



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Trabajo Fin de Grado

Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# MICRORNAS COMO NUEVA HERRAMIENTA DIAGNÓSTICA EN DLBCL

Autor:

Eduardo Martínez de la Puente Molina

Directora:

África García-Orad Carles

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL).....	1
1.2. MicroRNAs: Procesamiento y función .....	1
1.3. Implicación de los microRNAs en cáncer .....	2
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	3
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	4
3.1. Búsqueda bibliográfica.....	4
3.2. Criterios de inclusión/exclusión y extracción de datos.....	4
3.3. Criterios de clasificación de los miRNAs desregulados.....	5
3.4. Búsqueda de rutas de señalización .....	5
4. RESULTADOS .....	5
4.1. Selección de artículos sobre miRNAs en DLBCL con utilidad diagnóstica .....	5
4.2. Extracción de datos de los artículos seleccionados .....	6
4.3. Definición de una firma de miRNAs asociada al diagnóstico del DLBCL.....	8
4.4. Asociación <i>in silico</i> de miRNAs con rutas implicadas en el desarrollo tumoral.....	9
5. DISCUSIÓN .....	9
6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS .....	12
7. AGRADECIMIENTOS .....	13
8. BIBLIOGRAFÍA .....	13
9. MATERIAL SUPLEMENTARIO.....	16

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Linfoma difuso de células B grandes (DLBCL)

El linfoma difuso de células B grandes, también conocido por sus siglas en inglés como DLBCL (*Diffuse large B-cell lymphoma*), es uno de los más de 50 tipos diferentes de linfomas descritos por la Organización Mundial de la Salud. Estos, abarcan un conjunto de tumores del tejido linfático muy heterogéneos tanto desde el punto de vista clínico, como morfológico o molecular, aunque presentan características solapadas (Sun *et al.*, 2016). En base a estas diferencias cada tipo de linfoma requiere de un tratamiento específico. En el caso del DLBCL, lo habitual es el régimen terapéutico R-CHOP que incluye rituximab (R), ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona (CHOP) (Shankland *et al.*, 2012).

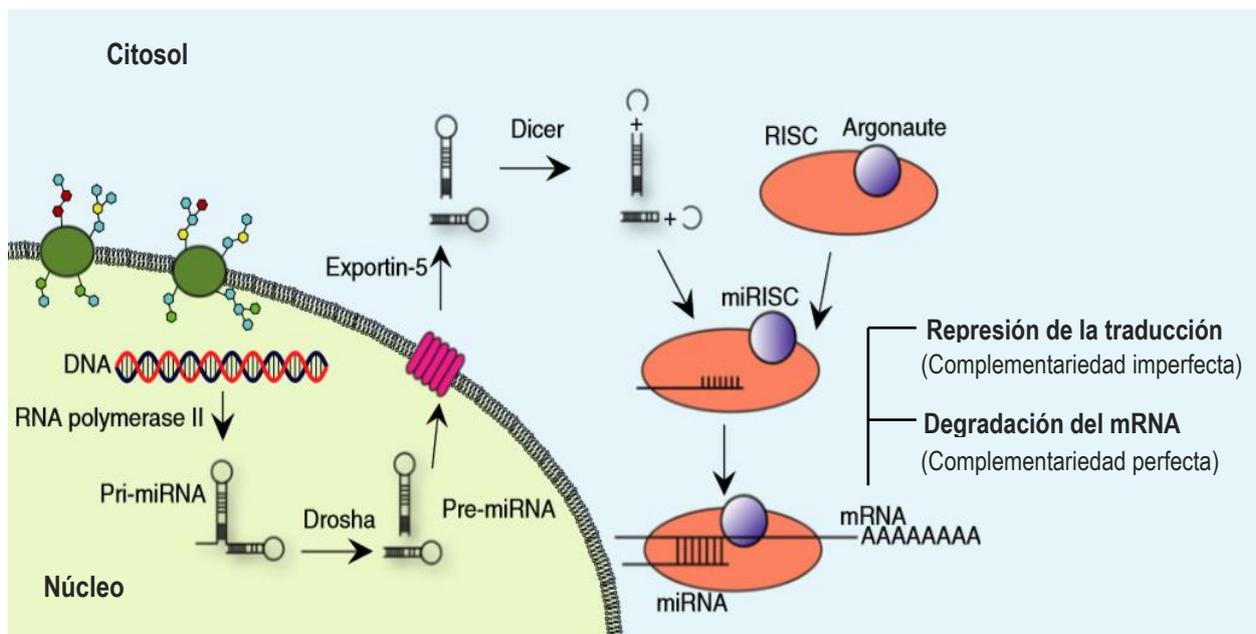
El DLBCL representa el 30-40% de linfomas no Hodgkin en adultos. Es un linfoma agresivo, cuya célula precursora es el linfocito B maduro. Posee una incidencia del 6,3%, y a pesar de poder afectar a cualquier edad y sexo, generalmente ocurre en varones entre los 60 y 70 años. (Teras *et al.*, 2013).

Clínicamente se presenta como una neoplasia ganglionar de rápido crecimiento. El 40% posee una afectación extraganglionar, siendo el tracto digestivo el más frecuentemente afectado. La mayoría de los DLBCL no genera clínica, pero un tercio de los pacientes suele presentar síntomas B como fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna (Teras *et al.*, 2013).

El diagnóstico del DLBCL se realiza mediante la eliminación de una porción del tumor a través de una biopsia, y el posterior examen de este tejido bajo microscopía. Existen también herramientas como la detección inmunohistoquímica de los niveles de expresión de ciertas proteínas como CD19, CD20, CD22 y CD79a, factores de transcripción de célula B como PAX5, BOB.1 y OCT2, e inmunoglobulinas citoplasmáticas o de membrana como IgM, IgG e IgA (Loddenkemper *et al.*, 2004). No obstante, como se ha mencionado anteriormente, suele ser complicado discriminar el DLBCL de otros linfomas, por lo que el diagnóstico diferencial cobra especial relevancia para elegir el régimen terapéutico adecuado. Por lo tanto, se precisan de nuevos biomarcadores que ayuden a mejorar el diagnóstico de este tipo de linfoma. Entre estos nuevos marcadores, han surgido recientemente los microRNAs (miRNAs) (Sun *et al.*, 2016).

### 1.2. MicroRNAs: Procesamiento y función

Los miRNAs son RNAs no codificantes de unos 18-25pb que tienen como función la regulación génica a nivel post-transcripcional mediante la unión específica por complementariedad de bases al RNA mensajero (mRNA) diana. Para ello, presentan una secuencia característica de unos 7 pb conocida como región semilla, la cual se une específicamente a la secuencia diana complementaria en la región 3' UTR silenciándola. De esta manera, los miRNAs son capaces de regular más del 50% de nuestros genes (Sana *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Descripción del procesamiento de miRNAs (Adaptado de Mashima 2015)

Los miRNAs se transcriben desde diferentes lugares del genoma mediante la RNA polimerasa II en transcritos primarios largos llamados pri-miRNAs (dsRNA, 300-5000 pb). Estos, se procesan en el núcleo celular por la ribonucleasa DHROSA obteniendo una estructura corta de 70 pb en forma de tallo-lazo (*stem-loop*) conocida como pre-miRNA, la cual se transporta al citoplasma a través de la exportina-5. Estos pre-miRNA son procesados a miRNA maduros en el citoplasma mediante la interacción con la ribonucleasa DICER, que elimina la región *loop* generando una molécula conocida como miRNA dúplex. El miRNA dúplex se separa para formar el miRNA maduro de una sola hebra. Depende de cuál de las dos hebras prevalezca en el procesamiento, las funciones y dianas de los miRNAs variarán; por ello se les da una nomenclatura diferencial con el sufijo 3p o 5p. La cadena seleccionada del dúplex de miRNA se incorpora al complejo multiproteico RISC que es el responsable del silenciamiento de genes (Gutiérrez 2016) (**Figura 1**).

El mecanismo de regulación depende del grado de complementariedad entre el miRNA y el mRNA. Se producirá la degradación del mRNA si la complementariedad es perfecta o bloqueo de la traducción en el caso del emparejamiento imperfecto (Ryan *et al.*, 2010). Dado que la región complementaria a la región semilla del miRNA es corta, un único miRNA puede reprimir a diferentes mRNA. Pero, también cabe la posibilidad de que un único gen sea regulado por diferentes miRNAs. (Friedman *et al.*, 2009).

### 1.3. Implicación de los microRNAs en cáncer

Entre los genes regulados por los miRNAs, se encuentran dianas de los 8 procesos característicos en el cáncer: proliferación incontrolada, crecimiento celular, evasión del sistema inmune, inflamación, invasión y metástasis, angiogénesis, resistencia a la muerte celular y desregulación de los procesos energéticos. Esto ha permitido acuñar los términos oncomir, que hace referencia a aquel miRNA que

sobre-expresado favorece la evolución del tumor; y miR supresor, miRNA que sub-expresado no bloquea la formación y desarrollo del tumor (Berindan-Neagoe *et al.*, 2014).

La asociación de los miRNAs con el cáncer parece evidente y es un tema que está adquiriendo gran importancia en los últimos años. Ya se han descrito firmas de miRNAs desregulados en diversos tipos de cáncer como el cáncer de pulmón, de próstata, pancreático, colorrectal o glioblastoma. Por ejemplo, la firma formada por miR-103, miR-148b, miR-328, miR-484, miR-874, miR-93 y miR-1307 tiene valor pronóstico en cáncer de mama o la firma formada por miR-484, miR-642 y miR-217 se ha asociado a la respuesta al tratamiento con platino en cáncer de ovario (Berindan-Neagoe *et al.*, 2014).

Distintos miRNAs se han asociado al origen de linfomas como miR-15a, miR-16-1, miR-155 o el *cluster* miR-17-92; pero el DLBCL presenta el patrón de expresión de miRNAs más heterogéneo de todos los linfomas (Caramuta *et al.*, 2013). A día de hoy, diferentes estudios han tratado de arrojar luz sobre este asunto sin alcanzar un consenso e incluso obteniendo resultados contradictorios.

Por tanto, es necesario establecer un patrón o firma de expresión de miRNAs desregulados con utilidad diagnóstica en DLBCL.

## **2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

Considerando lo anteriormente expuesto se plantea la existencia de una firma de miRNAs específica para el diagnóstico del DLBCL que permita mejorar la detección de este linfoma y dar una explicación biológica que relacione los miRNAs desregulados de la firma con el origen y desarrollo del tumor.

El objetivo general de este trabajo será, por tanto, definir dicho patrón de miRNAs característicos para el diagnóstico de DLBCL a través de la búsqueda bibliográfica y corroborar la implicación de dichos miRNAs en la patología. Para alcanzar este objetivo se plantean los siguientes objetivos específicos:

- Detectar los estudios sobre el DLBCL y miRNAs asociados a su diagnóstico mediante una revisión sistemática de la literatura.
- Definir de la firma de miRNAs desregulados más significativos con utilidad diagnóstica en el DLBCL a través de la extracción y selección de datos.
- Encontrar rutas de señalización en las que los miRNAs de la firma descrita se encuentran implicados mediante una búsqueda informática.
- Señalar la importancia biológica de estas rutas y su posible relevancia en el desarrollo del linfoma con el apoyo de dianas validadas experimentalmente.

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Búsqueda bibliográfica

Se realizó una búsqueda sistemática con el fin de identificar todos los estudios publicados en la literatura que analizaran la expresión de miRNAs en el DLBCL. La búsqueda se realizó en la base de datos Pubmed utilizando los 5 motores de búsqueda siguientes:

- *Non-coding RNA AND (Diffuse large B cell lymphoma OR DLBCL)*
- *(miRNA OR microRNA OR miR) AND (Diffuse large B cell lymphoma OR DLBCL)*
- *Exosome AND (Diffuse large B cell lymphoma OR DLBCL)*
- *Extracellular vesicle AND (Diffuse large B cell lymphoma OR DLBCL)*
- *Secretome AND (Diffuse large B cell lymphoma OR DLBCL)*

Última actualización, enero de 2018.

Todos los artículos obtenidos en la búsqueda fueron revisados uno a uno mediante lectura inicial del resumen.

#### 3.2. Criterios de inclusión/exclusión y extracción de datos

Los artículos fueron incluidos si evaluaban la expresión de miRNAs en muestras de tumor clasificándolos como biomarcadores para diagnóstico, pronóstico y subtipo en DLBCL en población humana. El presente trabajo se centró concretamente en la utilidad diagnóstica de los miRNAs.

Tras la lectura de todos los resúmenes se excluyeron revisiones, metaanálisis, *case report*, *letters*, *comments* y artículos no publicados en inglés. Tampoco se incluyeron aquellos estudios que no contenían datos humanos sino de ratones o líneas celulares, no analizaban expresión de miRNAs o se centraban en otras enfermedades distintas al DLBCL.

Después de esta criba, se procedió a la lectura completa de los artículos elegidos y se descartaron aquellos que analizaban miRNAs circulantes en suero o plasma, estudiaban linfomas derivados de la infección por EBV (*Epstein Barr virus*) o HIV (*Human immunodeficiency virus*), DLBCL no primarios, comparaban la expresión de miRNAs en muestras FF (*Fresh Frozen*) y FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*), estudiaban metilación de miRNAs, aberraciones cromosómicas o polimorfismos. Finalmente se revisaron las referencias de los artículos incluidos con el fin de identificar posibles nuevos artículos elegibles.

De los estudios seleccionados se extrajo la siguiente información: autor y año de publicación, total de miRNAs analizados, miRNAs significativos, muestras comparadas en el estudio, origen tisular de las muestras de DLBCL y control, número de muestras utilizadas y metodología de análisis de expresión de los miRNAs.

La búsqueda bibliográfica y la extracción de datos fueron realizadas por dos investigadores independientes (EM y BS). Las discrepancias se solventaron por consenso con la colaboración de un tercer investigador (AL).

### **3.3. Criterios de clasificación de los miRNAs desregulados**

La clasificación de los miRNAs desregulados se realizó siguiendo los siguientes criterios: (1) dado que los miRNAs 5p o 3p regulan distintos genes a pesar de proceder del mismo pre-miRNA se consideraron como miRNAs diferentes; (2) los sufijos a, b, c... denotan miRNAs maduros con secuencias muy parecidas, aunque proceden de distintos precursores y dado que regulan los mismos genes, se consideraron como uno único; (3) los miRNAs con la misma localización cromosómica presentan una regulación conjunta por lo que también se consideraron como un único miRNA.

Finalmente, para definir la firma de miRNAs se consideraron aquellos miRNAs que estuvieran regulados de la misma manera (sobrexpresados (*UP*) o subexpresados (*DOWN*)) en 4 artículos o más.

### **3.4. Búsqueda de rutas de señalización**

Una vez detectada la firma de miRNAs desregulados, se realizó una búsqueda *in silico* para determinar su relevancia biológica. Para ello, se buscaron todos los genes diana regulados por los miRNAs de la firma utilizando la base de datos miRWalk (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/miRwalk2/>) (Dweep *et al.*, 2015). Se seleccionaron los genes predichos por 7 o más algoritmos diferentes proporcionados por dicha base de datos. Esta lista de genes se utilizó para determinar si existe alguna ruta de señalización enriquecida en estas dianas utilizando la base de datos Consensus Path (CPdB) (<http://consensuspathdb.org/>) (Kamburov *et al.*, 2013). Concretamente se utilizó el módulo de análisis de sobre-representación enfrentando la lista de genes con la colección de rutas de las bases de datos KEGG, Reactome y BioCarta utilizando un p-valor de 0,0001.

## **4. RESULTADOS**

### **4.1. Selección de artículos sobre miRNAs en DLBCL con utilidad diagnóstica**

La revisión sistemática de la bibliografía permitió identificar un total de 503 publicaciones de las cuales 165 fueron descartadas por tratarse de duplicados.

Tras la lectura de los resúmenes de los 338 artículos iniciales se descartaron 239 que cumplían los criterios de exclusión anteriormente planteados. La lectura completa de los 99 manuscritos restantes permitió realizar una segunda criba en la que se excluyeron 61 artículos. Finalmente 38 publicaciones fueron seleccionadas para la extracción de datos y clasificadas en 3 grupos según su temática: 20 en Diagnóstico, 18 en Subtipo y 17 en Pronóstico; aunque algunos artículos realizaban estudios combinados (**Figura 2**).

Este trabajo se centró en el primer grupo con un total de 20 artículos sobre miRNAs desregulados en tumor en pacientes de DLBCL con utilidad diagnóstica.

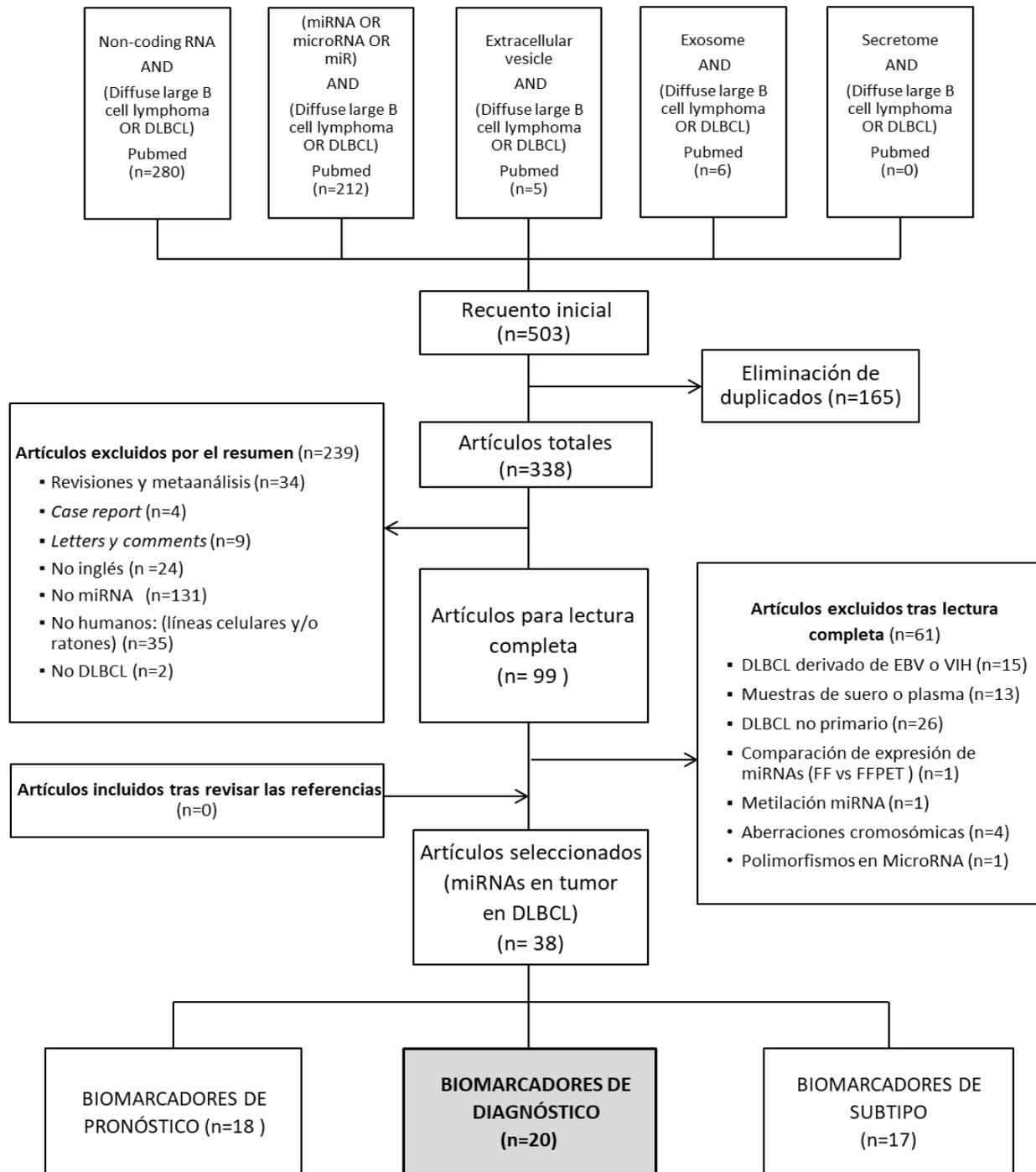


Figura 2. Diagrama de flujo de la revisión sistemática realizada.

#### 4.2. Extracción de datos de los artículos seleccionados

La extracción de datos de los 20 artículos mostró un total de 223 miRNAs desregulados significativamente en DLBCL en comparación con controles (Tabla Suplementaria 1). Sin embargo, el número de miRNAs estudiados en cada artículo fue muy variable, yendo desde un único miRNA hasta 800. En el caso de estudiar un número pequeño de miRNAs el método utilizado para analizar su

expresión fue la qRT-PCR (*quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*), mientras que cuando se estudió un número considerable de miRNAs se utilizaron *microarrays* de expresión. Por lo general, el número de muestras de DLBCL superó al número de controles en la mayoría de estudios. Los controles utilizados fueron muestras de tejido linfático ganglionar como bazo, amígdala, hiperplasia linfoide reactiva (RLH) nódulos linfáticos (LN) o células B; aunque en algunos casos no se indicaba la procedencia tisular de los controles en el manuscrito (**Tabla 1**).

**Tabla 1.** Información relevante de los 20 artículos incluidos que estudiaron la expresión de miRNAs con utilidad diagnóstica en muestras de tumor en DLBCL.

Referencia	miRNA analizados	miRNAs significativos	Comparación	DLBCL	Control	Método
Caramuta <i>et al.</i> , 2013	177	13	DLBCL vs. Control (LN y RLH)	n=75	n=6	Microarray + qRT-PCR
Di Lisio <i>et al.</i> , 2012	470	0	DLCBL vs. Control (RLH, amígdala y bazo)	n=29	n=15	Microarray + qRT-PCR
Eis <i>et al.</i> , 2005	1	1	DLBCL vs. Control (células B)	n=23	n=2	semi qRT-PCR
Fan <i>et al.</i> , 2016	1	1	DLBCL vs. Control (RLH)	n=9	n=9	qRT-PCR
Fassina <i>et al.</i> , 2012	8	8	DLBCL vs. Control (LN)	n=36	n=5	qRT-PCR
Go <i>et al.</i> , 2015	8	2 + cluster (6)	DLBCL vs. Control (Amígdala)	n=200	n=11	qRT-PCR
Handal <i>et al.</i> , 2013	4	2	DLBCL vs. Control	n=12	n=7	qRT-PCR
Huskova <i>et al.</i> , 2015	1	1	DLBCL vs. Control (RLH y células B)	n=22	n=6	qRT-PCR
Jia <i>et al.</i> , 2018	800	20	DLBCL vs. Control (RLH)	n=202	n=10	Microarray + qRT-PCR
Lawrie <i>et al.</i> , 2007	225	3	DLBCL vs. Control (Células B)	n=48	n=6	Microarray + qRT-PCR
Li <i>et al.</i> , 2017	1	1	DLBCL vs. Control (RLH)	n=29	n=32	qRT-PCR
Lim <i>et al.</i> , 2015	340	102	DLBCL vs. Control (Centroblastos)	n=92	n=15	Microarray + qRT-PCR
Liu <i>et al.</i> , 2017	1	1	DLBCL vs. Control	n=55	n=20	qRT-PCR
Ni <i>et al.</i> , 2015	1	1	DLBCL vs. Control	n=258	n=40	RT-PCR
Roehle <i>et al.</i> , 2008	157	15	DLBCL vs. Control (LN)	n=58	n=7	qRT-PCR
Song <i>et al.</i> , 2017	1	1	DLBCL vs. Control (LN)	n=26	n=10	qRT-PCR
Tamaddon <i>et al.</i> , 2016	>50	35	DLBCL vs. Control (RLH)	n=24	n=14	Microarray + qRT-PCR
Troppan <i>et al.</i> , 2015	11	7	DLBCL vs. Control (células B periféricas, centrales y RLH).	n=58	n=18	RT-PCR
Wang <i>et al.</i> , 2014	1	1	DLBCL vs. Control (RLH)	n=104	n=28	qRT-PCR
Zhong <i>et al.</i> , 2012	2	2	DLBCL vs. Control (RLH)	n=90	n=31	qRT-PCR

RLH: *Reactive Lymphoid Hyperplasia*, LN: *lymphatic node*, qRT-PCR: *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*.

### 4.3. Definición de una firma de miRNAs asociada al diagnóstico del DLBCL

Del total de miRNAs significativos encontrados en los diferentes estudios, se seleccionaron aquellos estudiados por 4 o más estudios y con idéntica regulación en todos ellos (**Tabla 2**).

**Tabla 2.** Firma de miRNAs significativamente desregulados de la misma forma en 4 o más estudios.

miRNA significativos	Localización	Regulación	DLBCL	Control	Referencia
<b>hsa-miR-155-5p</b>	chr21: 25573980-25574044 [+]	UP	n=75	n=6	Caramuta <i>et al.</i> , 2013
		UP	n=23	n=2	Eis <i>et al.</i> , 2005
		UP	n=200	n=11	Go <i>et al.</i> , 2015
		UP	n=22	n=6	Huskova <i>et al.</i> , 2015
		UP	n=48	n=6	Lawrie <i>et al.</i> , 2007
		UP	n=29	n=32	Li <i>et al.</i> , 2017
		UP	n=58	n=7	Roehle <i>et al.</i> , 2008
<b>Cluster hsa-miR-17-92</b>	chr13: 91350605-91350688 [+]	UP	n=200	n=11	Go <i>et al.</i> , 2015
		UP	n=58	n=7	Roehle <i>et al.</i> , 2008
		UP	n=24	n=14	Tamaddon <i>et al.</i> , 2016
		UP	n=36	n=5	Fassina <i>et al.</i> , 2012
		UP	n=24	n=14	Tamaddon <i>et al.</i> , 2016
		UP	n=36	n=5	Fassina <i>et al.</i> , 2012
		UP	n=24	n=14	Tamaddon <i>et al.</i> , 2016
<b>hsa-miR-21-5p</b>	chr17: 59841266-59841337 [+]	UP	n=75	n=6	Caramuta <i>et al.</i> , 2013
		UP	n=200	n=11	Go <i>et al.</i> , 2015
		UP	n=48	n=6	Lawrie <i>et al.</i> , 2007
		UP	n=55	n=20	Liu <i>et al.</i> , 2017
		UP	n=26	n=10	Song <i>et al.</i> , 2017
<b>hsa-miR-146a-5p</b>	chr5: 160485352-160485450 [+]	UP	n=90	n=31	Zhong <i>et al.</i> , 2012
		UP	n=24	n=14	Tamaddon <i>et al.</i> , 2016
<b>hsa-miR-146b-5p</b>	chr10: 102436512-102436584 [+]	UP	n=92	n=19	Lim <i>et al.</i> , 2015
		UP	n=24	n=14	Tamaddon <i>et al.</i> , 2016
<b>hsa-miR-150-5p</b>	chr19: 49500785-49500868 [-]	DOWN	n=75	n=6	Caramuta <i>et al.</i> , 2013
		DOWN	n=36	n=5	Fassina <i>et al.</i> , 2012
		UP	n=12	n=7	Handal <i>et al.</i> , 2013
		DOWN	n=58	n=7	Roehle <i>et al.</i> , 2008
		DOWN	n=202	n=10	Jia <i>et al.</i> , 2018

UP: sobreexpresado, DOWN: subexpresado.

A partir de estos resultados se pudo definir la firma de miRNAs formada por hsa-miR-155-5p, el *cluster* hsa-miR-17-92, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p/hsa-miR-146b-5p y hsa-miR-150-5p con utilidad diagnóstica en DLBCL.

#### 4.4. Asociación *in silico* de miRNAs con rutas implicadas en el desarrollo tumoral

La comprobación de la relevancia biológica de los miRNAs de la firma encontrada se realizó informáticamente. Entre las 10 rutas metabólicas más significativas se encontró la ruta de señalización de MAPK, la ruta de PIP3/AKT y la ruta de FOXO, relacionadas directamente con procesos tumorales. Según las predicciones computacionales, el conjunto de miRNAs de la firma es capaz de regular 5182 genes diferentes y aproximadamente el 50% de los genes de las 3 rutas mencionadas. La asociación de los miRNAs con las rutas está fuertemente apoyada por el p-valor y el q-valor.

**Tabla 3.** Rutas metabólicas significativas que incluyen genes regulados por los miRNAs de la firma, señalando las tres más relevantes en DLBCL.

Firma miRNAs	Total genes regulados	Nombre de la ruta	Genes de la ruta	Genes candidatos contenidos	p-valor	q-valor	Fuente
<b>-hsa-miR-155-5p</b> <i>-cluster</i> <b>hsa-miR-17-92</b> <b>(hsa-miR-17-5p)</b> <b>(hsa-mir-19b-3p)</b> <b>(hsa-miR-20a-5p)</b> <b>(hsa-miR-21-5p)</b> <b>-hsa-miR-146a-5p/</b> <b>hsa-miR-146b-5p</b> <b>-hsa-miR-150-5p</b>	5182	Axon guidance	357	166 (46.5%)	2.29e-15	4.72e-12	Reactome
		Intracellular signaling by second messengers	244	121 (49.6%)	5.47e-14	4.28e-11	Reactome
		Diseases of signal transduction	247	122 (49.4%)	6.21e-14	4.28e-11	Reactome
		Pathways in cancer - Homo sapiens (human)	526	219 (41.6%)	2.2e-13	1.14e-10	KEGG
		MAPK signaling pathway - Homo sapiens (human)	295	138 (46.8%)	3.08e-13	1.27e-10	KEGG
		Membrane Trafficking	582	234 (40.2%)	2.56e-12	8.8e-10	Reactome
		PIP3 activates AKT signaling	213	105 (49.3%)	4.1e-12	1.21e-09	Reactome
		Prostate cancer - Homo sapiens (human)	97	58 (59.8%)	1.5e-11	3.86e-09	KEGG
		Vesicle-mediated transport	620	243 (39.2%)	2.13e-11	4.89e-09	Reactome
		FoxO signaling pathway - Homo sapiens (human)	132	71 (53.8%)	8.39e-11	1.73e-08	KEGG

## 5. DISCUSIÓN

El objetivo del presente Trabajo de Fin de Grado ha sido encontrar un patrón o firma de miRNAs desregulados en DLBCL que permita mejorar su diagnóstico y además corroborar su implicación biológica en el origen y desarrollo del linfoma.

Partiendo de una búsqueda de 503 estudios se seleccionaron los 20 que analizaban la expresión de miRNAs como biomarcadores con utilidad diagnóstica en el DLBCL (**Figura 2**). Estos artículos presentan un alto número de miRNAs estudiados con bastante heterogeneidad en sus resultados y sin alcanzar un consenso en cuanto a qué miRNAs son más útiles para diagnosticar este tipo de linfoma. En conjunto estos estudios obtienen 223 miRNAs significativamente desregulados en el DLBCL en comparación con controles sanos (**Tabla 1**) (**Tabla Suplementaria 1**). Organizando esta información se encontró una firma de miRNAs desregulados en la misma dirección según más de 4 artículos formada

por hsa-miR-155-5p, el *cluster* hsa-miR-17-92, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p/hsa-miR-146b-5p y hsa-miR-150-5p (**Tabla 2**). Además se observó que estos miRNAs en su conjunto, según las predicciones informáticas realizadas, regulan alrededor de la mitad de los genes implicados en 3 rutas importantes en carcinogénesis. Estas son la ruta de MAPK, la ruta de PI3K/AKT y la ruta de FOXO; implicadas en procesos de proliferación celular, crecimiento y apoptosis (**Tabla 3**).

A continuación se discute individualmente la relevancia de cada uno de los miRNAs de la firma con genes de las rutas predichas implicadas en el origen y desarrollo tumoral del DLBCL con el apoyo de algunas dianas validadas experimentalmente.

**Hsa-miR-155-5p** es el miRNA cuya sobreexpresión está apoyada por más estudios, concretamente 8. Entre las dianas validadas para este miRNA se encuentran *SHIP1* o *C/EBPβ*, reguladores negativos de la ruta PI3K/AKT. De esta forma, la acción inhibitoria de hsa-miR-155-5p reduce la expresión de estos genes lo cual causa una sobreactivación de las rutas PI3K/AKT y MAPK y en última instancia aumenta la proliferación y crecimiento celular (Due *et al.*, 2016). Otra diana de hsa-miR-155-5p es *PI3KR1* que es un represor de la ruta PI3K/AKT (Jardin y Figeac 2013); por lo que inhibiéndolo se conseguiría un efecto sinérgico de activación de la vía PI3K/AKT junto a las anteriores dianas mencionadas. Por otra parte, hsa-miR-155-5p es capaz de actuar sobre *HGAL*, un inhibidor de la motilidad en linfocitos, por lo que la sobreexpresión de este oncomir también promovería la migración celular dando lugar a linfomas más agresivos (Due *et al.*, 2016).

Adicionalmente se ha demostrado que una subexpresión de hsa-miR-155-5p tiene efectos antitumorales e inhibe la progresión del linfoma arrojando el ciclo celular en fase G0/G1 y promoviendo la apoptosis (Zhu *et al.*, 2016). Esto parece indicar un posible uso terapéutico para el tratamiento de DLBCL. De hecho, recientemente se han obtenido resultados prometedores en la remisión de esta patología en ratones utilizando anti-miR-155 para reducir la sobreexpresión de hsa-miR-155-5p (Babar *et al.*, 2012).

**Hsa-miR-21-5p** aparece sobreexpresado en 5 artículos independientes.

Entre las dianas validadas para este miRNA se encuentran *FOXO1* y *PTEN*. FOXO1 pertenece a la familia factores de transcripción FOX implicados en la regulación del ciclo celular y promoviendo la apoptosis, especialmente regulando la expresión de *BIM*, un gen proapoptótico. PTEN, por su parte, es un regulador negativo de la ruta de PI3K/AKT. Por lo tanto, la inhibición FOXO1 y PTEN por parte de hsa-miR-21-5p induce la proliferación y la resistencia a la muerte celular programada (Go *et al.*, 2015).

Estudios *in vivo* en modelos de ratón con expresión inducible de miR-21 ya han demostrado el papel oncogénico de este miRNA. Se ha observado que los niveles elevados de hsa-miR-21-5p inducen un estado de pre-linfoma maligno de células B mientras que su inactivación produce la regresión total del tumor por vía apoptótica (Medina *et al.*, 2010).

También se ha tratado de inhibir hsa-miR-21-5p mediante la transfección con anti-miR-21 obteniendo resultados positivos en células DLBCL *in vitro* al suprimir la proliferación celular y la invasión, así como al incrementar la apoptosis (Gu *et al.*, 2010)

**Hsa-miR-17-92** es un *cluster* formado por 6 miRNAs (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-18a-5p, hsa-miR-19a-3p, hsa-miR-20a-5p, hsa-miR-19b-3p, and hsa-miR-92a-1-5p) que presentan una localización cromosómica cercana y una regulación conjunta. Individualmente 6 estudios encuentran diferencias significativas de algún miembro de este *cluster* (hsa-miR-17-5p, hsa-miR-20a-5p y hsa-miR-19b-3p) entre muestras de DLBCL y controles y un estudio adicional apoya estos resultados indicando una sobreexpresión del *cluster* completo (Go *et al.*, 2015).

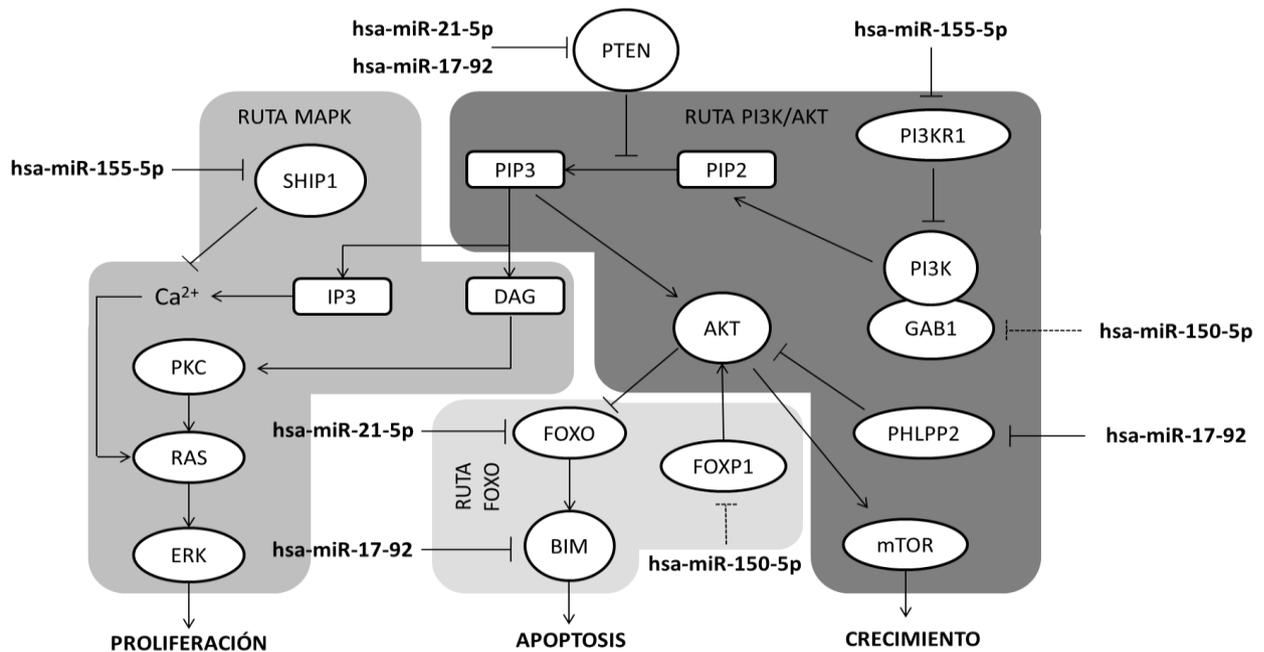
Este *cluster* es capaz de reducir la expresión del gen proapoptótico *BIM* y también actúa sobre *PTEN* (Mazan Mamczaraz y Gartenhaus 2013) (Chan 2010) con efectos similares a los descritos para hsa-miR-21. Otra de las dianas validadas para este miRNA es el gen *PHLPP2* que codifica para una fosfatasa de la vía PI3K/AKT (Musilova *et al.*, 2015). La reducción de la expresión de *PHLPP2* por parte de hsa-miR-17-92, inhibe la desfosforilación de AKT manteniéndolo activo; AKT, a su vez, es capaz de llevar a cabo su acción inhibitoria fosforilando a FOXO que finalmente verá reducida su actividad transcriptora de genes proapoptóticos como *BIM*. De esta forma se puede ver una regulación de *BIM* de forma directa e indirecta que en última instancia llevaría a la resistencia a la apoptosis habitual en el DLBCL.

**Hsa-mir-146a-5p** y **hsa-mir-146b-5p** aparecen sobreexpresados en 4 estudios. No se ha encontrado ninguna referencia que relacione la presencia de estos miRNAs con el origen del DLBCL, aunque sí se sabe que tiene relación con procesos del sistema inmune (Testa *et al.*, 2017). También se conoce que niveles bajos de este miRNA se relacionan con un peor pronóstico y respuesta al tratamiento en DLBCL (Wu *et al.*, 2014). Esto puede parecer contradictorio en relación a los resultados obtenidos, sin embargo el patrón de expresión de miRNAs puede cambiar en los diferentes estadios del tumor.

**Hsa-miR-150-5p** se encuentra subexpresado en 4 artículos y sobreexpresado en uno. (Handal *et al.*, 2013). Esta contradicción podría ser debida a que este último artículo utiliza un tamaño muestral muy pequeño, por lo que se decidió mantener este miRNA como parte de la firma.

Entre las dianas validadas experimentalmente para hsa-mir-150-5p se encuentran *FOXPI* y *GAB1* (Musilova *et al.*, 2015). *FOXPI* ha sido descrito como un supresor tumoral en algunos tejidos, aunque parece actuar como oncogén en el caso de DLBCL promoviendo el desarrollo tumoral (Katoh *et al.*, 2013). Por lo tanto los niveles bajos de miR-150 no podrán inhibir esta última función de FOXPI lo cual es consistente con los resultados de subexpresión obtenidos para este miRNA. Por otra parte, la no represión de *GAB1* producida por niveles bajos de este miR supresor de tumores, permite la activación de la vía PI3K/AKT aumentando la proliferación celular y evitando la apoptosis (Seda *et al.*, 2015).

Las dianas, rutas, y procesos regulados por la firma de miRNAs definida en el presente trabajo (hsa-miR-155-5p, hsa-miR-17-92, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p/hsa-miR-146b-5p y hsa-miR-150-5p), quedan englobados en la **Figura 3**.



**Figura 3.** Dianas, rutas y procesos celulares regulados por los miRNAs de la firma.

## 6. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Los miRNA de la firma (hsa-miR-155-5p, el *cluster* hsa-miR-17-92, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p/hsa-miR-146b-5p y hsa-miR-150-5p) han demostrado presentar dianas validadas relacionadas con las rutas MAPK, PI3K/AKT y FOXO implicadas en procesos de proliferación celular, apoptosis y crecimiento. Por lo tanto, los resultados experimentales publicados parecen corroborar la importancia de las 3 rutas predichas *in silico* en la caracterización DLBCL.

Además, la sobreexpresión o subexpresión de dichos miRNAs es coherente con el desarrollo tumoral esperado, es decir, los miRNAs con función de oncomir (hsa-miR-155-5p, el *cluster* hsa-miR-17-92, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p/hsa-miR-146b-5p) se encuentran *UP* y los miRNAs con función de miR supresor tumoral (hsa-miR-150-5p) se encuentran *DOWN*. Esto indica que estos miRNAs en su conjunto efectivamente están relacionados con el origen del DLBCL.

Por tanto, la firma de miRNAs (hsa-miR-155-5p, hsa-miR-17-92, hsa-miR-21-5p, hsa-miR-146a-5p/hsa-miR-146b-5p y hsa-miR-150-5p), encontrada tras la revisión sistemática, extracción y organización de datos, podría tener utilidad en el diagnóstico de este linfoma.

Conocidos estos miRNAs y su función, revertirlos a sus niveles normales mediante terapia génica sería una estrategia interesante para el tratamiento del DLBCL en humanos que ya ha demostrado tener resultados prometedores en modelos animales.

De cara al futuro, gracias al presente trabajo, ya existe una línea de investigación abierta para validar la utilidad diagnóstica de esta firma en muestras de DLBCL tomadas en el País Vasco. Para ello se pretende utilizar la técnica RNASeq con el fin de analizar los niveles de expresión de los miRNAs. También se busca ampliar la firma de miRNAs desregulados en este tipo de cáncer con el objetivo de mejorar la comprensión del desarrollo del linfoma y la implicación de los miRNAs en el mismo.

Además, nuestro grupo de investigación actualmente se encuentra analizando la implicación de la expresión de miRNAs desregulados para distinguir subtipos de DLBCL, conocer su grado de agresividad, anticipar la posibilidad de recaída, predecir un mejor o peor pronóstico y la respuesta al tratamiento, y en definitiva intentar mejorar la calidad de vida de pacientes oncológicos con DLBCL.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Agradezco al grupo de investigación de A. García-Orad el haberme posibilitado la realización de este trabajo en su laboratorio y los conocimientos transmitidos. Asimismo, me gustaría dar también las gracias a la UPV/EHU por permitirme disponer de sus instalaciones y a la Asociación Española Contra el Cáncer (AECC) por la concesión de la beca del Programa de Prácticas de Laboratorio 2017-2018.

## 8. BIBLIOGRAFIA

- Babar IA, Cheng CJ, Booth CJ, Liang X, Weidhaas JB, Saltzman WM, Slack FJ. 2012. Nanoparticle-based therapy in an in vivo microRNA-155 (miR-155)-dependent mouse model of lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109(26):E1695-1704.
- Berindan-Neagoe I, Monroig P, Pasculli B, Calin GA. 2014. MicroRNAome genome: A treasure for cancer diagnosis and therapy. *CA Cancer J Clin*. 64(5):311-336.
- Caramuta S, Lee L, Ozata DM, Akçakaya P, Georgii-Hemming P, Xie H, Amini RM, Lawrie CH, Enblad G, Larsson C, Berglund M, Lui WO. 2013. Role of microRNAs and microRNA machinery in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma. *Blood Cancer J*. 3:e152.
- Chan WJ. 2010. Pathogenesis of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Hematol*. 92(2):219-230.
- Di Lisio L, Sánchez-Beato M, Gómez-López G, Rodríguez ME, Montes-Moreno S, Mollejo M, Menárguez J, Martínez MA, Alves FJ, Pisano DG, Piris MA, Martínez N. 2012. MicroRNA signatures in B-cell lymphomas. *Blood Cancer J*. 2(2):e57.
- Due H, Svendsen P, Bødker JS, Schmitz A, Bøgsted M, Johnsen HE, El-Galaly TC, Roug AS, Dybkær K. 2016. miR-155 as a Biomarker in B-Cell Malignancies. *Biomed Res Int*. 2016:9513037.
- Dweep H, Gretz N. 2015. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat Methods*. 12(8):697.
- Eis PS, Tam W, Sun L, Chadburn A, Li Z, Gomez MF, Lund E, Dahlberg JE. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102(10):3627-3632.
- Fan Q, Meng X, Liang H, Zhang H, Liu X, Li L, Li W, Sun W, Zhang H, Zen K, Zhang CY, Zhou Z, Chen X, Ba Y. 2016. miR-10a inhibits cell proliferation and promotes cell apoptosis by targeting BCL6 in diffuse large B-cell lymphoma. *Protein Cell*. 7(12):899-912.
- Fassina A, Marino F, Siri M, Zambello R, Ventura L, Fassan M, Simonato F, Cappellesso R. 2012. The miR-17-92 microRNA cluster: a novel diagnostic tool in large B-cell malignancies. *Lab Invest*. 92(11):1574-1582.
- Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 19(1):92-105.
- Go H, Jang JY, Kim PJ, Kim YG, Nam SJ, Paik JH, Kim TM, Heo DS, Kim CW, Jeon YK. 2015. MicroRNA-21 plays an oncogenic role by targeting FOXO1 and activating the PI3K/AKT pathway in diffuse large B-cell lymphoma. *Oncotarget*. 6(17):15035-15049.

- Gu L, Song G, Chen L, Nie Z, He B, Pan Y, Xu Y, Li R, Gao T, Cho WC, Wang S. 2013. Inhibition of miR-21 induces biological and behavioral alterations in diffuse large B-cell lymphoma. *Acta Haematol.* 130(2):87-94.
- Gutiérrez A. 2016. Genetic variants involved in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Susceptibility. Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal. Facultad de Medicina y Odontología.
- Handal B, Enlow R, Lara D, Bailey M, Vega F, Hu P, Lennon A. 2013. Investigating the Expression of Oncogenic and Tumor Suppressive MicroRNA in DLBCL. *J Assoc Genet Technol.* 39(1):14-20.
- Huskova H, Korecka K, Karban J, Vargova J, Vargova K, Dusilkova N, Trneny M, Stopka T. 2015. Oncogenic microRNA-155 and its target PU.1: an integrative gene expression study in six of the most prevalent lymphomas. *Int J Hematol.* 102(4):441-450.
- Jardin F, Figeac M. 2013. MicroRNAs in lymphoma, from diagnosis to targeted therapy. *Curr Opin Oncol.* 25(5):480-486.
- Jia YJ, Liu ZB, Wang WG, Sun CB, Wei P, Yang YL, You MJ, Yu BH, Li XQ1, Zhou XY. 2018. HDAC6 regulates microRNA-27b that suppresses proliferation, promotes apoptosis and target MET in diffuse large B-cell lymphoma. *Leukemia.* 32(3):703-711.
- Kamburov A, Stelzl U, Lehrach H, Herwig R. 2013. The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res.* 41(Database issue):D793-800.
- Katoh M, Igarashi M, Fukuda H, Nakagama H, Katoh M. 2013 Cancer genetics and genomics of human FOX family genes. *Cancer Lett.* 328(2):198-206.
- Lawrie CH, Soneji S, Marafioti T, Cooper CD, Palazzo S, Paterson JC, Cattan H, Enver T, Mager R, Boulwood J, Wainscoat JS, Hatton CS. 2007. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer.* 121(5):1156-1161.
- Li XD, Li XM, Gu JW, Sun XC. 2017. MiR-155 regulates lymphoma cell proliferation and apoptosis through targeting SOCS3/JAK-STAT3 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 21(22):5153-5159.
- Lim EL, Trinh DL, Scott DW, Chu A, Krzywinski M, Zhao Y, Robertson AG, Mungall AJ, Schein J, Boyle M, Mottok A, Ennishi D, Johnson NA, Steidl C, Connors JM, Morin RD, Gascoyne RD, Marra MA. 2015. Comprehensive miRNA sequence analysis reveals survival differences in diffuse large B-cell lymphoma patients. *Genome Biol.* 16(1):1-18.
- Liu K, Du J, Ruan L. 2017. MicroRNA-21 regulates the viability and apoptosis of diffuse large B-cell lymphoma cells by upregulating B cell lymphoma-2. *Exp Ther Med.* 14(5):4489-4496.
- Loddenkemper C, Anagnostopoulos I, Hummel M, Jöhrens-Leder K, Foss HD, Jundt F, Wirth T, Dörken B, Stein H. 2004. Differential Emu enhancer activity and expression of BOB.1/OBF.1, Oct2, PU.1, and immunoglobulin in reactive B-cell populations, B-cell non-Hodgkin lymphomas, and Hodgkin lymphomas. *J Pathol.* 202(1):60-69.
- Mashima R. 2015. Physiological roles of miR-155. *Immunology.* 145(3):323-333.
- Mazan-Mamczarz K, Gartenhaus RB. 2013. Role of microRNA deregulation in the pathogenesis of diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL). *Leuk Res.* 37(11):1420-1428.
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ. 2010. OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature.* 467(7311):86-90.

- Musilova K, Mraz M. 2015. MicroRNAs in B-cell lymphomas: how a complex biology gets more complex. *Leukemia*. 29(5):1004-1017.
- Ni H, Wang X, Liu H, Tian F, Song G. 2015. Low expression of miRNA-224 predicts poor clinical outcome in diffuse large B-cell lymphoma treated with R-CHOP. *Biomarkers*. 20(4):253-257.
- Roehle A, Hoefig KP, Repsilber D, Thorns C, Ziepert M, Wesche KO, Thiery M, Loeffler M, Klapper W, Pfreundschuh M, Matolcsy A, Bernd HW, Reiniger L, Merz H, Feller AC. 2008. MicroRNA signatures characterize diffuse large B-cell lymphomas and follicular lymphomas. *Br J Haematol*. 142(5):732-744.
- Ryan BM, Robles AI, Harris CC. 2010. Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer*. 10(6):389-402.
- Sana J, Faltejiskova P, Svoboda M, Slaby O. 2012. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med* 10:103.
- Seda V, Mraz M. 2015. B-cell receptor signalling and its crosstalk with other pathways in normal and malignant cells. *Eur J Haematol*. 94(3):193-205.
- Shankland KR, Armitage JO, Hancock BW. 2012. Non-Hodgkin lymphoma. *Lancet*. 380(9844):848-857
- Song J, Shao Q, Li C, Liu H, Li J, Wang Y, Song W, Li L, Wang G, Shao Z, Fu R. 2017. Effects of microRNA-21 on apoptosis by regulating the expression of PTEN in diffuse large B-cell lymphoma. *Medicine*. 96(39):e7952.
- Sun R, Medeiros LJ, Young KH. 2016. Diagnostic and predictive biomarkers for lymphoma diagnosis and treatment in the era of precision medicine. *Mod Pathol*. 29(10):1118-1142.
- Tamaddon G, Geramizadeh B, Karimi MH, Mowla SJ, Abroun S. 2016. miR-4284 and miR-4484 as Putative Biomarkers for Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Iran J Med Sci*. 41(4):334-339.
- Teras LR, DeSantis CE, Cerhan JR, Morton LM, Jemal A, Flowers CR. 2016. 2016 US lymphoid malignancy statistics by World Health Organization subtypes. *CA Cancer J Clin* 66:443-459.
- Testa U, Pelosi E, Castelli G, Labbaye C. 2017. miR-146 and miR-155: Two Key Modulators of Immune Response and Tumor Development. *Noncoding RNA*. 3(3):1-22.
- Troppan K, Wenzl K, Pichler M, Pursche B, Schwarzenbacher D, Feichtinger J, Thallinger GG, Beham-Schmid C, Neumeister P, Deutsch A. 2015. miR-199a and miR-497 Are Associated with Better Overall Survival due to Increased Chemosensitivity in Diffuse Large B-Cell Lymphoma Patients. *Int J Mol Sci*. 16(8):18077-18095.
- Wang WL, Yang C, Han XL, Wang R, Huang Y, Zi YM, Li JD. 2014. MicroRNA-23a expression in paraffin-embedded specimen correlates with overall survival of diffuse large B-cell lymphoma. *Med Oncol*. 31(4):919.
- Wu P, Zhang XD, Zhu J, Guo XY, Wang JF. 2014. Low expression of microRNA-146b-5p and microRNA-320d predicts poor outcome of large B-cell lymphoma treated with cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, and prednisone. *Hum Pathol*. 45(8):1664-1673.
- Zhong H, Xu L, Zhong JH, Xiao F, Liu Q, Huang HH, Chen FY. 2012. Clinical and prognostic significance of miR-155 and miR-146a expression levels in formalin-fixed/paraffin-embedded tissue of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Exp Ther Med*. 3(5):763-770.
- Zhu FQ, Zeng L, Tang N, Tang YP, Zhou BP, Li FF, Wu WG, Zeng XB, Peng SS. 2016. MicroRNA-155 Downregulation Promotes Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Diffuse Large B-Cell Lymphoma. *Oncol Res*. 24(6):415-427.

## 9. MATERIAL SUPLEMENTARIO

**Tabla Suplementaria 1.** Listado de miRNAs significativamente desregulados con valor diagnóstico en DLBCL estudiados en los 20 artículos seleccionados.

Referencia	miRNA analizados	miRNAs significativos		Regulación
		(n)	Nombre	
<b>Caramuta et al., 2013</b>	177	13	miR-150	UP
			miR-155	DOWN
			miR-29b	DOWN
			miR-29a	DOWN
			miR-142-3p	UP
			miR-142-5p	UP
			miR-145	UP
			miR-143	UP
			miR-195	UP
			miR-497	DOWN
			miR-494	DOWN
			miR-638	DOWN
			miR-21	DOWN
<b>Di Lisio et al., 2012</b>	470	0	-	-
<b>Eis et al., 2005</b>	1	1	miR-155	UP
<b>Fan et al., 2016</b>	1	1	miR-10a	DOWN
<b>Fassina et al., 2012</b>	8	8	miR-106a	UP
			miR-150	UP
			miR-18b	UP
			miR-19b	UP
			miR-20a	UP
			miR-210	UP
			miR-92	UP
			miR-93	UP
<b>Go et al., 2015</b>	8	2+cluster(6)	miR-155	UP
			miR-17-92	UP
			miR-21	UP
<b>Handal et al., 2013</b>	4	2	miR-150	UP
			miR-16	DOWN
<b>Huskova et al., 2015</b>	1	1	miR-155	UP
<b>Jia et al., 2017</b>	800	20	miR-150-5p	DOWN
			miR-187-3p	UP
			miR-1915-3p	UP
			miR-1973	UP
			miR-200b-3p	DOWN
			miR-203	DOWN
			miR-205-5p	DOWN
			miR-27b	DOWN
			miR-3195	UP
			miR-342-3p	DOWN

<b>Jia et al., 2017</b>	800	20	miR-4284	UP
			miR-4485	UP
			miR-4508	UP
			miR-4516	UP
			miR-4532	UP
			miR-596	UP
			miR-636	UP
			miR-663a	UP
			miR-4488	UP
			miR-877-5p	UP
<b>Lawrie et al., 2007</b>	225	3	miR-155	UP
			miR-21	UP
			miR-221	UP
<b>Li et al., 2017</b>	1	1	miR-155	UP
<b>Lim et al., 2015</b>	340	102	let-7a-2	UP
			let-7b	UP
			let-7c	UP
			let-7e	UP
			mir-100	UP
			mir-10392-5p	DOWN
			mir-10393-3p	UP
			mir-10397-5p	DOWN
			mir-10a	UP
			mir-10b	UP
			mir-1247	UP
			mir-125a	UP
			mir-125b-2	UP
			mir-126	UP
			mir-126	UP
			mir-127	UP
			mir-127	UP
			mir-128-2	DOWN
			mir-129-2	DOWN
			mir-1301	UP
			mir-130a	UP
			mir-130b	DOWN
			mir-134	UP
			mir-136	UP
			mir-138-1	DOWN
			mir-138-1	DOWN
			mir-139	UP
			mir-143	UP
			mir-143	UP
			mir-144	UP
mir-145	UP			
mir-145	UP			

<b>Lim et al., 2015</b>	340	102	mir-146b	<i>UP</i>
			mir-146b	<i>UP</i>
			mir-151a	<i>DOWN</i>
			mir-15b	<i>DOWN</i>
			mir-17	<i>DOWN</i>
			mir-181a-1	<i>DOWN</i>
			mir-185	<i>DOWN</i>
			mir-195	<i>UP</i>
			mir-196a-2	<i>UP</i>
			mir-196b	<i>UP</i>
			mir-199a-2	<i>UP</i>
			mir-199a-2	<i>UP</i>
			mir-199b	<i>UP</i>
			mir-199b	<i>UP</i>
			mir-200b	<i>DOWN</i>
			mir-203a	<i>DOWN</i>
			mir-205	<i>DOWN</i>
			mir-20b	<i>DOWN</i>
			mir-20b	<i>DOWN</i>
			mir-214	<i>UP</i>
			mir-217	<i>UP</i>
			mir-218-2	<i>UP</i>
			mir-22	<i>UP</i>
			mir-22	<i>UP</i>
			mir-224	<i>UP</i>
			mir-23a	<i>DOWN</i>
			mir-27a	<i>DOWN</i>
			mir-28	<i>DOWN</i>
			mir-28	<i>DOWN</i>
			mir-3150b	<i>DOWN</i>
			mir-326	<i>UP</i>
			mir-331	<i>DOWN</i>
			mir-337	<i>UP</i>
			mir-338	<i>UP</i>
			mir-340	<i>UP</i>
			mir-34a	<i>UP</i>
			mir-3615	<i>DOWN</i>
			mir-362	<i>UP</i>
			mir-363	<i>DOWN</i>
			mir-3681	<i>DOWN</i>
			mir-379	<i>UP</i>
			mir-3917	<i>DOWN</i>
			mir-3934	<i>DOWN</i>
			mir-424	<i>UP</i>
			mir-4491	<i>DOWN</i>
			mir-450a-2	<i>UP</i>

<b>Lim et al., 2015</b>	340	102	mir-451a	UP
			mir-452	UP
			mir-455	UP
			mir-455	UP
			mir-4746	DOWN
			mir-486	DOWN
			mir-497	UP
			mir-503	UP
			mir-511-2	UP
			mir-542	UP
			mir-574	UP
			mir-582	DOWN
			mir-589	DOWN
			mir-616	DOWN
			mir-628	UP
			mir-629	DOWN
			mir-654	UP
			mir-675	UP
			mir-942	DOWN
			mir-99a	UP
mir-99b	UP			
NOVELM00113	DOWN			
NOVELM00288	DOWN			
NOVELM00290	DOWN			
<b>Liu et al., 2017</b>	1	1	miR-21	UP
<b>Ni et al., 2015</b>	1	1	miR-224	DOWN
<b>Roehle et al., 2008</b>	157	15	Let-7e	DOWN
			miR-106a	UP
			miR-10a	DOWN
			miR-139	DOWN
			miR-145	DOWN
			miR-149	DOWN
			miR-150	DOWN
			miR-151	DOWN
			miR-155	UP
			miR-17-5p	UP
			miR-210	UP
			miR-320	DOWN
			miR-328	DOWN
			miR-95	DOWN
			miR-99a	DOWN
<b>Song et al., 2017</b>	1	1	miR-21	UP
<b>Tamaddon et al., 2016</b>	>50	35	let-7g-5p	UP
			miR-101	DOWN
			miR-125b-5p	DOWN
			miR-142-3p	UP

<b>Tamaddon <i>et al.</i>, 2016</b>	>50	35	miR-142-5p	UP
			miR-143	DOWN
			miR-146a-5p	UP
			miR-146b-5p	UP
			miR-15a-5p	UP
			miR-16-5p	UP
			miR-17-5p	UP
			miR-19b-3p	UP
			miR-20a-5p	UP
			miR-21-5p	UP
			miR-23b-3p	UP
			miR-29a-3p	UP
			miR-29b-3p	UP
			miR-30c-1-3p	DOWN
			miR-3158-5p	DOWN
			miR-3182	UP
			miR-320a	DOWN
			miR-342-3p	UP
			miR-4284	UP
			miR-4301	UP
			miR-4484	DOWN
miR-451a	UP			
miR-4534	DOWN			
miR-4741	DOWN			
miR-4778-5p	DOWN			
miR-483-5p	DOWN			
miR-491-3p	UP			
miR-5571	DOWN			
miR-630-5p	DOWN			
miR-711	DOWN			
miR-7491	DOWN			
<b>Troppan <i>et al.</i>, 2015</b>	11	7	miR-103	UP
			miR-16-1*	UP
			miR-16-2*	UP
			miR-185	UP
			miR-199	UP
			miR-27a	UP
<b>Wang <i>et al.</i>, 2014</b>	1	1	miR-23a	UP
<b>Zhong <i>et al.</i>, 2012</b>	2	2	miR-146a	UP
			miR-155	UP

UP: sobreexpresado, DOWN: subexpresado