización TGF-beta (*Transforming Growth Factor beta*) ha sido estudiado en procesos de crecimiento, diferenciación y proliferación celular. En el cáncer, las moléculas implicadas en este mecanismo parecen estar relacionadas con el proceso de la EMT de la cual ya conocemos su importancia en procesos tumorales (371). La pérdida de la función del receptor del TGF-beta II se ha observado frecuentemente en el COCE y estudios recientes sobre el contenido de exosomas liberados por fibroblastos en el microambiente tumoral, revelan moléculas de TGF beta en su interior, sugiriéndolas así como señales de comunicación entre células (372).

Tal y como hemos explicado a lo largo de este trabajo la proteína p53 juega un papel fundamental en el ciclo celular y en la expresión de algunos microARNs. Como se puede

observar en el esquema de KEGG, varios son los detonantes que activan el gen p53 y en función del gen diana sobre el que éste actúa la consecuencia va desde la apoptosis celular, arresto del ciclo celular, inhibición de la angiogénesis o inhibición del mecanismo de señalización mTOR.

La adhesión focal juega un papel esencial en la motilidad, proliferación, diferenciación y supervivencia celular, así como en la regulación de la expresión de determinados genes. Algunos de los componentes de la adhesión focal participan en la unión estructural entre los receptores de membrana y el cito esqueleto de actina, mientras que otros son moléculas de señalización como las quinasas y fosfatasa. La unión de factores de crecimiento a sus respectivos receptores inician alteraciones morfológicas y modulaciones en la expresión génica demostrando la relación que existe entre la señalización mediada por factores de crecimiento y adhesión (373).

Las uniones de adherencia intercelular son imprescindibles para mantener la arquitectura tisular y la polaridad celular limitando los movimientos celulares y la proliferación. Las moléculas por excelencia en este tipo de uniones son la E-Cadherina y beta catenina, las cuales forman un complejo que suele verse afectado en los procesos metastásicos (374).

Todos estos mecanismos apoyan la teoría de que el COCE se debe a alteraciones genéticas inducidas por el efecto local sobre los queratinocitos, afectando sobre todo a moléculas de adhesión intercelular y componentes de membrana que hacen perder adherencia y facilitan el crecimiento descontrolado (375).

5.7 Aplicaciones de los microARNs

La tendencia terapéutica con microARNs, una vez establecidos los patrones de expresión diferencial en las distintas patologías, consistiría en introducir aquellos microARNs supresores de tumores cuya expresión disminuye en el COCE o inhibir la expresión de microARNs oncogénicos.

El análisis histopatológico no es capaz por sí solo de identificar el comportamiento futuro de los procesos tumorales, de hecho, muchos de ellos iguales desde el punto de vista histológico tienen una evolución clínica distinta. Algunos estudios sugieren que el análisis histopatológico no es capaz de detectar pequeñas metástasis ya presentes en la muestra y se calcula que en torno al 10-40% de pacientes con cáncer de cabeza y cuello acaban desarrollando metástasis que no fue histopatológicamente detectada (356). Otros estudios aseguran que antes de que exista metástasis, el carcinoma primario ya ha desarrollado células tumorales con cambios genéticos asociados con el potencial metastásico (113). La identificación de microARNs sobre expresados exclusivamente en metástasis, permitiría atender de manera temprana a este porcentaje de pacientes, bien con un tratamiento más agresivo o un vaciamiento temprano.

La evidencia acumulada sugiere que un microARN no puede por sí solo ser útil como marcador diagnóstico y pronóstico, pero ofrece competencias para las terapias individualizadas (13). El desarrollo de un proceso tumoral viene precedido del cambio de expresión de la combinación de varios microARNs y no de uno solo. Por lo tanto, parece lógico pensar que para un mismo tipo de tumor pueden existir diferentes patrones de expresión diferencial en función de las dianas o los mecanismos moleculares afectados. Tener un registro, por lo tanto,

de todos aquellos posibles patrones y acceder a ellos de manera libre, acerca la posibilidad de detectar precozmente cualquier tipo de cáncer.

El análisis de expresión diferencial usando microARNs recientemente descubiertos permite llevar a cabo nuevos experimentos sobre tejido oral canceroso con el ánimo de descubrir terapias individualizadas, libres de efectos secundarios, con microARNs. Así, en este estudio experimental realizado en líneas celulares, se identificó 6 microARNs letales (miR-323, miR-345, miR-371, miR-181, miR-342, miR-326) para las células tumorales de cáncer de cabeza y cuello, pero no para los queratinocitos orales (109).

La heterogeneidad característica de tumores malignos hace que un solo marcador pronóstico que identifique pacientes de alto y bajo riesgo no pueda ser usado para cualquier tipo de cáncer (204). Los estudios de marcadores pronósticos de cáncer de cabeza y cuello tienen resultados variados, y a veces contradictorios (150), debidos, precisamente, a los subtipos que presenta; por ello creemos que es necesario establecer patrones específicos de cada tejido y tipo tumoral.

Sabemos que los microARNs, junto con otros ARNs no codificantes, son secretados a los distintos fluidos corporales por las células. Muchos mecanismos fueron propuestos para explicar la entrada de los miARNs en el torrente sanguíneo. Investigaciones recientes han demostrado que la liberación de miARNs en compartimentos extracelulares es mediada por una maquinaria secretora de exosomas dependiente de ceramida. Por lo tanto, dichos complejos lipídicos y lipoproteicos protegen a los microARNs extracelulares de la posible degradación producida por las abundantes ribonucleasas (376). La formación de los exosomas, su contenido y distribución tienen un impacto considerable en el desarrollo del cáncer. Los estudios que analizan los microARNs de pacientes con cáncer, tanto en tejido tumoral como en sangre, revelan que las células tumorales liberan microARNs en dichos exosomas al torrente sanguíneo y que la expresión de los microARNs en sangre semeja a las células de tejido tumoral (208).

El uso de nano vesículas y proteínas transportadoras de ARN mensajeros y pequeños ARNs ha resultado útil para traspasar la membrana celular modificando la expresión proteica de la célula. A esta modificación de la expresión tras la introducción de ARNs en la célula lo denominaron “*exosoma shuttle RNA*” (esRNA) (377). Los microARNs transportados en nano partículas han disminuido con éxito la expresión de determinadas dianas en líneas celulares dando esperanza al uso de estos pequeños ARNs no codificantes como terapias a diversas enfermedades (378).

Las ideas que se barajan actualmente se basan en usar oligonucleótidos anti-microARNs (AMOs) que se unan a secuencias complementarias de microARNs oncogénicos y bloqueen su función. Incluso se podrían utilizar como coadyuvantes de la quimioterapia en aquellos tumores que presentaran un mayor grado de expresión de microARNs resistentes a las drogas (67). Teniendo en cuenta las características del microambiente que rodea a las células tumorales como son un pH bajo, se pueden utilizar nano partículas como los pHLIP (*pH low insertion peptide*) que han demostrado penetrar a través de la membrana celular sin destruirla en condiciones ácidas, con un pH inferior a 7 (379).

El artículo de Piao et al. describe el uso de nano partículas lipídicas de pre-miR-107 en líneas celulares de manera efectiva, consiguiendo inhibir la invasión y migración de las células

(380). Actualmente se podría utilizar la tecnología de las nano partículas de diversa naturaleza para el transporte de microARNs de manera específica y efectiva (14).

Otros estudios analizan qué productos o drogas afectan a determinados microARNs como por ejemplo el grupo de Jiang et al. que revela una benzamina, concretamente la 4-benzoylamino-N-(prop-2-yn-1-yl), como inhibidores del miR-21, sin afectar a otros microARNs ni a procesos biológicos habituales (381).

Actualmente, se utilizan dos microARNs de manera experimental para el tratamiento de patologías, el miR-34 y el miR-122. El miR-34 es un microARN supresor tumoral cuyo uso se encuentra en fase experimental clínica I para el cáncer de hígado (382). El nombre comercial es MRX34 y consiste en un liposoma con el microARN en su interior. Actualmente otros grupos para la leucemia linfocítica crónica también están experimentando con él (16).

El uso de Miravirsén sobre el virus de la hepatitis C se encuentra en fase clínica 2a y cuyos resultados dosis-dependiente han reducido los niveles del virus de la hepatitis C en los pacientes. El Miravirsén es la primera droga que actúa sobre un microARN secuestrándolo, el miR-122, y en recibir la aceptación por la FDA (15).

La profundización en la participación de los microARNs en el cáncer, conocer sus dianas y a que mecanismos moleculares pertenecen hacen posible el estudio de cáncer para diagnóstico precoz, eficacia del tratamiento canceroso in vitro y conocimiento más amplio de la supervivencia del paciente.

Una de las limitaciones, a la que se intenta dar solución actualmente, es el método de medición y extracción de los microARNs que como hemos visto a lo largo del trabajo ha sido costoso y laborioso. Las características de los microARNs hacen posible que sean extraídos de fluidos corporales, tales como sangre, orina o saliva, lo que facilita su accesibilidad para ser analizados de manera mucho menos traumática que la biopsia (25). Sin embargo, la cantidad de microARNs que se puede extraer varía en función del fluido o tejido utilizado (72) por lo que no vale cualquier fuente de microARNs. Los análisis de expresión de microARNs suponen un coste, actualmente, tan elevado que es necesario buscar mejoras que abaraten, y por qué no, faciliten el proceso.

Con este trabajo hemos querido mejorar el conocimiento del COCE y contribuir a la lucha contra el cáncer.



6.Conclusiones





1. El uso de la pieza de mano y las fresas de diamante ha demostrado ser un método eficaz de extracción de ARN total, con el que se pudo obtener una concentración y RIN adecuados.
2. La concentración de ARN total extraíble del tejido congelado disminuye con el tiempo de almacenamiento de la muestra.
3. El RIN del ARN total extraído de las muestras de tejido congelado no se vio influenciado por el tiempo de almacenamiento de la muestra.
4. El hecho de utilizar tejido proveniente de diferentes localizaciones orales, no supuso ninguna influencia en los resultados en cuanto a concentración y RIN del ARN total.
5. En nuestro estudio existe un cambio en el perfil de expresión de microARNs en las muestras de COCE en comparación con las muestras de tejido control
6. Nuestro trabajo revela una expresión diferente de 81 microARNs en las muestras de casos comparadas con las muestras de tejido sano.
7. De los 81 microARNs desregulados en el COCE, 45 presentaron una expresión menor en los casos comparada con las muestras controles.
8. La asociación de los microARNs con características clínicas no ha sido posible, probablemente debido al tamaño muestral, por lo que será necesario un incremento del número de casos para profundizar más en este campo.
9. Los microARNs con mayor nivel de significancia, cuyas dianas eran conocidas, estaban infra expresados en las muestras del COCE y su implicación se relaciona, estadísticamente, con los mecanismos moleculares de los proteoglicanos en el cáncer.
10. Las dianas de 40 de los microARNs desregulados en el COCE todavía son desconocidas.



7. Bibliografía





1. Ceballos Salobreña, Bullón Fernández, Gándara Rey. *Medicina Bucal Práctica*. Danú; 2000.
2. Chang CC, Yang YJ, Li YJ, Chen ST, Lin BR, Wu TS, et al. MicroRNA-17/20a functions to inhibit cell migration and can be used a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2013 Sep;49(9):923-31.
3. Liu Z, Wei S, Ma H, Zhao M, Myers JN, Weber RS, et al. A functional variant at the miR-184 binding site in TNFAIP2 and risk of squamous cell carcinoma of the head and neck. *Carcinogenesis*. 2011 Nov;32(11):1668-74.
4. He L, Hannon GJ. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. 2004 Jul;5(7):522-31.
5. Perez-Sayans M, Pilar GD, Barros-Angueira F, Suarez-Penaranda JM, Fernandez AC, Gandara-Rey JM, et al. Current trends in miRNAs and their relationship with oral squamous = cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2012 Jul;41(6):433-43.
6. Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context - from basic biology to clinical utility. *J Dent Res*. 2012 May;91(5):440-6.
7. Ogawa T, Saiki Y, Shiga K, Chen N, Fukushige S, Sunamura M, et al. miR-34a is downregulated in cis-diamminedichloroplatinum treated sinonasal squamous cell carcinoma patients with poor prognosis. *Cancer Sci*. 2012 Sep;103(9):1737-43.
8. Sun L, Yao Y, Liu B, Lin Z, Lin L, Yang M, et al. MiR-200b and miR-15b regulate chemotherapy-induced epithelial-mesenchymal transition in human tongue cancer cells by targeting BMI1. *Oncogene*. 2012 Jan 26;31(4):432-45.
9. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*. 2009 Jun 15;15(12):3998-4008.
10. Wu X, Bhayani MK, Dodge CT, Nicoloso MS, Chen Y, Yan X, et al. Coordinated Targeting of the EGFR Signaling Axis by MicroRNA-27a*. *Oncotarget*. 2013 Aug 6.
11. Yu T, Liu K, Wu Y, Fan J, Chen J, Li C, et al. MicroRNA-9 inhibits the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by suppressing expression of CXCR4 via the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Oncogene*. 2013 Oct 21.
12. Liu X, Wang C, Chen Z, Jin Y, Wang Y, Kolokythas A, et al. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem J*. 2011 Nov 15;440(1):23-31.

13. Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, Manickavasagam M, Rajkumar KS, Rajaraman R, et al. Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumourigenesis mechanism. *Mol Cancer*. 2016 Apr 7;15:28,016-0512-8.
14. Thind A, Wilson C. Exosomal miRNAs as cancer biomarkers and therapeutic targets. *J Extracell Vesicles*. 2016 Jul 19;5:31292.
15. Janiszewska J, Szaumkessel M, Szyfter K. microRNAs are important players in head and neck carcinoma: A review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2013 Aug 12.
16. Van Roosbroeck K, Calin GA. MicroRNAs in chronic lymphocytic leukemia: miRacle or miRage for prognosis and targeted therapies? *Semin Oncol*. 2016 Apr;43(2):209-14.
17. Perez-Sayans M, Somoza-Martin JM, Barros-Angueira F, Reboiras-Lopez MD, Gandara Rey JM, Garcia-Garcia A. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncol Rep*. 2009 Dec;22(6):1277-82.
18. Diniz M. Carcinoma oral de células escamosas: evaluación pronóstica de variables clínicas, histológicas e inmunohistoquímicas. Santiago de Compostela: Servicio de Publicacións e Intercambio Científico. Universidad de Santiago de Compostela. Tesis doctoral. 2005.
19. Moore SR, Pierce AM, Wilson DF. 'Oral cancer'--the terminology dilemma. *Oral Dis*. 2000 May;6(3):191-3.
20. Sasahira T, Kirita T, Kuniyasu H. Update of molecular pathobiology in oral cancer: a review. *Int J Clin Oncol*. 2014 Jun;19(3):431-6.
21. Yanjia H, Xinchun J. The role of epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma and oral submucous fibrosis. *Clin Chim Acta*. 2007 Aug;383(1-2):51-6.
22. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.
23. Clague J, Lippman SM, Yang H, Hildebrandt MA, Ye Y, Lee JJ, et al. Genetic variation in MicroRNA genes and risk of oral premalignant lesions. *Mol Carcinog*. 2010 Feb;49(2):183-9.
24. Ali FM, Patil A, Patil K, Prasant MC. Oral submucous fibrosis and its dermatological relation. *Indian Dermatol Online J*. 2014 Jul;5(3):260-5.
25. Yang Y, Li YX, Yang X, Jiang L, Zhou ZJ, Zhu YQ. Progress risk assessment of oral premalignant lesions with saliva miRNA analysis. *BMC Cancer*. 2013 Mar 19;13:129,2407-13-129.
26. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*. 2010 Jun;46(6):414-7.

27. Wang Y, Vogelsang M, Schafer G, Matejcic M, Parker MI. MicroRNA polymorphisms and environmental smoke exposure as risk factors for oesophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013 Oct 21;8(10):e78520.
28. Shi LJ, Zhang CY, Zhou ZT, Ma JY, Liu Y, Bao ZX, et al. MicroRNA-155 in oral squamous cell carcinoma: Overexpression, localization, and prognostic potential. *Head Neck*. 2014 Apr 2.
29. Gorsky M, Epstein JB, Oakley C, Le ND, Hay J, Stevenson-Moore P. Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging, and outcome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Nov;98(5):546-52.
30. Joseph BK. Oral cancer: prevention and detection. *Med Princ Pract*. 2002;11 Suppl 1:32-5.
31. Sciubba JJ. Oral cancer. The importance of early diagnosis and treatment. *Am J Clin Dermatol*. 2001;2(4):239-51.
32. Pathak KA, Mathur N, Talole S, Deshpande MS, Chaturvedi P, Pai PS, et al. Squamous cell carcinoma of the superior gingival-buccal complex. *Oral Oncol*. 2007 Sep;43(8):774-9.
33. Barasch A, Gofa A, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Squamous cell carcinoma of the gingiva. A case series analysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Aug;80(2):183-7.
34. Lefort K, Brooks Y, Ostano P, Cario-Andre M, Calpini V, Guinea-Viniegra J, et al. A miR-34a-SIRT6 axis in the squamous cell differentiation network. *EMBO J*. 2013 Aug 14;32(16):2248-63.
35. Campisi G, Panzarella V, Giuliani M, Lajolo C, Di Fede O, Falaschini S, et al. Human papillomavirus: its identity and controversial role in oral oncogenesis, premalignant and malignant lesions (review). *Int J Oncol*. 2007 Apr;30(4):813-23.
36. El-Mofty SK, Lu DW. Prevalence of human papillomavirus type 16 DNA in squamous cell carcinoma of the palatine tonsil, and not the oral cavity, in young patients: a distinct clinicopathologic and molecular disease entity. *Am J Surg Pathol*. 2003 Nov;27(11):1463-70.
37. Franco EL, Kowalski LP, Oliveira BV, Curado MP, Pereira RN, Silva ME, et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989 Jun 15;43(6):992-1000.
38. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol*. 2007 Feb;43(2):107-15.
39. Begg AC. Predicting recurrence after radiotherapy in head and neck cancer. *Semin Radiat Oncol*. 2012 Apr;22(2):108-18.
40. Christy AW, Bojan A. Targeted therapy: A novel approach in head and neck cancer. *Indian J Dent Res*. 2013 Mar-Apr;24(2):261-6.

41. Ko C, Citrin D. Radiotherapy for the management of locally advanced squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Dis.* 2009 Mar;15(2):121-32.
42. Wang W, Songlin P, Sun Y, Zhang B, Jinhui W. miR-21 inhibitor sensitizes human OSCC cells to cisplatin. *Mol Biol Rep.* 2012 May;39(5):5481-5.
43. Ratovitski EA. Phospho-DeltaNp63alpha-responsive microRNAs contribute to the regulation of necroptosis in squamous cell carcinoma upon cisplatin exposure. *FEBS Lett.* 2015 May 22;589(12):1352-8.
44. Huang Y, Chuang AY, Ratovitski EA. Phospho-DeltaNp63alpha/miR-885-3p axis in tumor cell life and cell death upon cisplatin exposure. *Cell Cycle.* 2011 Nov 15;10(22):3938-47.
45. Fu L, Kettner NM. The circadian clock in cancer development and therapy. *Prog Mol Biol Transl Sci.* 2013;119:221-82.
46. Kinoshita T, Nohata N, Watanabe-Takano H, Yoshino H, Hidaka H, Fujimura L, et al. Actin-related protein 2/3 complex subunit 5 (ARPC5) contributes to cell migration and invasion and is directly regulated by tumor-suppressive microRNA-133a in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2012 Jun;40(6):1770-8.
47. Lim H, Moon A. Inflammatory fibroblasts in cancer. *Arch Pharm Res.* 2016 Jul 6.
48. Yu CC, Chen YW, Chiou GY, Tsai LL, Huang PI, Chang CY, et al. MicroRNA let-7a represses chemoresistance and tumorigenicity in head and neck cancer via stem-like properties ablation. *Oral Oncol.* 2011 Mar;47(3):202-10.
49. Triner D, Shah YM. Hypoxia-Inducible Factors: a central link between inflammation and cancer. *J Clin Invest.* 2016 Aug 15.
50. Tanaka T, Ishigamori R. Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer. *J Oncol.* 2011;2011:603740.
51. Leong HS, Chong FT, Sew PH, Lau DP, Wong BH, Teh BT, et al. Targeting cancer stem cell plasticity through modulation of epidermal growth factor and insulin-like growth factor receptor signaling in head and neck squamous cell cancer. *Stem Cells Transl Med.* 2014 Sep;3(9):1055-65.
52. Horejs CM. Basement membrane fragments in the context of the epithelial-to-mesenchymal transition. *Eur J Cell Biol.* 2016 Jun 18.
53. Sun L, Fang J. Epigenetic regulation of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Mol Life Sci.* 2016 Jul 8.
54. Choi S, Myers JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *J Dent Res.* 2008 Jan;87(1):14-32.

55. Peralta-Zaragoza O, Bahena-Roman M, Diaz-Benitez CE, Madrid-Marina V. Regulation of the cell cycle and the development of cancer: therapeutic prospects. *Salud Publica Mex.* 1997 Sep-Oct;39(5):451-62.
56. Scully C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 May 1;16(3):e306-11.
57. García V, González-Moles M, Bascones Martínez A. Bases moleculares del cáncer oral. Revisión bibliográfica. *Avances en Odontoestomatología.* 2005;21(6):1.
58. Nishitani H, Lygerou Z. Control of DNA replication licensing in a cell cycle. *Genes Cells.* 2002 Jun;7(6):523-34.
59. Schoelch ML, Regezi JA, Dekker NP, Ng IO, McMillan A, Ziober BL, et al. Cell cycle proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999 May;35(3):333-42.
60. Thompson L. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. *Ear Nose Throat J.* 2006 Feb;85(2):74.
61. Lu L, Xue X, Lan J, Gao Y, Xiong Z, Zhang H, et al. MicroRNA-29a upregulates MMP2 in oral squamous cell carcinoma to promote cancer invasion and anti-apoptosis. *Biomed Pharmacother.* 2014 Feb;68(1):13-9.
62. Huang WC, Chan SH, Jang TH, Chang JW, Ko YC, Yen TC, et al. miRNA-491-5p and GIT1 serve as modulators and biomarkers for oral squamous cell carcinoma invasion and metastasis. *Cancer Res.* 2014 Feb 1;74(3):751-64.
63. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Dis.* 2009 Sep;15(6):388-99.
64. Pandey MK, Prasad S, Tyagi AK, Deb L, Huang J, Karelia DN, et al. Targeting Cell Survival Proteins for Cancer Cell Death. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016 Feb 25;9(1):10.3390/ph9010011.
65. Li C, Zhang G, Zhao L, Ma Z, Chen H. Metabolic reprogramming in cancer cells: glycolysis, glutaminolysis, and Bcl-2 proteins as novel therapeutic targets for cancer. *World J Surg Oncol.* 2016 Jan 20;14(1):15,016-0769-9.
66. Minor J, Wang X, Zhang F, Song J, Jimeno A, Wang XJ, et al. Methylation of microRNA-9 is a specific and sensitive biomarker for oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2012 Jan;48(1):73-8.
67. Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet.* 2012 Apr 18;13(5):358-69.

68. Schroeder A, Mueller O, Stocker S, Salowsky R, Leiber M, Gassmann M, et al. The RIN: an RNA integrity number for assigning integrity values to RNA measurements. *BMC Mol Biol.* 2006 Jan 31;7:3.
69. Flores F., Martínez M.A., Arenas C., Covarrubias A., Reyes J.L. ¡SILENCIO MENSAJEROS! QUÉ SON Y CÓMO ACTÚAN LOS MICRORNAS. *REB* 26(4): 135-141, 2007. 2007;26(4):135-41.
70. Breving K, Esquela-Kerscher A. The complexities of microRNA regulation: mirandering around the rules. *Int J Biochem Cell Biol.* 2010 Aug;42(8):1316-29.
71. Orom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell.* 2008 May 23;30(4):460-71.
72. Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell Oncol (Dordr).* 2013 Feb;36(1):1-7.
73. Kalfert D, Pesta M, Kulda V, Topolcan O, Ryska A, Celakovsky P, et al. MicroRNA profile in site-specific head and neck squamous cell cancer. *Anticancer Res.* 2015 Apr;35(4):2455-63.
74. Zhai L, Wang L, Teng F, Zhou L, Zhang W, Xiao J, et al. Argonaute and Argonaute-Bound Small RNAs in Stem Cells. *Int J Mol Sci.* 2016 Feb 4;17(2):208.
75. Ranganathan K, Sivasankar V. MicroRNAs - Biology and clinical applications. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2014 May;18(2):229-34.
76. Hartig JV, Tomari Y, Forstemann K. piRNAs--the ancient hunters of genome invaders. *Genes Dev.* 2007 Jul 15;21(14):1707-13.
77. Czech B, Hannon GJ. One Loop to Rule Them All: The Ping-Pong Cycle and piRNA-Guided Silencing. *Trends Biochem Sci.* 2016 Apr;41(4):324-37.
78. Gonzalez J, Qi H, Liu N, Lin H. Piwi Is a Key Regulator of Both Somatic and Germline Stem Cells in the *Drosophila* Testis. *Cell Rep.* 2015 Jul 7;12(1):150-61.
79. Shahali M, Kabir-Salmani M, Nayernia K, Soleimanpour-Lichaei HR, Vasei M, Mowla SJ, et al. A novel in vitro model for cancer stem cell culture using ectopically expressed piwil2 stable cell line. *Cell J.* 2013 Fall;15(3):250-7.
80. Litwin M, Dubis J, Arczynska K, Piotrowska A, Frydlewicz A, Karczewski M, et al. Correlation of HIWI and HILI Expression with Cancer Stem Cell Markers in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 2015 Jun;35(6):3317-24.
81. Zhao YM, Zhou JM, Wang LR, He HW, Wang XL, Tao ZH, et al. HIWI is associated with prognosis in patients with hepatocellular carcinoma after curative resection. *Cancer.* 2012 May 15;118(10):2708-17.

82. Peng L, Song L, Liu C, Lv X, Li X, Jie J, et al. piR-55490 inhibits the growth of lung carcinoma by suppressing mTOR signaling. *Tumour Biol.* 2016 Feb;37(2):2749-56.
83. Fatica A, Bozzoni I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat Rev Genet.* 2014 Jan;15(1):7-21.
84. Bergmann JH, Spector DL. Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function. *Curr Opin Cell Biol.* 2014 Feb;26:10-8.
85. Jalali S, Bhartiya D, Lalwani MK, Sivasubbu S, Scaria V. Systematic transcriptome wide analysis of lncRNA-miRNA interactions. *PLoS One.* 2013;8(2):e53823.
86. Wang R, Chen X, Xu T, Xia R, Han L, Chen W, et al. MiR-326 regulates cell proliferation and migration in lung cancer by targeting phox2a and is regulated by HOTAIR. *Am J Cancer Res.* 2016 Jan 15;6(2):173-86.
87. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res.* 2010 Sep;38(16):5366-83.
88. Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Niinuma T, Kai M. Relationship Between Noncoding RNA Dysregulation and Epigenetic Mechanisms in Cancer. *Adv Exp Med Biol.* 2016;927:109-35.
89. Ernst C, Morton CC. Identification and function of long non-coding RNA. *Front Cell Neurosci.* 2013 Oct 2;7:168.
90. Qi P, Zhou XY, Du X. Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Mol Cancer.* 2016 May 17;15(1):39,016-0524-4.
91. Chauhan R, Lahiri N. Tissue- and Serum-Associated Biomarkers of Hepatocellular Carcinoma. *Biomark Cancer.* 2016 Jul 4;8(Suppl 1):37-55.
92. Kita Y, Yonemori K, Osako Y, Baba K, Mori S, Maemura K, et al. Noncoding RNA and colorectal cancer: its epigenetic role. *J Hum Genet.* 2016 Jun 9.
93. Wei MM, Zhou GB. Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics.* 2016 Jul 7.
94. Gibb EA, Enfield KS, Stewart GL, Lonergan KM, Chari R, Ng RT, et al. Long non-coding RNAs are expressed in oral mucosa and altered in oral premalignant lesions. *Oral Oncol.* 2011 Nov;47(11):1055-61.
95. Dupuis-Sandoval F, Poirier M, Scott MS. The emerging landscape of small nucleolar RNAs in cell biology. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015 Jul-Aug;6(4):381-97.
96. Filipowicz W, Pogacic V. Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2002 Jun;14(3):319-27.

97. Dieci G, Preti M, Montanini B. Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility. *Genomics*. 2009 Aug;94(2):83-8.
98. Thorenor N, Slaby O. Small nucleolar RNAs functioning and potential roles in cancer. *Tumour Biol*. 2015 Jan;36(1):41-53.
99. Bachellerie JP, Cavaille J, Huttenhofer A. The expanding snoRNA world. *Biochimie*. 2002 Aug;84(8):775-90.
100. Stepanov GA, Filippova JA, Komissarov AB, Kuligina EV, Richter VA, Semenov DV. Regulatory role of small nucleolar RNAs in human diseases. *Biomed Res Int*. 2015;2015:206849.
101. Chu L, Su MY, Maggi LB, Jr, Lu L, Mullins C, Crosby S, et al. Multiple myeloma-associated chromosomal translocation activates orphan snoRNA ACA11 to suppress oxidative stress. *J Clin Invest*. 2012 Aug;122(8):2793-806.
102. Sharma E, Sterne-Weiler T, O'Hanlon D, Blencowe BJ. Global Mapping of Human RNA-RNA Interactions. *Mol Cell*. 2016 May 19;62(4):618-26.
103. Ronchetti D, Todoerti K, Tuana G, Agnelli L, Mosca L, Lionetti M, et al. The expression pattern of small nucleolar and small Cajal body-specific RNAs characterizes distinct molecular subtypes of multiple myeloma. *Blood Cancer J*. 2012 Nov 23;2:e96.
104. Kawahara K, Nakayama H, Nagata M, Yoshida R, Hirosue A, Tanaka T, et al. A low Dicer expression is associated with resistance to 5-FU-based chemoradiotherapy and a shorter overall survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2014 May;43(5):350-6.
105. Rosenfeld N, Aharonov R, Meiri E, Rosenwald S, Spector Y, Zepeniuk M, et al. MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat Biotechnol*. 2008 Apr;26(4):462-9.
106. Nylander E, Ebrahimi M, Wahlin YB, Boldrup L, Nylander K. Changes in miRNA expression in sera and correlation to duration of disease in patients with multifocal mucosal lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2012 Jan;41(1):86-9.
107. Liu CJ, Lin SC, Yang CC, Cheng HW, Chang KW. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012 Feb;34(2):219-24.
108. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003 Mar;9(3):277-9.
109. Lindenbergh-van der Plas M, Martens-de Kemp SR, de Maaker M, van Wieringen WN, Ylstra B, Agami R, et al. Identification of lethal microRNAs specific for head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2013 Oct 15;19(20):5647-57.
110. Eguchi T, Kuboki T. Cellular Reprogramming Using Defined Factors and MicroRNAs. *Stem Cells Int*. 2016;2016:7530942.

111. Gao G, Gay HA, Chernock RD, Zhang TR, Luo J, Thorstad WL, et al. A microRNA expression signature for the prognosis of oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2013 Jan 1;119(1):72-80.
112. Liu A, Xu X. MicroRNA isolation from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Methods Mol Biol*. 2011;724:259-67.
113. Kalmar A, Wichmann B, Galamb O, Spisak S, Toth K, Leiszter K, et al. Gene expression analysis of normal and colorectal cancer tissue samples from fresh frozen and matched formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens after manual and automated RNA isolation. *Methods*. 2013 Jan;59(1):S16-9.
114. Lin N, Lin Y, Fu X, Wu C, Xu J, Cui Z, et al. MicroRNAs as a Novel Class of Diagnostic Biomarkers in Detection of Oral Carcinoma: a Meta-Analysis Study. *Clin Lab*. 2016;62(3):451-61.
115. Hung PS, Chang KW, Kao SY, Chu TH, Liu CJ, Lin SC. Association between the rs2910164 polymorphism in pre-mir-146a and oral carcinoma progression. *Oral Oncol*. 2012 May;48(5):404-8.
116. Palmieri A, Carinci F, Martinelli M, Pezzetti F, Girardi A, Cura F, et al. Role of the MIR146A polymorphism in the origin and progression of oral squamous cell carcinoma. *Eur J Oral Sci*. 2014 Jun;122(3):198-201.
117. Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Munirajan AK. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-134, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med*. 2014 Dec 8.
118. Santhi WS, Prathibha R, Charles S, Anurup KG, Reshmi G, Ramachandran S, et al. Oncogenic microRNAs as biomarkers of oral tumorigenesis and minimal residual disease. *Oral Oncol*. 2013 Jun;49(6):567-75.
119. Serrano NA, Xu C, Liu Y, Wang P, Fan W, Upton MP, et al. Integrative analysis in oral squamous cell carcinoma reveals DNA copy number-associated miRNAs dysregulating target genes. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2012 Sep;147(3):501-8.
120. Zahran F, Ghalwash D, Shaker O, Al-Johani K, Scully C. Salivary microRNAs in oral cancer. *Oral Dis*. 2015 Sep;21(6):739-47.
121. Soga D, Yoshiba S, Shioyama S, Miyazaki H, Kondo S, Shintani S. microRNA expression profiles in oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2013 Aug;30(2):579-83.
122. Severino P, Bruggemann H, Andreghetto FM, Camps C, Klingbeil Mde F, de Pereira WO, et al. MicroRNA expression profile in head and neck cancer: HOX-cluster embedded microRNA-196a and microRNA-10b dysregulation implicated in cell proliferation. *BMC Cancer*. 2013 Nov 9;13:533,2407-13-533.

123. Severino P, Oliveira LS, Torres N, Andreghetto FM, de Fatima Guarizo Klingbeil M, Moyses R, et al. High-throughput sequencing of small RNA transcriptomes reveals critical biological features targeted by microRNAs in cell models used for squamous cell cancer research. *BMC Genomics*. 2013 Oct 26;14:735,2164-14-735.
124. Momen-Heravi F, Trachtenberg AJ, Kuo WP, Cheng YS. Genomewide Study of Salivary MicroRNAs for Detection of Oral Cancer. *J Dent Res*. 2014 Apr 9;93(7 suppl):86S-93S.
125. Ries J, Vairaktaris E, Kintopp R, Baran C, Neukam FW, Nkenke E. Alterations in miRNA expression patterns in whole blood of OSCC patients. *In Vivo*. 2014 Sep-Oct;28(5):851-61.
126. Scapoli L, Palmieri A, Lo Muzio L, Pezzetti F, Rubini C, Girardi A, et al. MicroRNA expression profiling of oral carcinoma identifies new markers of tumor progression. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 2010 Oct-Dec;23(4):1229-34.
127. Hui AB, Lenarduzzi M, Krushel T, Waldron L, Pintilie M, Shi W, et al. Comprehensive MicroRNA profiling for head and neck squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 15;16(4):1129-39.
128. Chen Z, Jin Y, Yu D, Wang A, Mahjabeen I, Wang C, et al. Down-regulation of the microRNA-99 family members in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2012 Aug;48(8):686-91.
129. Min A, Zhu C, Peng S, Rajthala S, Costea DE, Sapkota D. MicroRNAs as Important Players and Biomarkers in Oral Carcinogenesis. *Biomed Res Int*. 2015;2015:186904.
130. Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Altered levels of miR-21, miR-125b-2*, miR-138, miR-155, miR-184, and miR-205 in oral squamous cell carcinoma and association with clinicopathological characteristics. *J Oral Pathol Med*. 2015 Nov;44(10):792-800.
131. Yu X, Li Z. MicroRNA expression and its implications for diagnosis and therapy of tongue squamous cell carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2016 Jan;20(1):10-6.
132. Saramago M, Barria C, Dos Santos RF, Silva IJ, Pobre V, Domingues S, et al. The role of RNases in the regulation of small RNAs. *Curr Opin Microbiol*. 2014 Apr;18:105-15.
133. Lekchnov EA, Zaporozhchenko IA, Morozkin ES, Bryzgunova OE, Vlassov VV, Laktionov PP. Protocol for miRNA isolation from biofluids. *Anal Biochem*. 2016 Apr 15;499:78-84.
134. Muyal JP, Muyal V, Kaistha BP, Seifart C, Fehrenbach H. Systematic comparison of RNA extraction techniques from frozen and fresh lung tissues: checkpoint towards gene expression studies. *Diagn Pathol*. 2009 Mar 24;4:9,1596-4-9.
135. Vergoulis T, Kanellos I, Kostoulas N, Georgakilas G, Sellis T, Hatzigeorgiou A, et al. mirPub: a database for searching microRNA publications. *Bioinformatics*. 2015 May 1;31(9):1502-4.

136. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, Georgakilas G, Karagkouni D, Vergoulis T, et al. DIANA-miRPath v3.0: deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jul 1;43(W1):W460-6.
137. Pai R, Pai S, Lalitha R, Kumaraswamy S, Lalitha N, Johnston R, et al. Over-expression of c-Myc oncoprotein in oral squamous cell carcinoma in the South Indian population. *Ecancermedalscience.* 2009;3:128.
138. Bundela S, Sharma A, Bisen PS. Potential therapeutic targets for oral cancer: ADM, TP53, EGFR, LYN, CTLA4, SKIL, CTGF, CD70. *PLoS One.* 2014 Jul 16;9(7):e102610.
139. Ries J, Vairaktaris E, Agaimy A, Kintopp R, Baran C, Neukam FW, et al. miR-186, miR-3651 and miR-494: potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma extracted from whole blood. *Oncol Rep.* 2014 Mar;31(3):1429-36.
140. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res.* 2009 Sep 1;15(17):5473-7.
141. Wong TS, Liu XB, Chung-Wai Ho A, Po-Wing Yuen A, Wai-Man Ng R, Ignace Wei W. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer.* 2008 Jul 15;123(2):251-7.
142. Liu X, Yu J, Jiang L, Wang A, Shi F, Ye H, et al. MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics.* 2009 May-Jun;6(3):131-9.
143. Yu ZW, Zhong LP, Ji T, Zhang P, Chen WT, Zhang CP. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol.* 2010 Apr;46(4):317-22.
144. Zhou XL, Wu JH, Wang XJ, Guo FJ. Integrated microRNA-mRNA analysis revealing the potential roles of microRNAs in tongue squamous cell cancer. *Mol Med Rep.* 2015 Jul;12(1):885-94.
145. He Q, Chen Z, Cabay RJ, Zhang L, Luan X, Chen D, et al. microRNA-21 and microRNA-375 from oral cytology as biomarkers for oral tongue cancer detection. *Oral Oncol.* 2016 Jun;57:15-20.
146. Duz MB, Karatas OF, Guzel E, Turgut NF, Yilmaz M, Creighton CJ, et al. Identification of miR-139-5p as a saliva biomarker for tongue squamous cell carcinoma: a pilot study. *Cell Oncol (Dordr).* 2016 Apr;39(2):187-93.
147. Wiklund ED, Gao S, Hulf T, Sibbritt T, Nair S, Costea DE, et al. MicroRNA alterations and associated aberrant DNA methylation patterns across multiple sample types in oral squamous cell carcinoma. *PLoS One.* 2011;6(11):e27840.

148. Shao Y, Qu Y, Dang S, Yao B, Ji M. MiR-145 inhibits oral squamous cell carcinoma (OSCC) cell growth by targeting c-Myc and Cdk6. *Cancer Cell Int.* 2013 May 28;13(1):51,2867-13-51.
149. Geschwind DH. Sharing gene expression data: an array of options. *Nat Rev Neurosci.* 2001 Jun;2(6):435-8.
150. Sethi N, Wright A, Wood H, Rabbitts P. MicroRNAs and head and neck cancer: reviewing the first decade of research. *Eur J Cancer.* 2014 Oct;50(15):2619-35.
151. Mraz M, Malinova K, Mayer J, Pospisilova S. MicroRNA isolation and stability in stored RNA samples. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009 Dec 4;390(1):1-4.
152. Micke P, Ohshima M, Tahmasebpour S, Ren ZP, Ostman A, Ponten F, et al. Biobanking of fresh frozen tissue: RNA is stable in nonfixed surgical specimens. *Lab Invest.* 2006 Feb;86(2):202-11.
153. Ma R, Fredriksson I, Karthik GM, Winn G, Darai-Ramqvist E, Bergh J, et al. Superficial scrapings from breast tumors is a source for biobanking and research purposes. *Lab Invest.* 2014 Jul;94(7):796-805.
154. Perez-Portela R, Riesgo A. Optimizing preservation protocols to extract high-quality RNA from different tissues of echinoderms for next-generation sequencing. *Mol Ecol Resour.* 2013 Sep;13(5):884-9.
155. Van der Vorst S, Dekairelle AF, Ireng L, Hamoir M, Robert A, Gala JL. Automated cell disruption is a reliable and effective method of isolating RNA from fresh snap-frozen normal and malignant oral mucosa samples. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47(3):294-301.
156. von Teichman A, Storz M, Dettwiler S, Moch H, Schraml P. Whole genome and transcriptome amplification: practicable tools for sustainable tissue biobanking? *Virchows Arch.* 2012 Nov;461(5):571-80.
157. Shabihkhani M, Lucey GM, Wei B, Mareninov S, Lou JJ, Vinters HV, et al. The procurement, storage, and quality assurance of frozen blood and tissue biospecimens in pathology, biorepository, and biobank settings. *Clin Biochem.* 2014 Mar;47(4-5):258-66.
158. Lou JJ, Mirsadraei L, Sanchez DE, Wilson RW, Shabihkhani M, Lucey GM, et al. A review of room temperature storage of biospecimen tissue and nucleic acids for anatomic pathology laboratories and biorepositories. *Clin Biochem.* 2014 Mar;47(4-5):267-73.
159. Walter MA, Seboek D, Demougin P, Bubendorf L, Oberholzer M, Muller-Brand J, et al. Extraction of high-integrity RNA suitable for microarray gene expression analysis from long-term stored human thyroid tissues. *Pathology.* 2006 Jun;38(3):249-53.
160. Rudloff U, Bhanot U, Gerald W, Klimstra DS, Jarnagin WR, Brennan MF, et al. Biobanking of human pancreas cancer tissue: impact of ex-vivo procurement times on RNA quality. *Ann Surg Oncol.* 2010 Aug;17(8):2229-36.

161. Stiekema J, Cats A, Boot H, Langers AM, Balague Ponz O, van Velthuysen ML, et al. Biobanking of fresh-frozen endoscopic biopsy specimens from esophageal adenocarcinoma. *Dis Esophagus*. 2015 Nov 6.
162. Zeugner S, Mayr T, Zietz C, Aust DE, Baretton GB. RNA quality in fresh-frozen gastrointestinal tumor specimens-experiences from the tumor and healthy tissue bank TU Dresden. *Recent Results Cancer Res*. 2015;199:85-93.
163. Tissot C. Analysis of miRNA content in total RNA preparations using the Agilent 2100 bioanalyzer. Agilent Technologies, Palo Alto, Calif, USA, <http://www.chem.agilent.com/Library/applications/5989-7870EN.pdf>. 2008.
164. Lestrade L, Weber MJ. snoRNA-LBME-db, a comprehensive database of human H/ACA and C/D box snoRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D158-62.
165. Cavaille J, Seitz H, Paulsen M, Ferguson-Smith AC, Bachellerie JP. Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Hum Mol Genet*. 2002 Jun 15;11(13):1527-38.
166. Jady BE, Kiss T. Characterisation of the U83 and U84 small nucleolar RNAs: two novel 2'-O-ribose methylation guide RNAs that lack complementarities to ribosomal RNAs. *Nucleic Acids Res*. 2000 Mar 15;28(6):1348-54.
167. Maden BE. The numerous modified nucleotides in eukaryotic ribosomal RNA. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1990;39:241-303.
168. Kiss-Laszlo Z, Henry Y, Bachellerie JP, Caizergues-Ferrer M, Kiss T. Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1077-88.
169. Prislei S, Michienzi A, Presutti C, Fragapane P, Bozzoni I. Two different snoRNAs are encoded in introns of amphibian and human L1 ribosomal protein genes. *Nucleic Acids Res*. 1993 Dec 25;21(25):5824-30.
170. Ghosh T, Peterson B, Tomasevic N, Peculis BA. Xenopus U8 snoRNA binding protein is a conserved nuclear decapping enzyme. *Mol Cell*. 2004 Mar 26;13(6):817-28.
171. Tyc K, Steitz JA. U3, U8 and U13 comprise a new class of mammalian snRNPs localized in the cell nucleolus. *EMBO J*. 1989 Oct;8(10):3113-9.
172. Tycowski KT, Shu MD, Steitz JA. A mammalian gene with introns instead of exons generating stable RNA products. *Nature*. 1996 Feb 1;379(6564):464-6.
173. Ronchetti D, Mosca L, Cutrona G, Tuana G, Gentile M, Fabris S, et al. Small nucleolar RNAs as new biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *BMC Med Genomics*. 2013 Sep 3;6:27,8794-6-27.

174. Wang J, Song YX, Ma B, Wang JJ, Sun JX, Chen XW, et al. Regulatory Roles of Non-Coding RNAs in Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci.* 2015 Aug 21;16(8):19886-919.
175. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, Koike K. Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer. *World J Gastroenterol.* 2015 Jul 28;21(28):8527-40.
176. McMahon M, Contreras A, Ruggero D. Small RNAs with big implications: new insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2015 Mar-Apr;6(2):173-89.
177. Granados Lopez AJ, Lopez JA. Multistep model of cervical cancer: participation of miRNAs and coding genes. *Int J Mol Sci.* 2014 Sep 4;15(9):15700-33.
178. Leidinger P, Keller A, Meese E. MicroRNAs - Important Molecules in Lung Cancer Research. *Front Genet.* 2012 Jan 23;2:104.
179. Kinose Y, Sawada K, Nakamura K, Kimura T. The role of microRNAs in ovarian cancer. *Biomed Res Int.* 2014;2014:249393.
180. Hatta M, Naganuma K, Kato K, Yamazaki J. 3-Deazaneplanocin A suppresses aggressive phenotype-related gene expression in an oral squamous cell carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015 Dec 4-11;468(1-2):269-73.
181. Singh PK, Preus L, Hu Q, Yan L, Long MD, Morrison CD, et al. Serum microRNA expression patterns that predict early treatment failure in prostate cancer patients. *Oncotarget.* 2014 Feb 15;5(3):824-40.
182. Bradley BS, Loftus JC, Mielke CJ, Dinu V. Differential expression of microRNAs as predictors of glioblastoma phenotypes. *BMC Bioinformatics.* 2014 Jan 18;15:21,2105-15-21.
183. Wei Y, He R, Wu Y, Gan B, Wu P, Qiu X, et al. Comprehensive investigation of aberrant microRNA profiling in bladder cancer tissues. *Tumour Biol.* 2016 Jun 28.
184. Yan B, Fu Q, Lai L, Tao X, Fei Y, Shen J, et al. Downregulation of microRNA 99a in oral squamous cell carcinomas contributes to the growth and survival of oral cancer cells. *Mol Med Rep.* 2012 Sep;6(3):675-81.
185. Fricke A, Ullrich PV, Heinz J, Pfeifer D, Scholber J, Herget GW, et al. Identification of a blood-borne miRNA signature of synovial sarcoma. *Mol Cancer.* 2015 Aug 7;14:151,015-0424-z.
186. Xia M, Li H, Wang JJ, Zeng HJ, Wang SH. MiR-99a suppress proliferation, migration and invasion through regulating insulin-like growth factor 1 receptor in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 May;20(9):1755-63.
187. MacLellan SA, MacAulay C, Lam S, Garnis C. Pre-profiling factors influencing serum microRNA levels. *BMC Clin Pathol.* 2014 Jun 21;14:27,6890-14-27. eCollection 2014.

188. Kwong A, Chen JW, Shin VY. A new paradigm of genetic testing for hereditary breast/ovarian cancers. *Hong Kong Med J*. 2016 Apr;22(2):171-7.
189. Qian J, Li R, Wang YY, Shi Y, Luan WK, Tao T, et al. MiR-1224-5p acts as a tumor suppressor by targeting CREB1 in malignant gliomas. *Mol Cell Biochem*. 2015 May;403(1-2):33-41.
190. Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Apr 20;101(16):5898-903.
191. Suzuki M, Shinohara F, Endo M, Sugazaki M, Echigo S, Rikiishi H. Zebularine suppresses the apoptotic potential of 5-fluorouracil via cAMP/PKA/CREB pathway against human oral squamous cell carcinoma cells. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2009 Jul;64(2):223-32.
192. Verma S, Kesh K, Gupta A, Swarnakar S. An Overview of Matrix Metalloproteinase 9 Polymorphism and Gastric Cancer Risk. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2015;16(17):7393-400.
193. Della Vittoria Scarpati G, Falcetta F, Carlomagno C, Ubezio P, Marchini S, De Stefano A, et al. A specific miRNA signature correlates with complete pathological response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2012 Jul 15;83(4):1113-9.
194. Nymark P, Guled M, Borze I, Faisal A, Lahti L, Salmenkivi K, et al. Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2011 Aug;50(8):585-97.
195. Juzenas S, Salteniene V, Kupcinskas J, Link A, Kiudelis G, Jonaitis L, et al. Analysis of Deregulated microRNAs and Their Target Genes in Gastric Cancer. *PLoS One*. 2015 Jul 14;10(7):e0132327.
196. Xia Z, Liu F, Zhang J, Liu L. Decreased Expression of MiRNA-204-5p Contributes to Glioma Progression and Promotes Glioma Cell Growth, Migration and Invasion. *PLoS One*. 2015 Jul 2;10(7):e0132399.
197. Lee H, Kim KR, Cho NH, Hong SR, Jeong H, Kwon SY, et al. MicroRNA expression profiling and Notch1 and Notch2 expression in minimal deviation adenocarcinoma of uterine cervix. *World J Surg Oncol*. 2014 Nov 8;12:334,7819-12-334.
198. Bian Z, Jin L, Zhang J, Yin Y, Quan C, Hu Y, et al. LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p. *Sci Rep*. 2016 Apr 5;6:23892.
199. Zeng J, Wei M, Shi R, Cai C, Liu X, Li T, et al. MiR-204-5p/Six1 feedback loop promotes epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Tumour Biol*. 2016 Feb;37(2):2729-35.

200. Liu L, Wang J, Li X, Ma J, Shi C, Zhu H, et al. MiR-204-5p suppresses cell proliferation by inhibiting IGFBP5 in papillary thyroid carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015 Feb 20;457(4):621-6.
201. Lin SC, Wang CP, Chen YM, Lu SY, Fann MJ, Liu CJ, et al. Regulation of IGFBP-5 expression during tumorigenesis and differentiation of oral keratinocytes. *J Pathol*. 2002 Nov;198(3):317-25.
202. Zhang B, Yin Y, Hu Y, Zhang J, Bian Z, Song M, et al. MicroRNA-204-5p inhibits gastric cancer cell proliferation by downregulating USP47 and RAB22A. *Med Oncol*. 2015 Jan;32(1):331,014-0331-y. Epub 2014 Nov 28.
203. Yin Y, Zhang B, Wang W, Fei B, Quan C, Zhang J, et al. miR-204-5p inhibits proliferation and invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity of colorectal cancer cells by downregulating RAB22A. *Clin Cancer Res*. 2014 Dec 1;20(23):6187-99.
204. Wong N, Khwaja SS, Baker CM, Gay HA, Thorstad WL, Daly MD, et al. Prognostic microRNA signatures derived from The Cancer Genome Atlas for head and neck squamous cell carcinomas. *Cancer Med*. 2016 Apr 25.
205. Jafarzadeh M, Soltani BM, Dokanehiifard S, Kay M, Aghdami N, Hosseinkhani S. Experimental evidences for hsa-miR-497-5p as a negative regulator of SMAD3 gene expression. *Gene*. 2016 Jul 25;586(2):216-21.
206. Puppo M, Bucci G, Rossi M, Giovarelli M, Bordo D, Moshiri A, et al. miRNA-Mediated KHSRP Silencing Rewires Distinct Post-transcriptional Programs during TGF-beta-Induced Epithelial-to-Mesenchymal Transition. *Cell Rep*. 2016 Jul 6.
207. Liu Y, Cai Q, Bao PP, Su Y, Cai H, Wu J, et al. Tumor tissue microRNA expression in association with triple-negative breast cancer outcomes. *Breast Cancer Res Treat*. 2015 Jul;152(1):183-91.
208. Warnecke-Eberz U, Chon SH, Holscher AH, Drebber U, Bollschweiler E. Exosomal onco-miRs from serum of patients with adenocarcinoma of the esophagus: comparison of miRNA profiles of exosomes and matching tumor. *Tumour Biol*. 2015 Jun;36(6):4643-53.
209. Tao J, Zhi X, Zhang X, Fu M, Huang H, Fan Y, et al. miR-27b-3p suppresses cell proliferation through targeting receptor tyrosine kinase like orphan receptor 1 in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015 Nov 14;34:139,015-0253-3.
210. Horiguchi H, Kobune M, Kikuchi S, Yoshida M, Murata M, Murase K, et al. Extracellular vesicle miR-7977 is involved in hematopoietic dysfunction of mesenchymal stromal cells via poly(rC) binding protein 1 reduction in myeloid neoplasms. *Haematologica*. 2016 Apr;101(4):437-47.
211. Zheng ZF, Su HF, Zou Y, Peng Z, Wu SX. Expression profiles of microRNAs in radioresistant esophageal cell line. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2011 Mar 8;91(9):639-42.

212. Pan Y, Robertson G, Pedersen L, Lim E, Hernandez-Herrera A, Rowat AC, et al. miR-509-3p is clinically significant and strongly attenuates cellular migration and multi-cellular spheroids in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2016 Mar 27.
213. Chen W, Zeng W, Li X, Xiong W, Zhang M, Huang Y, et al. MicroRNA-509-3p increases the sensitivity of epithelial ovarian cancer cells to cisplatin-induced apoptosis. *Pharmacogenomics*. 2016 Feb;17(3):187-97.
214. Edward DP, Alkatan H, Rafiq Q, Eberhart C, Al Mesfer S, Ghazi N, et al. MicroRNA profiling in intraocular medulloepitheliomas. *PLoS One*. 2015 Mar 25;10(3):e0121706.
215. Yoon S, Han E, Choi YC, Kee H, Jeong Y, Yoon J, et al. Inhibition of cell proliferation and migration by miR-509-3p that targets CDK2, Rac1, and PIK3C2A. *Mol Cells*. 2014 Apr;37(4):314-21.
216. Nagata M, Kurita H, Uematsu K, Ogawa S, Takahashi K, Hoshina H, et al. Diagnostic value of cyclin-dependent kinase/cyclin-dependent kinase inhibitor expression ratios as biomarkers of locoregional and hematogenous dissemination risks in oral squamous cell carcinoma. *Mol Clin Oncol*. 2015 Sep;3(5):1007-13.
217. Soffar A, Storch K, Aleem E, Cordes N. CDK2 knockdown enhances head and neck cancer cell radiosensitivity. *Int J Radiat Biol*. 2013 Jul;89(7):523-31.
218. Wang Z, Zhang B, Jiang L, Zeng X, Chen Y, Feng X, et al. RACK1, an excellent predictor for poor clinical outcome in oral squamous carcinoma, similar to Ki67. *Eur J Cancer*. 2009 Feb;45(3):490-6.
219. Zhang X, Liu N, Ma D, Liu L, Jiang L, Zhou Y, et al. Receptor for activated C kinase 1 (RACK1) promotes the progression of OSCC via the AKT/mTOR pathway. *Int J Oncol*. 2016 Aug;49(2):539-48.
220. Su Z, Chen D, Zhang E, Li Y, Yu Z, Shi M, et al. MicroRNA-509-3p inhibits cancer cell proliferation and migration by targeting the mitogen-activated protein kinase kinase kinase 8 oncogene in renal cell carcinoma. *Mol Med Rep*. 2015 Jul;12(1):1535-43.
221. Ru Q, Tian X, Pi MS, Chen L, Yue K, Xiong Q, et al. Voltagegated K⁺ channel blocker quinidine inhibits proliferation and induces apoptosis by regulating expression of microRNAs in human glioma U87MG cells. *Int J Oncol*. 2015 Feb;46(2):833-40.
222. El-Guendy NM, Helwa R, El-Halawany MS, Abdel Rahman Ali S, Tantawy Aly M, Hasan Alieldin N, et al. The Liver MicroRNA Expression Profiles Associated With Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Genotype-4 Infection: A Preliminary Study. *Hepat Mon*. 2016 Mar 20;16(4):e33881.
223. Chickooree D, Zhu K, Ram V, Wu HJ, He ZJ, Zhang S. A preliminary microarray assay of the miRNA expression signatures in buccal mucosa of oral submucous fibrosis patients. *J Oral Pathol Med*. 2016 Mar 15.

224. Dong W, Yongjun L, Nan D, Junyun W, Qiong Y, Yaran Y, et al. Molecular networks and mechanisms of epithelial-mesenchymal transition regulated by miRNAs in the malignant melanoma cell line. *Yi Chuan*. 2015 Jul;37(7):673-82.
225. Vilming Elgaaen B, Olstad OK, Haug KB, Brusletto B, Sandvik L, Staff AC, et al. Global miRNA expression analysis of serous and clear cell ovarian carcinomas identifies differentially expressed miRNAs including miR-200c-3p as a prognostic marker. *BMC Cancer*. 2014 Feb 11;14:80,2407-14-80.
226. Yu X, Zhang X, Bi T, Ding Y, Zhao J, Wang C, et al. MiRNA expression signature for potentially predicting the prognosis of ovarian serous carcinoma. *Tumour Biol*. 2013 Dec;34(6):3501-8.
227. Zhang WB, Pan ZQ, Yang QS, Zheng XM. Tumor suppressive miR-509-5p contributes to cell migration, proliferation and antiapoptosis in renal cell carcinoma. *Ir J Med Sci*. 2013 Dec;182(4):621-7.
228. Ma N, Zhang W, Qiao C, Luo H, Zhang X, Liu D, et al. The Tumor Suppressive Role of MiRNA-509-5p by Targeting FOXM1 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cell Physiol Biochem*. 2016;38(4):1435-46.
229. Dai J, Yang L, Wang J, Xiao Y, Ruan Q. Prognostic Value of FOXM1 in Patients with Malignant Solid Tumor: A Meta-Analysis and System Review. *Dis Markers*. 2015;2015:352478.
230. Ren ZJ, Nong XY, Lv YR, Sun HH, An PP, Wang F, et al. Mir-509-5p joins the Mdm2/p53 feedback loop and regulates cancer cell growth. *Cell Death Dis*. 2014 Aug 21;5:e1387.
231. Li JT, Zhong BY, Xu HH, Qiao SY, Wang G, Huang J, et al. Associations between NBS1 Polymorphisms and Colorectal Cancer in Chinese Population. *PLoS One*. 2015 Jul 17;10(7):e0132332.
232. Tian F, Shen Y, Chen Z, Li R, Lu J, Ge Q. Aberrant miR-181b-5p and miR-486-5p expression in serum and tissue of non-small cell lung cancer. *Gene*. 2016 Jun 9.
233. Huang XP, Hou J, Shen XY, Huang CY, Zhang XH, Xie YA, et al. MicroRNA-486-5p, which is downregulated in hepatocellular carcinoma, suppresses tumor growth by targeting PIK3R1. *FEBS J*. 2015 Feb;282(3):579-94.
234. Cybula M, Wieteska, Jozefowicz-Korczyńska M, Karbownik MS, Grzelczyk WL, Szemraj J. New miRNA expression abnormalities in laryngeal squamous cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2016 Mar 11;16(4):559-68.
235. Yan LX, Liu YH, Xiang JW, Wu QN, Xu LB, Luo XL, et al. PIK3R1 targeting by miR-21 suppresses tumor cell migration and invasion by reducing PI3K/AKT signaling and reversing EMT, and predicts clinical outcome of breast cancer. *Int J Oncol*. 2016 Feb;48(2):471-84.

236. Liu C, Li M, Hu Y, Shi N, Yu H, Liu H, et al. miR-486-5p attenuates tumor growth and lymphangiogenesis by targeting neuropilin-2 in colorectal carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2016 May 19;9:2865-71.
237. Fung TM, Ng KY, Tong M, Chen JN, Chai S, Chan KT, et al. Neuropilin-2 promotes tumorigenicity and metastasis in oesophageal squamous cell carcinoma through ERK-MAPK-ETV4-MMP-E-cadherin deregulation. *J Pathol.* 2016 Jul;239(3):309-19.
238. Chen H, Ren C, Han C, Wang D, Chen Y, Fu D. Expression and prognostic value of miR-486-5p in patients with gastric adenocarcinoma. *PLoS One.* 2015 Mar 20;10(3):e0119384.
239. Le Large TY, Meijer LL, Prado MM, Kazemier G, Frampton AE, Giovannetti E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *Expert Rev Mol Diagn.* 2015;15(12):1525-9.
240. Han L, Liu D, Li Z, Tian N, Han Z, Wang G, et al. HOXB1 Is a Tumor Suppressor Gene Regulated by miR-3175 in Glioma. *PLoS One.* 2015 Nov 13;10(11):e0142387.
241. Xavier FC, Destro MF, Duarte CM, Nunes FD. Epigenetic repression of HOXB cluster in oral cancer cell lines. *Arch Oral Biol.* 2014 Aug;59(8):783-9.
242. Lin M, Shi C, Lin X, Pan J, Shen S, Xu Z, et al. sMicroRNA-1290 inhibits cells proliferation and migration by targeting FOXA1 in gastric cancer cells. *Gene.* 2016 May 15;582(2):137-42.
243. Kim G, An HJ, Lee MJ, Song JY, Jeong JY, Lee JH, et al. Hsa-miR-1246 and hsa-miR-1290 are associated with stemness and invasiveness of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer.* 2016 Jan;91:15-22.
244. Hamam R, Ali AM, Alsaleh KA, Kassem M, Alfayez M, Aldahmash A, et al. microRNA expression profiling on individual breast cancer patients identifies novel panel of circulating microRNA for early detection. *Sci Rep.* 2016 May 16;6:25997.
245. Nagamitsu Y, Nishi H, Sasaki T, Takaesu Y, Terauchi F, Isaka K. Profiling analysis of circulating microRNA expression in cervical cancer. *Mol Clin Oncol.* 2016 Jul;5(1):189-94.
246. Janiszewska J, Szaumkessel M, Kostrzevska-Poczekaj M, Bednarek K, Paczkowska J, Jackowska J, et al. Global miRNA Expression Profiling Identifies miR-1290 as Novel Potential oncomiR in Laryngeal Carcinoma. *PLoS One.* 2015 Dec 22;10(12):e0144924.
247. Vanita V, Guo G, Singh D, Ott CE, Robinson PN. Differential effect of cataract-associated mutations in MAF on transactivation of MAF target genes. *Mol Cell Biochem.* 2014 Nov;396(1-2):137-45.
248. Shi JL, Fu L, Wang WD. High expression of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor, type 2 (ITPR2) as a novel biomarker for worse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Oncotarget.* 2015 Mar 10;6(7):5299-309.

249. Wiel C, Lallet-Daher H, Gitenay D, Gras B, Le Calve B, Augert A, et al. Endoplasmic reticulum calcium release through ITPR2 channels leads to mitochondrial calcium accumulation and senescence. *Nat Commun.* 2014 May 6;5:3792.
250. Mao Y, Liu J, Zhang D, Li B. MiR-1290 promotes cancer progression by targeting nuclear factor I/X(NFIX) in esophageal squamous cell carcinoma (ESCC). *Biomed Pharmacother.* 2015 Dec;76:82-93.
251. Schanze D, Neubauer D, Cormier-Daire V, Delrue MA, Dieux-Coeslier A, Hasegawa T, et al. Deletions in the 3' part of the NFIX gene including a recurrent Alu-mediated deletion of exon 6 and 7 account for previously unexplained cases of Marshall-Smith syndrome. *Hum Mutat.* 2014 Sep;35(9):1092-100.
252. Yamada KH, Nakajima Y, Geyer M, Wary KK, Ushio-Fukai M, Komarova Y, et al. KIF13B regulates angiogenesis through Golgi to plasma membrane trafficking of VEGFR2. *J Cell Sci.* 2014 Oct 15;127(Pt 20):4518-30.
253. Wu J, Ji X, Zhu L, Jiang Q, Wen Z, Xu S, et al. Up-regulation of microRNA-1290 impairs cytokinesis and affects the reprogramming of colon cancer cells. *Cancer Lett.* 2013 Feb 28;329(2):155-63.
254. Liu X, Chen Z, Yu J, Xia J, Zhou X. MicroRNA profiling and head and neck cancer. *Comp Funct Genomics.* 2009:837514.
255. Ren Y, Zhu H, Chi C, Yang F, Xu X. MiRNA-139 regulates oral cancer Tca8113 cells apoptosis through Akt signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol.* 2015 May 1;8(5):4588-94.
256. Tang S, Wu WK, Li X, Wong SH, Wong N, Chan MT, et al. Stratification of Digestive Cancers with Different Pathological Features and Survival Outcomes by MicroRNA Expression. *Sci Rep.* 2016 Apr 15;6:24466.
257. Li Q, Liang X, Wang Y, Meng X, Xu Y, Cai S, et al. miR-139-5p Inhibits the Epithelial-Mesenchymal Transition and Enhances the Chemotherapeutic Sensitivity of Colorectal Cancer Cells by Downregulating BCL2. *Sci Rep.* 2016 May 31;6:27157.
258. Wang H, Yan X, Ji LY, Ji XT, Wang P, Guo SW, et al. miR-139 Functions as An Antioncomir to Repress Glioma Progression Through Targeting IGF-1 R, AMY-1, and PGC-1beta. *Technol Cancer Res Treat.* 2016 Feb 10.
259. Liu H, Yin Y, Hu Y, Feng Y, Bian Z, Yao S, et al. miR-139-5p sensitizes colorectal cancer cells to 5-fluorouracil by targeting NOTCH-1. *Pathol Res Pract.* 2016 Jul;212(7):643-9.
260. Cao B, Wang K, Liao JM, Zhou X, Liao P, Zeng SX, et al. Inactivation of oncogenic cAMP-specific phosphodiesterase 4D by miR-139-5p in response to p53 activation. *Elife.* 2016 Jul 7;5:10.7554/eLife.15978.

261. Ma Y, Feng J, Xing X, Zhou B, Li S, Zhang W, et al. miR-1908 Overexpression Inhibits Proliferation, Changing Akt Activity and p53 Expression in Hypoxic NSCLC Cells. *Oncol Res.* 2016;24(1):9-15.
262. Lian D, Wang ZZ, Liu NS. MicroRNA-1908 is a biomarker for poor prognosis in human osteosarcoma. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016 Apr;20(7):1258-62.
263. Yuan H, Gao Y. MicroRNA-1908 is upregulated in human osteosarcoma and regulates cell proliferation and migration by repressing PTEN expression. *Oncol Rep.* 2015 Nov;34(5):2706-14.
264. Xia X, Li Y, Wang W, Tang F, Tan J, Sun L, et al. MicroRNA-1908 functions as a glioblastoma oncogene by suppressing PTEN tumor suppressor pathway. *Mol Cancer.* 2015 Aug 12;14:154,015-0423-0.
265. Kuang Q, Li J, You L, Shi C, Ji C, Guo X, et al. Identification and characterization of NF-kappaB binding sites in human miR-1908 promoter. *Biomed Pharmacother.* 2015 Aug;74:158-63.
266. Neerincx M, Sie DL, van de Wiel MA, van Grieken NC, Burggraaf JD, Dekker H, et al. MiR expression profiles of paired primary colorectal cancer and metastases by next-generation sequencing. *Oncogenesis.* 2015 Oct 5;4:e170.
267. Du M, Shi D, Yuan L, Li P, Chu H, Qin C, et al. Circulating miR-497 and miR-663b in plasma are potential novel biomarkers for bladder cancer. *Sci Rep.* 2015 May 27;5:10437.
268. De Cecco L, Capaia M, Zupo S, Cutrona G, Matis S, Brizzolara A, et al. Interleukin 21 Controls mRNA and MicroRNA Expression in CD40-Activated Chronic Lymphocytic Leukemia Cells. *PLoS One.* 2015 Aug 25;10(8):e0134706.
269. Pekarsky Y, Balatti V, Palamarchuk A, Rizzotto L, Veneziano D, Nigita G, et al. Dysregulation of a family of short noncoding RNAs, tsRNAs, in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 May 3;113(18):5071-6.
270. Molina-Pinelo S, Carnero A, Rivera F, Estevez-Garcia P, Bozada JM, Limon ML, et al. MiR-107 and miR-99a-3p predict chemotherapy response in patients with advanced colorectal cancer. *BMC Cancer.* 2014 Sep 7;14:656,2407-14-656.
271. Fukumoto I, Kinoshita T, Hanazawa T, Kikkawa N, Chiyomaru T, Enokida H, et al. Identification of tumour suppressive microRNA-451a in hypopharyngeal squamous cell carcinoma based on microRNA expression signature. *Br J Cancer.* 2014 Jul 15;111(2):386-94.
272. Liu ZR, Song Y, Wan LH, Zhang YY, Zhou LM. Over-expression of miR-451a can enhance the sensitivity of breast cancer cells to tamoxifen by regulating 14-3-3zeta, estrogen receptor alpha, and autophagy. *Life Sci.* 2016 Mar 15;149:104-13.

273. Minna E, Romeo P, Dugo M, De Cecco L, Todoerti K, Pilotti S, et al. miR-451a is underexpressed and targets AKT/mTOR pathway in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Mar 15;7(11):12731-47.
274. Chen Q, Hu H, Jiao D, Yan J, Xu W, Tang X, et al. miR-126-3p and miR-451a correlate with clinicopathological features of lung adenocarcinoma: The underlying molecular mechanisms. *Oncol Rep*. 2016 Aug;36(2):909-17.
275. Riquelme I, Tapia O, Leal P, Sandoval A, Varga MG, Letelier P, et al. miR-101-2, miR-125b-2 and miR-451a act as potential tumor suppressors in gastric cancer through regulation of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Cell Oncol (Dordr)*. 2016 Feb;39(1):23-33.
276. Slattery ML, Herrick JS, Mullany LE, Valeri N, Stevens J, Caan BJ, et al. An evaluation and replication of miRNAs with disease stage and colorectal cancer-specific mortality. *Int J Cancer*. 2015 Jul 15;137(2):428-38.
277. Xu C, Zheng Y, Lian D, Ye S, Yang J, Zeng Z. Analysis of microRNA expression profile identifies novel biomarkers for non-small cell lung cancer. *Tumori*. 2015 Jan-Feb;101(1):104-10.
278. Formosa A, Markert EK, Lena AM, Italiano D, Finazzi-Agro' E, Levine AJ, et al. MicroRNAs, miR-154, miR-299-5p, miR-376a, miR-376c, miR-377, miR-381, miR-487b, miR-485-3p, miR-495 and miR-654-3p, mapped to the 14q32.31 locus, regulate proliferation, apoptosis, migration and invasion in metastatic prostate cancer cells. *Oncogene*. 2014 Oct 30;33(44):5173-82.
279. Kunisada R, Yoshida N, Nakamura S, Uchiyama H, Matsumoto H. Enhanced expression of miR-199b-5p promotes proliferation of pancreatic beta-cells by down-regulation of MLK3. *Microna*. 2016 Jun 6.
280. Yang R, Yi L, Dong Z, Ouyang Q, Zhou J, Pang Y, et al. Tigecycline Inhibits Glioma Growth by Regulating miRNA-199b-5p-HES1-AKT Pathway. *Mol Cancer Ther*. 2016 Mar;15(3):421-9.
281. Garzia L, Andolfo I, Cusanelli E, Marino N, Petrosino G, De Martino D, et al. MicroRNA-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS One*. 2009;4(3):e4998.
282. Favreau AJ, Cross EL, Sathyanarayana P. miR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol*. 2012 Apr;87(4):442-6.
283. Liu MX, Siu MK, Liu SS, Yam JW, Ngan HY, Chan DW. Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*. 2014 Feb 28;5(4):944-58.

284. Zhao R, Li Y, Lin Z, Wan J, Xu C, Zeng Y, et al. miR-199b-5p modulates BMSC osteogenesis via suppressing GSK-3 β /beta-catenin signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2016 Jun 27.
285. Zeng H, Zhang Z, Dai X, Chen Y, Ye J, Jin Z. Increased Expression of microRNA-199b-5p Associates with Poor Prognosis Through Promoting Cell Proliferation, Invasion and Migration Abilities of Human Osteosarcoma. *Pathol Oncol Res*. 2016 Apr;22(2):253-60.
286. Peng Y, Li C, Luo DC, Ding JW, Zhang W, Pan G. Expression profile and clinical significance of microRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules*. 2014 Aug 5;19(8):11586-99.
287. Luan J, Wang J, Su Q, Chen X, Jiang G, Xu X. Meta-analysis of the differentially expressed microRNA profiles in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016 Mar 1;7(9):10513-21.
288. Hudcova K, Raudenska M, Gumulec J, Binkova H, Horakova Z, Kostrica R, et al. Expression profiles of miR-29c, miR-200b and miR-375 in tumour and tumour-adjacent tissues of head and neck cancers. *Tumour Biol*. 2016 Jul 20.
289. Shang J, Yao Y, Fan X, Shanguan L, Li J, Liu H, et al. miR-29c-3p promotes senescence of human mesenchymal stem cells by targeting CNOT6 through p53-p21 and p16-pRB pathways. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Apr;1863(4):520-32.
290. Ye H, Yu X, Xia J, Tang X, Tang L, Chen F. MiR-486-3p targeting ECM1 represses cell proliferation and metastasis in cervical cancer. *Biomed Pharmacother*. 2016 May;80:109-14.
291. Venkatesan N, Deepa PR, Khetan V, Krishnakumar S. Computational and in vitro Investigation of miRNA-Gene Regulations in Retinoblastoma Pathogenesis: miRNA Mimics Strategy. *Bioinform Biol Insights*. 2015 May 12;9:89-101.
292. Fotinos A, Nagarajan N, Martins AS, Fritz DT, Garsetti D, Lee AT, et al. Bone morphogenetic protein-focused strategies to induce cytotoxicity in lung cancer cells. *Anticancer Res*. 2014 May;34(5):2095-104.
293. Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res*. 2012 Feb 15;18(4):981-92.
294. Yu C, Wang M, Li Z, Xiao J, Peng F, Guo X, et al. MicroRNA-138-5p regulates pancreatic cancer cell growth through targeting FOXC1. *Cell Oncol (Dordr)*. 2015 Jun;38(3):173-81.
295. Zhao L, Yu H, Yi S, Peng X, Su P, Xiao Z, et al. The tumor suppressor miR-138-5p targets PD-L1 in colorectal cancer. *Oncotarget*. 2016 May 27.
296. Xu R, Zeng G, Gao J, Ren Y, Zhang Z, Zhang Q, et al. miR-138 suppresses the proliferation of oral squamous cell carcinoma cells by targeting Yes-associated protein 1. *Oncol Rep*. 2015 Oct;34(4):2171-8.

297. Hiemer SE, Zhang L, Kartha VK, Packer TS, Almershed M, Noonan V, et al. A YAP/TAZ-Regulated Molecular Signature Is Associated with Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mol Cancer Res.* 2015 Jun;13(6):957-68.
298. Liu Y, Zhang W, Liu K, Liu S, Ji B, Wang Y. miR-138 suppresses cell proliferation and invasion by inhibiting SOX9 in hepatocellular carcinoma. *Am J Transl Res.* 2016 May 15;8(5):2159-68.
299. Liu P, Ye F, Xie X, Li X, Tang H, Li S, et al. mir-101-3p is a key regulator of tumor metabolism in triple negative breast cancer targeting AMPK. *Oncotarget.* 2016 Apr 28.
300. Liu XY, Liu ZJ, He H, Zhang C, Wang YL. MicroRNA-101-3p suppresses cell proliferation, invasion and enhances chemotherapeutic sensitivity in salivary gland adenoid cystic carcinoma by targeting Pim-1. *Am J Cancer Res.* 2015 Sep 15;5(10):3015-29.
301. Gong J, Chu Y, Xu M, Huo J, Lv L. Esophageal squamous cell carcinoma cell proliferation induced by exposure to low concentration of cigarette smoke extract is mediated via targeting miR-101-3p/COX-2 pathway. *Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):463-71.
302. Johnson JJ, Miller DL, Jiang R, Liu Y, Shi Z, Tarwater L, et al. Protease-activated Receptor-2 (PAR-2)-mediated Nf-kappaB Activation Suppresses Inflammation-associated Tumor Suppressor MicroRNAs in Oral Squamous Cell Carcinoma. *J Biol Chem.* 2016 Mar 25;291(13):6936-45.
303. Dong L, Deng J, Sun ZM, Pan AP, Xiang XJ, Zhang L, et al. Interference with the beta-catenin gene in gastric cancer induces changes to the miRNA expression profile. *Tumour Biol.* 2015 Sep;36(9):6973-83.
304. Ji H, Chen M, Greening DW, He W, Rai A, Zhang W, et al. Deep sequencing of RNA from three different extracellular vesicle (EV) subtypes released from the human LIM1863 colon cancer cell line uncovers distinct miRNA-enrichment signatures. *PLoS One.* 2014 Oct 17;9(10):e110314.
305. Yoo JK, Jung HY, Kim CH, Son WS, Kim JK. miR-7641 modulates the expression of CXCL1 during endothelial differentiation derived from human embryonic stem cells. *Arch Pharm Res.* 2013 Mar;36(3):353-8.
306. Weng JH, Yu CC, Lee YC, Lin CW, Chang WW, Kuo YL. miR-494-3p Induces Cellular Senescence and Enhances Radiosensitivity in Human Oral Squamous Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci.* 2016 Jul 8;17(7):10.3390/ijms17071092.
307. Geng J, Liu Y, Jin Y, Tai J, Zhang J, Xiao X, et al. MicroRNA-365a-3p promotes tumor growth and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2016 Apr;35(4):2017-26.
308. Iwawaki Y, Mizusawa N, Iwata T, Higaki N, Goto T, Watanabe M, et al. MiR-494-3p induced by compressive force inhibits cell proliferation in MC3T3-E1 cells. *J Biosci Bioeng.* 2015 Oct;120(4):456-62.

309. Nayak S, Goel MM, Makker A, Bhatia V, Chandra S, Kumar S, et al. Fibroblast Growth Factor (FGF-2) and Its Receptors FGFR-2 and FGFR-3 May Be Putative Biomarkers of Malignant Transformation of Potentially Malignant Oral Lesions into Oral Squamous Cell Carcinoma. *PLoS One*. 2015 Oct 14;10(10):e0138801.
310. Shen PF, Chen XQ, Liao YC, Chen N, Zhou Q, Wei Q, et al. MicroRNA-494-3p targets CXCR4 to suppress the proliferation, invasion, and migration of prostate cancer. *Prostate*. 2014 May;74(7):756-67.
311. Li XT, Wang HZ, Wu ZW, Yang TQ, Zhao ZH, Chen GL, et al. miR-494-3p Regulates Cellular Proliferation, Invasion, Migration, and Apoptosis by PTEN/AKT Signaling in Human Glioblastoma Cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2015 Jul;35(5):679-87.
312. Liu R, Yang M, Meng Y, Liao J, Sheng J, Pu Y, et al. Tumor-suppressive function of miR-139-5p in esophageal squamous cell carcinoma. *PLoS One*. 2013 Oct 18;8(10):e77068.
313. Yonemori M, Seki N, Yoshino H, Matsushita R, Miyamoto K, Nakagawa M, et al. Dual tumor-suppressors miR-139-5p and miR-139-3p targeting matrix metalloprotease 11 (MMP11) in bladder cancer. *Cancer Sci*. 2016 Jun 29.
314. Zou F, Mao R, Yang L, Lin S, Lei K, Zheng Y, et al. Targeted deletion of miR-139-5p activates MAPK, NF-kappaB and STAT3 signaling and promotes intestinal inflammation and colorectal cancer. *FEBS J*. 2016 Apr;283(8):1438-52.
315. Sun C, Sang M, Li S, Sun X, Yang C, Xi Y, et al. Hsa-miR-139-5p inhibits proliferation and causes apoptosis associated with down-regulation of c-Met. *Oncotarget*. 2015 Nov 24;6(37):39756-92.
316. Xu W, Hang M, Yuan CY, Wu FL, Chen SB, Xue K. MicroRNA-139-5p inhibits cell proliferation and invasion by targeting insulin-like growth factor 1 receptor in human non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015 Apr 1;8(4):3864-70.
317. Yue S, Wang L, Zhang H, Min Y, Lou Y, Sun H, et al. miR-139-5p suppresses cancer cell migration and invasion through targeting ZEB1 and ZEB2 in GBM. *Tumour Biol*. 2015 Sep;36(9):6741-9.
318. Haakensen VD, Nygaard V, Greger L, Aure MR, Fromm B, Bukholm IR, et al. Subtype-specific micro-RNA expression signatures in breast cancer progression. *Int J Cancer*. 2016 Sep 1;139(5):1117-28.
319. Liu X, Duan B, Dong Y, He C, Zhou H, Sheng H, et al. MicroRNA-139-3p indicates a poor prognosis of colon cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014 Oct 15;7(11):8046-52.
320. Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, et al. CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma -A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer*. 2009 Jul;48(7):615-23.

321. Xiao F, Qiu H, Cui H, Ni X, Li J, Liao W, et al. MicroRNA-885-3p inhibits the growth of HT-29 colon cancer cell xenografts by disrupting angiogenesis via targeting BMPR1A and blocking BMP/Smad/Id1 signaling. *Oncogene*. 2015 Apr 9;34(15):1968-78.
322. Xiao W, Bao ZX, Zhang CY, Zhang XY, Shi LJ, Zhou ZT, et al. Upregulation of miR-31* is negatively associated with recurrent/newly formed oral leukoplakia. *PLoS One*. 2012;7(6):e38648.
323. Lima CR, Geraldo MV, Fuziwara CS, Kimura ET, Santos MF. MiRNA-146b-5p upregulates migration and invasion of different Papillary Thyroid Carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2016 Feb 16;16:108,016-2146-z.
324. Xu E, Zhao J, Ma J, Wang C, Zhang C, Jiang H, et al. miR-146b-5p promotes invasion and metastasis contributing to chemoresistance in osteosarcoma by targeting zinc and ring finger 3. *Oncol Rep*. 2016 Jan;35(1):275-83.
325. Yoon SO, Kim EK, Lee M, Jung WY, Lee H, Kang Y, et al. NOVA1 inhibition by miR-146b-5p in the remnant tissue microenvironment defines occult residual disease after gastric cancer removal. *Oncotarget*. 2016 Jan 19;7(3):2475-95.
326. Zhang HM, Li Q, Zhu X, Liu W, Hu H, Liu T, et al. miR-146b-5p within BCR-ABL1-Positive Microvesicles Promotes Leukemic Transformation of Hematopoietic Cells. *Cancer Res*. 2016 May 15;76(10):2901-11.
327. Liu J, Xu J, Li H, Sun C, Yu L, Li Y, et al. miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas. *Oncotarget*. 2015 Oct 6;6(30):29129-42.
328. de Mooij T, McCutcheon BA, Leontovich AA, Parney IF. 336 Small RNA Sequencing of Glioblastoma Multiforme Extracellular Vesicles. *Neurosurgery*. 2016 Aug;63 Suppl 1:198.
329. Lee S, Lee H, Bae H, Choi EH, Kim SJ. Epigenetic silencing of miR-19a-3p by cold atmospheric plasma contributes to proliferation inhibition of the MCF-7 breast cancer cell. *Sci Rep*. 2016 Jul 21;6:30005.
330. Yang J, Zhang Z, Chen C, Liu Y, Si Q, Chuang TH, et al. MicroRNA-19a-3p inhibits breast cancer progression and metastasis by inducing macrophage polarization through downregulated expression of Fra-1 proto-oncogene. *Oncogene*. 2014 Jun 5;33(23):3014-23.
331. Pan Y, Guo Y, Luo Y, Li H, Xu Y. MicroRNA expression profiling of Chinese follicular lymphoma by microarray: A preliminary study. *Int Immunopharmacol*. 2016 Jul 10;39:41-7.
332. Zheng G, Du L, Yang X, Zhang X, Wang L, Yang Y, et al. Serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer*. 2014 Nov 11;111(10):1985-92.
333. Busch S, Auth E, Scholl F, Huenecke S, Koehl U, Suess B, et al. 5-lipoxygenase is a direct target of miR-19a-3p and miR-125b-5p. *J Immunol*. 2015 Feb 15;194(4):1646-53.

334. Park SW, Hah JH, Oh SM, Jeong WJ, Sung MW. 5-lipoxygenase mediates docosahexaenoyl ethanolamide and N-arachidonoyl-L-alanine-induced reactive oxygen species production and inhibition of proliferation of head and neck squamous cell carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2016 Jul 13;16:458,016-2499-3.
335. Yang B, Jing C, Wang J, Guo X, Chen Y, Xu R, et al. Identification of microRNAs associated with lymphangiogenesis in human gastric cancer. *Clin Transl Oncol*. 2014 Apr;16(4):374-9.
336. Hasan MM, Akter R, Ullah MS, Abedin MJ, Ullah GM, Hossain MZ. A Computational Approach for Predicting Role of Human MicroRNAs in MERS-CoV Genome. *Adv Bioinformatics*. 2014;2014:967946.
337. Friedlander MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N. miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res*. 2012 Jan;40(1):37-52.
338. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet*. 2005 Jul;37(7):766-70.
339. Budak H, Bulut R, Kantar M, Alptekin B. MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription. *Brief Funct Genomics*. 2016 Jan;15(1):65-71.
340. Ladewig E, Okamura K, Flynt AS, Westholm JO, Lai EC. Discovery of hundreds of mirtrons in mouse and human small RNA data. *Genome Res*. 2012 Sep;22(9):1634-45.
341. Joyce CE, Zhou X, Xia J, Ryan C, Thrash B, Menter A, et al. Deep sequencing of small RNAs from human skin reveals major alterations in the psoriasis miRNAome. *Hum Mol Genet*. 2011 Oct 15;20(20):4025-40.
342. Morin RD, O'Connor MD, Griffith M, Kuchenbauer F, Delaney A, Prabhu AL, et al. Application of massively parallel sequencing to microRNA profiling and discovery in human embryonic stem cells. *Genome Res*. 2008 Apr;18(4):610-21.
343. Wang HJ, Zhang PJ, Chen WJ, Jie D, Dan F, Jia YH, et al. Characterization and Identification of novel serum microRNAs in sepsis patients with different outcomes. *Shock*. 2013 Jun;39(6):480-7.
344. Persson H, Kvist A, Rego N, Staaf J, Vallon-Christersson J, Luts L, et al. Identification of new microRNAs in paired normal and tumor breast tissue suggests a dual role for the ERBB2/Her2 gene. *Cancer Res*. 2011 Jan 1;71(1):78-86.
345. Smith JL, Grey FE, Uhrlaub JL, Nikolich-Zugich J, Hirsch AJ. Induction of the cellular microRNA, Hs_154, by West Nile virus contributes to virus-mediated apoptosis through repression of antiapoptotic factors. *J Virol*. 2012 May;86(9):5278-87.

346. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, Richards KL, Dunphy CH, Choi WW, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood*. 2010 Dec 2;116(23):e118-27.
347. Creighton CJ, Benham AL, Zhu H, Khan MF, Reid JG, Nagaraja AK, et al. Discovery of novel microRNAs in female reproductive tract using next generation sequencing. *PLoS One*. 2010 Mar 10;5(3):e9637.
348. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*. 2007 Jun 29;129(7):1401-14.
349. Stark MS, Tyagi S, Nancarrow DJ, Boyle GM, Cook AL, Whiteman DC, et al. Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing. *PLoS One*. 2010 Mar 12;5(3):e9685.
350. Lui WO, Pourmand N, Patterson BK, Fire A. Patterns of known and novel small RNAs in human cervical cancer. *Cancer Res*. 2007 Jul 1;67(13):6031-43.
351. Yoo JK, Kim J, Choi SJ, Noh HM, Kwon YD, Yoo H, et al. Discovery and characterization of novel microRNAs during endothelial differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells Dev*. 2012 Jul 20;21(11):2049-57.
352. Liao JY, Ma LM, Guo YH, Zhang YC, Zhou H, Shao P, et al. Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers. *PLoS One*. 2010 May 14;5(5):e10563.
353. Ple H, Landry P, Benham A, Coarfa C, Gunaratne PH, Provost P. The repertoire and features of human platelet microRNAs. *PLoS One*. 2012;7(12):e50746.
354. Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, Liechti A, Weier M, Guschanski K, et al. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Res*. 2013 Jan;23(1):34-45.
355. Harris T, Jimenez L, Kawachi N, Fan JB, Chen J, Belbin T, et al. Low-level expression of miR-375 correlates with poor outcome and metastasis while altering the invasive properties of head and neck squamous cell carcinomas. *Am J Pathol*. 2012 Mar;180(3):917-28.
356. de Carvalho AC, Scapulatempo-Neto C, Maia DC, Evangelista AF, Morini MA, Carvalho AL, et al. Accuracy of microRNAs as markers for the detection of neck lymph node metastases in patients with head and neck squamous cell carcinoma. *BMC Med*. 2015 May 9;13:108,015-0350-3.
357. Yang CN, Deng YT, Tang JY, Cheng SJ, Chen ST, Li YJ, et al. MicroRNA-29b regulates migration in oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. *Oral Oncol*. 2014 Nov 27.

358. Lin F, Yao L, Xiao J, Liu D, Ni Z. MiR-206 functions as a tumor suppressor and directly targets K-Ras in human oral squamous cell carcinoma. *Onco Targets Ther.* 2014 Sep 11;7:1583-91.
359. Ma XP, Zhang T, Peng B, Yu L, Jiang de K. Association between microRNA Polymorphisms and Cancer Risk Based on the Findings of 66 Case-Control Studies. *PLoS One.* 2013 Nov 20;8(11):e79584.
360. Chu YH, Tzeng SL, Lin CW, Chien MH, Chen MK, Yang SF. Impacts of microRNA gene polymorphisms on the susceptibility of environmental factors leading to carcinogenesis in oral cancer. *PLoS One.* 2012;7(6):e39777.
361. Ma H, Yuan H, Yuan Z, Yu C, Wang R, Jiang Y, et al. Genetic variations in key microRNA processing genes and risk of head and neck cancer: a case-control study in Chinese population. *PLoS One.* 2012;7(10):e47544.
362. Kumar B, Yadav A, Lang J, Teknos TN, Kumar P. Dysregulation of microRNA-34a expression in head and neck squamous cell carcinoma promotes tumor growth and tumor angiogenesis. *PLoS One.* 2012;7(5):e37601.
363. Yen YC, Shiah SG, Chu HC, Hsu YM, Hsiao JR, Chang JY, et al. Reciprocal regulation of microRNA-99a and insulin-like growth factor I receptor signaling in oral squamous cell carcinoma cells. *Mol Cancer.* 2014 Jan 10;13:6,4598-13-6.
364. Bourguignon LY. Hyaluronan-mediated CD44 activation of RhoGTPase signaling and cytoskeleton function promotes tumor progression. *Semin Cancer Biol.* 2008 Aug;18(4):251-9.
365. Mishra M, Naik VV, Kale AD, Ankola AV, Pilli GS. Perlecan (basement membrane heparan sulfate proteoglycan) and its role in oral malignancies: an overview. *Indian J Dent Res.* 2011 Nov-Dec;22(6):823-6.
366. Flowers SA, Zhou X, Wu J, Wang Y, Makambi K, Kallakury BV, et al. Expression of the extracellular sulfatase SULF2 is associated with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oncotarget.* 2016 May 20.
367. He M, Zhou Z, Shah AA, Hong Y, Chen Q, Wan Y. New insights into posttranslational modifications of Hippo pathway in carcinogenesis and therapeutics. *Cell Div.* 2016 Mar 31;11:4,016-0013-6. eCollection 2016.
368. Janse van Rensburg HJ, Yang X. The roles of the Hippo pathway in cancer metastasis. *Cell Signal.* 2016 Aug 9;28(11):1761-72.
369. Chen S, Fisher RC, Signs S, Molina LA, Shenoy AK, Lopez MC, et al. Inhibition of PI3K/Akt/mTOR signaling in PI3KR2-overexpressing colon cancer stem cells reduces tumor growth due to apoptosis. *Oncotarget.* 2016 Jun 8.

370. Uesugi A, Kozaki K, Tsuruta T, Furuta M, Morita K, Imoto I, et al. The tumor suppressive microRNA miR-218 targets the mTOR component Rictor and inhibits AKT phosphorylation in oral cancer. *Cancer Res.* 2011 Sep 1;71(17):5765-78.
371. Jensen DH, Dabelsteen E, Specht L, Fiehn AM, Therkildsen MH, Jonson L, et al. Molecular profiling of tumour budding implicates TGFbeta-mediated epithelial-mesenchymal transition as a therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 2015 Aug;236(4):505-16.
372. Languino LR, Singh A, Prisco M, Inman GJ, Luginbuhl A, Curry JM, et al. Exosome-mediated transfer from the tumor microenvironment increases TGFbeta signaling in squamous cell carcinoma. *Am J Transl Res.* 2016 May 15;8(5):2432-7.
373. Mitra SK, Hanson DA, Schlaepfer DD. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jan;6(1):56-68.
374. Beavon IR. The E-cadherin-catenin complex in tumour metastasis: structure, function and regulation. *Eur J Cancer.* 2000 Aug;36(13 Spec No):1607-20.
375. Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol.* 2012;2012:681469.
376. Yang CC, Hung PS, Wang PW, Liu CJ, Chu TH, Cheng HW, et al. miR-181 as a putative biomarker for lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2011 May;40(5):397-404.
377. Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol.* 2007 Jun;9(6):654-9.
378. de Antonellis P, Liguori L, Falanga A, Carotenuto M, Ferrucci V, Andolfo I, et al. MicroRNA 199b-5p delivery through stable nucleic acid lipid particles (SNALPs) in tumorigenic cell lines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2013 Apr;386(4):287-302.
379. Burns KE, McCleerey TP, Thevenin D. pH-Selective Cytotoxicity of pHLIP-Antimicrobial Peptide Conjugates. *Sci Rep.* 2016 Jun 23;6:28465.
380. Piao L, Zhang M, Datta J, Xie X, Su T, Li H, et al. Lipid-based nanoparticle delivery of Pre-miR-107 inhibits the tumorigenicity of head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Ther.* 2012 Jun;20(6):1261-9.
381. Jiang CS, Wang XM, Zhang SQ, Meng LS, Zhu WH, Xu J, et al. Discovery of 4-benzoylamino-N-(prop-2-yn-1-yl) benzamides as novel microRNA-21 inhibitors. *Bioorg Med Chem.* 2015 Oct 1;23(19):6510-9.
382. Tiwari A, Shivananda S, Gopinath KS, Kumar A. MicroRNA-125a Reduces Proliferation and Invasion of Oral Squamous Cell Carcinoma Cells by Targeting Estrogen-related Receptor

alpha: IMPLICATIONS FOR CANCER THERAPEUTICS. J Biol Chem. 2014 Nov 14;289(46):32276-90.





8. Anexos





8.1 Aprobación del comité de ética.

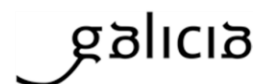






XUNTA DE GALICIA
CONSELLERÍA DE SANIDADE
Secretaría Xeral Técnica

Secretaría Técnica
Comité Autonómico de Ética da Investigación de Galicia
Secretaría Xeral, Consellería de Sanidade
Edificio Administrativo San Lázaro
15703 SANTIAGO DE COMPOSTELA
Tel: 881 546425; ceic@sergas.es



DITAME DO COMITÉ DE ÉTICA DA INVESTIGACIÓN DE SANTIAGO-LUGO

Juan Manuel Vázquez Lago, Secretario do Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo

CERTIFICA:

Que este Comité avaliou na súa reunión do día 21/04/2015 o estudo:

Título: Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas (COCE)

Promotor: Mario Pérez-Sayáns García

Tipo de estudo: Outros

Código de Rexistro: 2015/132

E, tomando en consideración as seguintes cuestións:

- A pertinencia do estudo, tendo en conta o coñecemento dispoñible, así coma os requisitos legais aplicables, e en particular a Lei 14/2007, de investigación biomédica, o Real Decreto 1716/2011, de 18 de novembro, polo que se establecen os requisitos básicos de autorización e funcionamento dos biobancos con fins de investigación biomédica e do tratamento das mostras biolóxicas de orixe humana, e se regula o funcionamento e organización do Rexistro Nacional de Biobancos para investigación biomédica, a ORDE SAS/3470/2009, de 16 de decembro, pola que se publican as Directrices sobre estudos Posautorización de Tipo Observacional para medicamentos de uso humano, e a Circular nº 07/2004, investigacións clínicas con produtos sanitarios.
- A idoneidade do protocolo en relación cos obxectivos do estudo, xustificación dos riscos e molestias previsibles para o suxeito, así coma os beneficios esperados.
- Os principios éticos da Declaración de Helsinki vixente.
- Os Procedementos Normalizados de Traballo do Comité.

Emite un **INFORME FAVORABLE** para a realización do estudo polo/a investigador/a do centro:

Centros	Investigadores Principais
Universidade de Santiago	Mario Pérez-Sayáns García

En Santiago de Compostela, a 21 de abril de 2015

O secretario

NOMBRE
VAZQUEZ LAGO
JUAN MANUEL
NIF 44829259M

Firmado digitalmente por
NOMBRE VAZQUEZ LAGO JUAN
MANUEL - NIF 44829259M
Nombre de reconocimiento (DN):
cn=ES, ou=FNMT, ou=FNMT Clase 2
CA, ou=501090161, cn=NOMBRE
VAZQUEZ LAGO JUAN MANUEL -
NIF 44829259M
Fecha: 2015.04.24 10:40:56 +02'00'

Juan M. Vázquez Lago





8.2 Consentimiento informado de los casos en gallego.





FOLLA DE INFORMACIÓN AO PARTICIPANTE ADULTO/A**TÍTULO DO ESTUDO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas**INVESTIGADOR *Mario Pérez-Sayáns García*

CÓDIGO DO ESTUDO: 651011815-01-15

CENTRO: Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía. Facultade de Odontoloxía da USC

Este documento ten por obxecto facilitarlle información sobre un estudo de investigación no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo.

Se decide participar neste, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre este. Se así o desexa, pode levar o documento, consúltalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vostede pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen ter que dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á súa relación co médico nin á asistencia sanitaria á que vostede ten dereito.

¿Cal é o propósito do estudo?

O propósito deste estudo é demostrar que no tecido canceroso de pacientes con carcinoma oral de células escamosas existen uns marcadores (microRNAs) específicos que poderían axudarnos a predecir o pronóstico do cancro así como as súas características clínicas (por exemplo resistencia ou non a determinados tratamentos con quimioterapia).

¿Por que me ofrecen participar a min?

Vostede é convidado a participar porque padece un carcinoma oral de células escamosas.

¿En que consiste a miña participación?

Tomaremos unha mostra do tecido canceroso dun tamaño de 5mm x 5mm extraído durante a biopsia ou cirurxía de resección.

O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada

¿Que molestias ou inconvenientes ten?

As molestias que poida notar verían derivadas máis da cirurxía de resección que da toma da mostra en sí mesma. No caso da biopsia que é de obrigatoria para o diagnóstico do cancro, as molestias serían hemorraxia, que ceden por si mesmas, sensación de malestar na zona e dor.

¿Obterei algún beneficio por participar?

Non se espera que vostede obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir a diferenza de expresión dos marcadores específicos, microRNAs, no carcinoma oral de células escamosas con respecto ó tecido san.

¿Recibirei a información que se obteña do estudo?

Se vostede deséxao, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo. Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispoñer deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

¿Publicaranse os resultados deste estudo?

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

¿Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, do 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal. En todo momento, vostede poderá acceder aos seus datos, corríxilos ou cancelalos, solicitándoo ante o investigador.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Pódese transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados ata finalizar o estudo de modo: Codificados, que quere dicir que posúen un código co que o equipo investigador poderá coñecer a quen pertencen.

O responsable da custodia dos datos e mostras é Mario Pérez-Sayáns García, e o lugar de realización das análises previstas neste estudo é Facultade de Odontoloxía. Máster de Medicina Oral. Cirurxía Oral e Implantoloxía e Departamento de Anatomía Patolóxica do Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán Anonimizadas, é dicir, que rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doadora da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.

¿Existen intereses económicos neste estudo?

Esta investigación é promovida polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Implantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC con fondos achegados polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Implantoloxía da Facultade de Odontoloxía da USC
O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.
Vostede non será retribuído por participar.

¿Como contactar co equipo investigador deste estudo?

Vostede pode contactar con Mario Pérez-Sayáns García no teléfono 981563100 Extensión12357 ou correo electrónico perezsayans@gmail.com

Moitas grazas pola súa colaboración

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: **Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas.**

Eu, _____

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: _____ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podó retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante, Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____

Data:

Data:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN (para os casos nos que o participante non poida leer/escribir)

O testigo imparcial identificaráse e será unha persoa axena ao equipo investigador

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas

Eu _____, como testigo imparcial, afirmo que en miña presenza:

- Léuselle _____ a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se lle entregou, e poido facer todas as preguntas sobre o estudo.
- Comprendo que a súa participación é voluntaria, e que pode retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accede a que se utilicen os seus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto a la conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudo

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante, Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____

Data:

Data:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas

Eu, _____, representante legal de
_____):

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: _____ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podoo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante, Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____

Data:

Data:



8.3 Consentimiento informado de los casos en castellano.





HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DEL ESTUDIO: EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE microRNAs EN EL CARCINOMA ORAL DE CELULAS ESCAMOSAS

INVESTIGADOR *Mario Pérez-Sayáns García*

CÓDIGO DEL ESTUDIO: 651011815-01-15

CENTRO: Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Facultad de Odontología de la USC.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un **estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, **leer antes este documento** y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea, puede llevar el documento, consultarlo con otras personas, y tomar el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es el propósito del estudio?

El propósito de este estudio es demostrar que en el tejido canceroso de pacientes con carcinoma oral de células escamosas existen unos marcadores (microRNAs) específicos que podrían ayudarnos a predecir el pronóstico del cáncer así como sus características clínicas (por ejemplo resistencia o no a determinados tratamientos con quimioterapia).

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque padece un carcinoma oral de células escamosas.

¿En qué consiste mi participación?

Se le tomará una muestra del tejido canceroso de un tamaño de 5 mm x 5mm que se extraiga durante la biopsia o cirugía de resección.

El investigador puede decidir finalizar el estudio antes de lo previsto o interrumpir a su participación. En todo caso se le informará de los motivos de su retirada.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

Las molestias que pueda notar vendrán derivadas más de la cirugía de resección que de la toma de la muestra en sí.

En cuanto a la biopsia que es obligada para el diagnóstico del COCE, las molestias incluyen hemorragias, que ceden por sí mismas, sensación de malestar en la zona y dolor.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir la diferencia de expresión de los marcadores específicos, microRNAs, en el carcinoma oral de células escamosas con respecto al tejido normal. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Ud. podrá acceder a sus datos, corregirlos o cancelarlos, solicitándolo ante el investigador

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo: **Codificados**, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es *Mario Pérez-Sayáns García*, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es *Facultad de Odontología. Máster de Medicina Oral. Cirugía Oral e Implología y Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago de Compostela*.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán **Anonimizadas**, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de la muestra, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación es promovida por el Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implología de la Facultad de Odontología de la USC con fondos aportados por Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implología de la Facultad de Odontología de la USC

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con *Mario Pérez-Sayáns García* en el teléfono. nº teléfono 981563100 Ext. 12357 o correo electrónico perezsayans@gmail.com

Muchas gracias por su colaboración

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: **Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas**

Yo, _____

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con: _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
- *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la participante, Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos: _____

Fecha: _____

Fecha: _____

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN (para los casos en los que el participante no pueda leer/escribir)

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas

Yo _____, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó _____ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedió a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/a testigo Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos: _____

Fecha:

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas

Yo, _____, representante legal de
_____):

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.*

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la representante legal, Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos: _____

Fecha:

Fecha:



8.4 Consentimiento informado de los controles en gallego.





FOLLA DE INFORMACIÓN AO PARTICIPANTE ADULTO/A

TÍTULO DO ESTUDO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas

INVESTIGADOR *Mario Pérez-Sayáns García*

CÓDIGO DO ESTUDO: 651011815-01-15

CENTRO: Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Implantoloxía. Facultade de Odontoloxía da USC

Este documento ten por obxecto facilitarlle información sobre un estudo de investigación no que se lle invita a participar. Este estudo foi aprobado polo Comité de Ética da Investigación de Santiago-Lugo.

Se decide participar neste, debe recibir información personalizada do investigador, ler antes este documento e facer todas as preguntas que precise para comprender os detalles sobre este. Se así o desexa, pode levar o documento, consúltalo con outras persoas, e tomar o tempo necesario para decidir se participar ou non.

A participación neste estudo é completamente voluntaria. Vostede pode decidir non participar ou, se acepta facelo, cambiar de parecer retirando o consentimento en calquera momento sen ter que dar explicacións. Asegurámoslle que esta decisión non afectará á súa relación co médico nin á asistencia sanitaria á que vostede ten dereito.

¿Cal é o propósito do estudo?

O propósito deste estudo é demostrar que no tecido canceroso de pacientes con carcinoma oral de células escamosas existen uns marcadores (microRNAs) específicos que poderían axudarnos a predecir o pronóstico do cancro así como as súas características clínicas (por exemplo resistencia ou non a determinados tratamentos con quimioterapia).

¿Por que me ofrecen participar a min?

Vostede é convidado a participar porque é un grupo control xa que non padece un carcinoma oral de células escamosas.

¿En que consiste a miña participación?

Durante a extracción do cordal (mola do xuízo) tomarase un trozo de tecido que rodea á mola dun tamaño de 5 mm x 5 mm.

O investigador pode decidir finalizar o estudo antes do previsto ou interromper a súa participación. En todo caso informaráselle dos motivos da súa retirada

¿Que molestias ou inconvenientes ten?

Os efectos secundarios que pode presentar durante a toma da mostra da enxiva que rodea á mola son mínimos, xa que aproveítase o proceso da extracción. As molestias que puidera notal verían derivadas máis da cirurxía da extracción que da toma de mostra en si.

¿Obtereire algún beneficio por participar?

Non se espera que vostede obteña beneficio directo por participar no estudo. A investigación pretende descubrir a diferenza de expresión dos marcadores específicos, microRNAs, no carcinoma

oral de células escamosas con respecto ó tecido san.

¿Recibirei a información que se obteña do estudo?

Se vostede deséxao, facilitaráselle un resumo dos resultados do estudo. Tamén poderá recibir os resultados das probas que se realicen coas súas mostras se así o solicita dirixíndose ao investigador. Estes resultados poden non ter aplicación clínica nin unha interpretación clara, polo que, se quere dispoñer deles, deberían ser comentados co médico do estudo.

¿Publicaranse os resultados deste estudo?

Os resultados deste estudo serán remitidos a publicacións científicas para a súa difusión, pero non se transmitirá ningún dato que poida levar á identificación dos participantes.

¿Como se protexerá a confidencialidade dos meus datos e mostras?

O tratamento, comunicación e cesión dos seus datos farase conforme ao disposto pola Lei Orgánica 15/1999, do 13 de decembro, de protección de datos de carácter persoal. En todo momento, vostede poderá acceder aos seus datos, corrixilos ou cancelalos, solicitándoo ante o investigador.

Só o equipo investigador, e as autoridades sanitarias, que teñen deber de gardar a confidencialidade, terán acceso a todos os datos recollidos polo estudo. Pódese transmitir a terceiros información que non poida ser identificada. No caso de que algunha información sexa transmitida a outros países, realizarase cun nivel de protección dos datos equivalente, como mínimo, ao esixido pola normativa do noso país.

Os seus datos e mostras biolóxicas serán recollidos e conservados ata finalizar o estudo de modo: Codificados, que quere dicir que posúen un código co que o equipo investigador poderá coñecer a quen pertencen.

O responsable da custodia dos datos e mostras é Mario Pérez-Sayáns García, e o lugar de realización das análises previstas neste estudo é Facultade de Odontoloxía. Máster de Medicina Oral. Cirurxía Oral e Implatology e Departamento de Anatomía Patolóxica do Hospital Clínico de Santiago de Compostela.

Ao rematar o estudo, conforme ao RD 1716/2011, as súas mostras biolóxicas serán Anonimizadas, é dicir, que rompeu todo vínculo que poida identificar a persoa doadora da mostra, non podendo ser identificado nin sequera polo equipo investigador.

¿Existen intereses económicos neste estudo?

Esta investigación é promovida polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxia da Facultade de Odontoloxia da USC con fondos achegados polo Máster de Medicina Oral, Cirurxía Oral e Impantoloxía da Facultade de Odontoloxia da USC
O investigador non recibirá retribución específica pola dedicación ao estudo.
Vostede non será retribuído por participar.

¿Como contactar co equipo investigador deste estudo?

Vostede pode contactar con Mario Pérez-Sayáns García no teléfono 981563100 Extensión12357 ou correo electrónico perezsayans@gmail.com

Moitas grazas pola súa colaboración

DOCUMENTO DE CONSENTIMENTO PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN**TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas**

Eu, _____

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: _____ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podó retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante, Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____

Data:

Data:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN (para os casos nos que o participante non poida leer/escribir)

O testigo imparcial identificaráse y será unha persoa axena ao equipo investigador

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas

Eu _____, como testigo imparcial, afirmo que en miña presenza:

- Léuselle _____ a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se lle entregou, e poido facer todas as preguntas sobre o estudo.
- Comprendo que a súa participación é voluntaria, e que pode retirarse do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accede a que se utilicen os seus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto a la conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudo

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante, Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____

Data:

Data:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA A PARTICIPACIÓN NUN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs no Carcinoma Oral de Células Escamosas

Eu, _____, representante legal de
_____):

- Lin a folla de información ao participante do estudo arriba mencionado que se me entregou, puiden conversar con: _____ e facer todas as preguntas sobre o estudo necesarias.
- Comprendo que a miña participación é voluntaria, e que podoo retirarme do estudo cando queira, sen ter que dar explicacións e sen que isto repercuta nos meus coidados médicos.
- Accedo a que se utilicen os meus datos e mostras nas condicións detalladas na folla de información ao participante.
- Presto libremente a miña conformidade para participar neste estudo.

Respecto á conservación e utilización DAS MOSTRAS recollidas neste estudio

- Non accedo a que sexan conservadas unha vez rematado o estudo.
- Accedo a que sexan conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/A participante, Fdo.: O/A investigador/a que solicita o consentimento

Nome e apelidos: _____

Nome e apelidos: _____

Data:

Data:



8.5 Consentimiento informado de los controles en castellano.





HOJA DE INFORMACIÓN AL/LA PARTICIPANTE ADULTO/A**TÍTULO DEL ESTUDIO: Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas**

INVESTIGADOR *Mario Pérez-Sayáns García*

CÓDIGO DEL ESTUDIO: 651011815-01-15

CENTRO: Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implantología. Facultad de Odontología de la USC.

Este documento tiene por objeto facilitarle información sobre un **estudio de investigación** en el que se le invita a participar. Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Investigación de Santiago-Lugo.

Si decide participar en el mismo, debe recibir información personalizada del investigador, **leer antes este documento** y hacer todas las preguntas que precise para comprender los detalles sobre el mismo. Si así lo desea, puede llevar el documento, consultarlo con otras personas, y tomar el tiempo necesario para decidir si participar o no.

La participación en este estudio es completamente **voluntaria**. Ud. puede decidir no participar o, si acepta hacerlo, cambiar de parecer retirando el consentimiento en cualquier momento sin tener que dar explicaciones. Le aseguramos que esta decisión no afectará a su relación con el médico ni a la asistencia sanitaria a la que Ud. tiene derecho.

¿Cuál es el propósito del estudio?

El propósito de este estudio es demostrar que en el tejido canceroso de pacientes con carcinoma oral de células escamosas existen unos marcadores (microRNAs) específicos que podrían ayudarnos a predecir el pronóstico del cáncer así como sus características clínicas (por ejemplo resistencia o no a determinados tratamientos con quimioterapia).

¿Por qué me ofrecen participar a mí?

Ud. es invitado a participar porque es un grupo control ya que no padece un carcinoma de oral de células escamosas.

¿En qué consiste mi participación?

Durante la extracción del cordal (muela de juicio) se tomará un trozo del tejido que rodea la muela de un tamaño de 5 mm x 5 mm.

¿Qué molestias o inconvenientes tiene?

Los efectos secundarios que puede presentar durante la toma de la muestra de la encía que rodea al cordal son mínimos ya que se aprovecha el proceso de extracción de éste (con anestesia local). Las molestias que pueda notar vendrán derivadas más de la cirugía de la extracción que de la toma de la muestra en sí.

¿Obtendré algún beneficio por participar?

No se espera que Ud. obtenga beneficio directo por participar en el estudio. La investigación pretende descubrir aspectos desconocidos o poco claros sobre la metilación en el cáncer de cabeza y cuello. Esta información podrá ser de utilidad en un futuro para otras personas.

¿Recibiré la información que se obtenga del estudio?

Si Ud. lo desea, se le facilitará un resumen de los resultados del estudio.

También podrá recibir los resultados de las pruebas que se realicen con sus muestras si así lo solicita dirigiéndose al investigador. Estos resultados pueden no tener aplicación clínica ni una interpretación clara, por lo que, si quiere disponer de ellos, deberían ser comentados con el médico del estudio.

¿Se publicarán los resultados de este estudio?

Los resultados de este estudio serán remitidos a publicaciones científicas para su difusión, pero no se transmitirá ningún dato que pueda llevar a la identificación de los participantes.

¿Cómo se protegerá la confidencialidad de mis datos y muestras?

El tratamiento, comunicación y cesión de sus datos se hará conforme a lo dispuesto por la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de protección de datos de carácter personal. En todo momento, Ud. podrá acceder a sus datos, corregirlos o cancelarlos, solicitándolo ante el investigador

Solo el equipo investigador, y las autoridades sanitarias, que tienen el deber de guardar la confidencialidad, tendrán acceso a todos los datos recogidos por el estudio. Se puede transmitir a terceros información que no pueda ser identificada. En el caso de que alguna información sea transmitida a otros países, se realizará con un nivel de protección de los datos equivalente, como mínimo, al exigido por la normativa de nuestro país.

Sus datos y muestras biológicas serán recogidos y conservados hasta finalizar el estudio de modo: **Codificados**, que quiere decir que poseen un código con el que el equipo investigador podrá conocer a quien pertenecen.

El responsable de la custodia de los datos y muestras es *Mario Pérez-Sayáns García*, y el lugar de realización de los análisis previstos en este estudio es *Facultad de Odontología. Máster de Medicina Oral. Cirugía Oral e Implología y Departamento de Anatomía Patológica del Hospital Clínico de Santiago de Compostela*.

Al terminar el estudio, conforme al RD 1716/2011, sus muestras biológicas serán **Anonimizadas**, es decir, que se rompió todo vínculo que pueda identificar a la persona donante de la muestra, no pudiendo ser identificado ni siquiera por el equipo investigador.

¿Existen intereses económicos en este estudio?

Esta investigación es promovida por el Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implología de la Facultad de Odontología de la USC con fondos aportados por Máster de Medicina Oral, Cirugía Oral e Implología de la Facultad de Odontología de la USC

El investigador no recibirá retribución específica por la dedicación al estudio.

Ud. no será retribuido por participar.

¿Cómo contactar con el equipo investigador de este estudio?

Ud. puede contactar con *Mario Pérez-Sayáns García* en el teléfono. nº teléfono 981563100 Ext. 12357 o correo electrónico perezsayans@gmail.com

Muchas gracias por su colaboración

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: **Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas**

Yo, _____

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con: _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio necesarias.*
- *Comprendo que mi participación es voluntaria, y que puedo retirarme del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en mis cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen mis datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para participar en este estudio.*

Respecto a la conservación DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la participante, Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos: _____

Fecha:

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO ANTE TESTIGOS PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN (para los casos en los que el participante no pueda leer/escribir)

El testigo imparcial ha de identificarse y ser una persona ajena al equipo investigador

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas

Yo _____, como testigo imparcial, afirmo que en mi presencia:

- Se le leyó _____ la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se le entregó, y pudo hacer todas las preguntas sobre al estudio.
- Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.
- Accede a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.
- Presta libremente su conformidad para participar en este estudio.

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedió a que sean conservadas una vez terminado el estudio.
- Accedió a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: O/a testigo Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos: _____

Fecha:

Fecha:

DOCUMENTO DE CONSENTIMIENTO PARA REPRESENTANTE LEGAL PARA LA PARTICIPACIÓN EN UN ESTUDO DE INVESTIGACIÓN

TÍTULO: Expresión diferencial de microRNAs en el Carcinoma Oral de Células Escamosas

Yo, _____, representante legal de
_____):

- *Leí la hoja de información al participante del estudio arriba mencionado que se me entregó, pude conversar con _____ y hacer todas las preguntas sobre el estudio.*
- *Comprendo que su participación es voluntaria, y que puede retirarse del estudio cuando quiera, sin tener que dar explicaciones y sin que esto repercuta en sus cuidados médicos.*
- *Accedo a que se utilicen sus datos y muestras en las condiciones detalladas en la hoja de información al participante.*
- *Presto libremente mi conformidad para que participe en este estudio.*

Respecto a la conservación e utilización DE LAS MUESTRAS recogidas en este estudio

- No accedo a que sean conservadas una vez terminado el estudio
- Accedo a que sean conservadas anonimizadas.

Fdo.: El/la representante legal, Fdo.: El/la investigador/a que solicita el consentimiento

Nombre y apellidos: _____

Nombre y apellidos: _____

Fecha:

Fecha:

