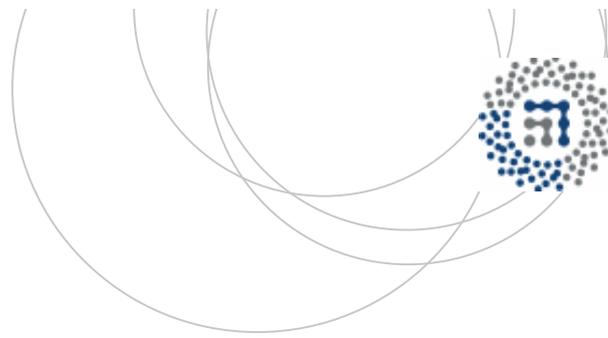


eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea



ZTF-FCT

Zientzia eta Teknologia Fakultates  
Facultad de Ciencia y Tecnología



---

Gradu Amaierako Lana / Trabajo Fin de Grado  
Biokimika eta Biologia Molekularra Gradua / Grado en Bioquímica y Biología Molecular

---

# **Variantes genéticas en miRNAs implicadas en la susceptibilidad a desarrollar Leucemia Linfática Crónica**

Egilea/Autor/a:  
Ander Díaz Navarro  
Zuzendaria/Director/a:  
Dra. África García-Orad Carles

# ÍNDICE

<b>1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>1</b>
1.1 LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA .....	1
1.2 GWAS EN LLC .....	1
1.3 VARIANTES EN MIRNAS EN LLC .....	2
1.4 HIPÓTESIS .....	3
1.5 OBJETIVOS .....	3
<b>2. DESARROLLO .....</b>	<b>3</b>
2.1 MATERIALES Y MÉTODOS .....	3
2.1.1 Selección de la muestra .....	3
2.1.2 Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs .....	4
2.1.3 Genotipado de los polimorfismos .....	4
2.1.4 Análisis estadístico .....	4
2.1.5 Análisis bioinformático .....	5
2.2 RESULTADOS .....	5
2.2.1 Características de la muestra .....	5
2.2.2 Resultados del genotipado .....	6
2.2.3 Estudio de asociación caso-control .....	6
2.2.4 Análisis bioinformático .....	8
2.3 DISCUSIÓN .....	9
<b>3. CONCLUSIONES .....</b>	<b>11</b>
<b>4. FUTUROS ESTUDIOS .....</b>	<b>12</b>
<b>5. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>13</b>

## 1. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

### 1.1 LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA

La Leucemia Linfática Crónica (LLC) es la leucemia más frecuente en adultos en los países occidentales. Se caracteriza por la acumulación de linfocitos B monomórficos pequeños en la sangre periférica, médula ósea, bazo y/o nódulos linfáticos (Swerdlow et al., 2008). La LLC es, de todas las neoplasias hematológicas, la que tiene un mayor componente genético (Goldin et al., 2010): los familiares de primer orden tienen un riesgo ~8.5 veces mayor de desarrollar la enfermedad (Goldin et al., 2009). Además, su alto componente genético está siendo confirmado en los estudios de asociación del genoma completo (GWAS, por sus siglas en inglés).

### 1.2 GWAS EN LLC

Los GWAS comparan variantes genéticas comunes a lo largo de todo el genoma entre pacientes y controles, con el objetivo de identificar su asociación con la enfermedad.

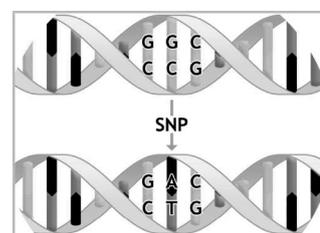


Figura 1. Ejemplo de un SNP.

Las variantes genéticas más frecuentes son los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, por sus siglas en inglés). Estos son sustituciones de un solo nucleótido (**Figura 1**), que ocurren con una frecuencia de 200-300 pares de bases (pb).

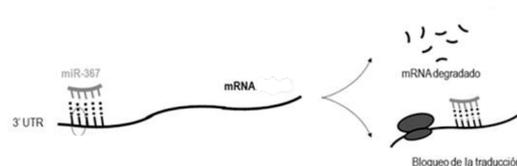
Gracias a los GWAS se han identificado múltiples loci asociados con la susceptibilidad a desarrollar LLC (Berndt et al., 2016), la mayoría de ellos localizados en regiones codificantes con una implicación funcional. Entre estos, el locus 6p25.3, que incluye el gen regulador de interferón 4 (*IRF4*), es el que ha demostrado una mayor asociación con la enfermedad ( $P=1,91 \times 10^{-20}$ ). Otros loci en regiones codificantes asociados con la susceptibilidad a desarrollar LLC son el 2q13, el 6p21.31 y el 16q24.1.

Sin embargo, el 39% de los SNPs más significativos, se encuentran en regiones intergénicas. En algunas de estas regiones ya se han identificado elementos reguladores que no codifican para proteínas, pero que pueden transcribirse, tal es el caso de LOC105370831 y CPEB1-AS1.

De hecho, desde la publicación del proyecto ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements*) se sabe que más del 80% del genoma se transcribe como elementos que no

codifican para proteínas llamados RNAs (acrónimo del inglés de *Ribonucleic acids*) no codificantes (ncRNAs, por sus siglas en inglés). Dentro de los ncRNAs, los microRNAs (miRNAs o miRs) son los que se han visto más estudiados y más asociados a cáncer (Sana et al., 2012).

Los miRNAs tienen como función la regulación génica a nivel post-transcripcional, mediante la unión específica al RNA mensajero (mRNA, por sus siglas en inglés) diana (Ryan et al., 2010), pudiendo causar la degradación o la represión de la transcripción de sus mRNAs diana (**Figura 2**). A través de este mecanismo, los miRNAs pueden regular hasta el 50% de los genes codificantes (Sana et al., 2012).

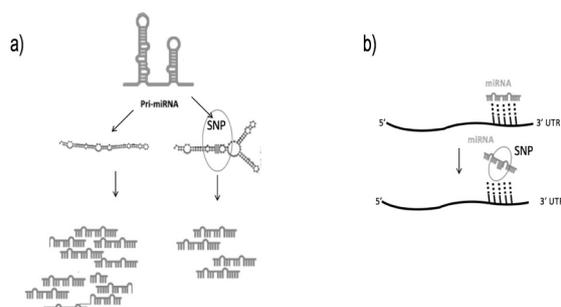


**Figura 2. Mecanismos de acción de los miRNA.**

### 1.3 VARIANTES EN MIRNAS EN LLC

Diversos estudios han mostrado asociación entre variantes genéticas en miRNAs y LLC (Calin et al., 2004; Wojcik et al., 2010), sugiriendo su implicación en la predisposición a desarrollar LLC.

Teóricamente, variantes genéticas que alteren los niveles de los miRNAs o su unión al mRNA podrían estar implicados en el desarrollo de la LLC. Estas variantes pueden estar localizadas bien en el pre-miRNA afectando a la estructura secundaria del mismo y a su procesamiento, lo que alteraría los niveles del miRNA (**Figura 3a**), o en el sitio de unión del miRNA (*seed*) afectando al acoplamiento con el mRNA y por tanto a su función (**Figura 3b**).



**Figura 3. Efecto de los SNPs en miRNAs:**

- a) Desregulación de los niveles de expresión del miRNA maduro.
- b) Alteración de la expresión del mRNA.

Apoyando esta hipótesis, un estudio reciente asoció los polimorfismos rs11614913 y rs2114358 en los pre-miRNAs miR196a2 y miR1206, respectivamente, con la

susceptibilidad a desarrollar LLC (Martin-Guerrero et al., 2015). A pesar de estas evidencias, hoy por hoy son muy pocos los miRNAs analizados en esta línea.

## **1.4 HIPÓTESIS**

Considerando lo anteriormente expuesto, se plantea la hipótesis de que variantes genéticas en pre-miRNAs que regulan genes implicados en el desarrollo de la LLC, pueden alterar su función aumentando el riesgo a desarrollar LLC.

## **1.5 OBJETIVOS**

El objetivo principal del estudio es identificar nuevos marcadores de riesgo en LLC, analizando variantes genéticas en pre-miRNAs que regulan genes implicados en el desarrollo de la LLC. Además vamos a intentar entender su papel en el desarrollo de la enfermedad.

Para ello, los objetivos específicos llevados a cabo son los siguientes:

1. Recolectar una amplia muestra de pacientes con LLC.
2. Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs con un  $MAF \geq 0,01$ .
3. Determinar el genotipo de los pacientes.
4. Definir las variantes genéticas en miRNAs asociadas a desarrollar LLC, mediante un estudio de asociación caso-control.
5. Definir genes y rutas afectadas por los miRNAs con variantes más significativas.

## **2. DESARROLLO**

### **2.1 MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **2.1.1 Selección de la muestra**

La población de estudio incluyó un total de 401 muestras de sangre periférica de individuos españoles, 164 pacientes con LLC y 237 controles. El estudio fue aprobado por el comité ético de la Facultad de Medicina y Odontología de la UPV/EHU y se obtuvo el consentimiento informado, tanto de los casos como de los controles, antes de tomar la muestra.

### 2.1.2 Selección de miRNAs y SNPs en miRNAs

Para el estudio se seleccionaron todos los pre-miRNAs descritos en la base de datos miRBase (<http://www.mirbase.org>) (Griffiths-Jones et al., 2006) hasta Marzo de 2013, y todos los SNPs descritos en la base de datos miRNA SNIper (<http://www.integratomics-time.com/miRNA-SNIper/>) (Zorc et al., 2015), con una Frecuencia Alélica Mínima (MAF, por sus siglas en inglés) superior al 1% ( $MAF \geq 0,01$ ) en la población Caucásica y que estuvieran presentes en los pre-miRNAs seleccionados previamente.

### 2.1.3 Genotipado de los polimorfismos

El DNA (acrónimo del inglés de *Deoxyribonucleic acids*) genómico fue extraído a partir de sangre periférica, usando el método de fenol-cloroformo descrito previamente (Sambrook y Russell, 2001). El DNA se cuantificó usando el espectrofotómetro NanoDrop™.

Los polimorfismos fueron genotipados en el Centro Nacional de Genotipado (CeGen-ISCIII) utilizando la tecnología GoldenGate de VeraCode, Illumina, basada en la amplificación simultánea de un gran número de SNPs mediante ensayo múltiple de PCR. Para la interpretación de los datos del genotipado, se empleó el software GenomeStudio.

### 2.1.4 Análisis estadístico

El Equilibrio de Hardy-Weinberg (EHW) para la distribución entre los genotipos esperados y observados en los controles, se llevó a cabo mediante el test de la chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) o test exacto de Fisher.

La medida de asociación del efecto se estimó mediante el odds-ratio (OR) a partir de una regresión logística univariante. Para determinar la significancia estadística de cada SNP se escogió el test más significativo de entre los distintos modelos genéticos. Los resultados fueron ajustados por contrastes múltiples mediante el método basado en la proporción de falsos positivos o FDR (acrónimo del inglés de *False Discovery Rate*) (Benjamini y Hochberg, 1995). En todos los casos el nivel de significancia se estableció al 5%. El análisis de las frecuencias genotípicas se realizó con el software R v3.1.0.

Aquellos individuos con más de un 80% de errores de genotipado fueron excluidos del análisis estadístico. Para calcular el éxito de genotipado se empleó el programa Haploview (versión 4.2).

### **2.1.5 Análisis bioinformático**

#### **2.1.5.1 Predicción de la estructura secundaria de los miRNAs**

Se empleó la herramienta web RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) (Gruber et al., 2008) para calcular la energía libre mínima (MFE, por sus siglas en inglés) de las estructuras secundarias y poder predecir cuál de éstas es la más estable para los miRNAs que muestran SNPs significativos. Cambios en la energía libre positivos implican una pérdida de estabilidad del miRNA, mientras que valores negativos se consideran como una ganancia de estabilidad (Gong et al., 2012).

#### **2.1.5.2 Selección de genes diana y análisis de rutas**

Para predecir las posibles dianas de los miRNAs se utilizó la base de datos miRWalk 2.0 (<http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk2/index.html>) (Dweep et al., 2011). Se seleccionaron aquellas dianas que fueron predichas por al menos 6 algoritmos diferentes, para aquellos miRNAs con un p-valor inferior a 0,02.

Se realizó un análisis de enriquecimiento de rutas con la lista de genes obtenida en miRWalk y para ello se utilizó la base de datos ConsensusPath (CPdB) (<http://consensuspathdb.org/>) (Kamburov et al., 2013), seleccionando las rutas presentes en la base de datos KEGG (Kanehisa et al., 2016) en el módulo de análisis de sobre-representación. Se estableció un valor umbral para el p-valor de  $10^{-5}$ .

## **2.2 RESULTADOS**

### **2.2.1 Características de la muestra**

La población de estudio incluyó un total de 401 muestras de DNA de individuos españoles, 164 pacientes con LLC y 237 controles. Las características de la muestra se detallan en la **Tabla 1**.

**Tabla 1. Características de la muestra incluida en el estudio.**

	Total		Controles		Casos	
<b>Número de participantes en el estudio</b>	<b>401</b>		<b>237</b>		<b>164</b>	
Edad, promedio $\pm$ sd, años	73,31 $\pm$ 17,52		75,46 $\pm$ 20,61		70,21 $\pm$ 11,06	
Rango de edad cubierto	34-104		34-104		38-93	
<b>Sexo</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>	<b>n</b>	<b>%</b>
Femenino	203	50,6	139	58,6	64	39,0
Masculino	198	49,4	98	41,4	100	61,0

### 2.2.2 Resultados del genotipado

En el estudio se analizaron 401 muestras de DNA, de las cuales se obtuvo un genotipado satisfactorio en el 97,7%; 164 de 164 pacientes con LLC (100%) y 228 de 237 controles (96,2%). De los 213 SNPs seleccionados en 206 miRNAs, 54 fallaron en su genotipado por lo que se obtuvieron los resultados de 159 (74,6%). De estos, cinco fueron eliminados por no llegar a un genotipado superior al 80% y siete por no encontrarse en EHW en la población control. Esto hace un total de 147 SNPs analizados.

### 2.2.3 Estudio de asociación caso-control

El estudio de asociación genotípica mostró un total de 13 SNPs en 13 miRNAs con una asociación estadística significativa ( $P < 0,05$ ) con el riesgo a desarrollar LLC (**Tabla 2**). Cabe destacar, que cinco de ellos presentaron un p-valor inferior a 0,02. Entre ellos, el SNP rs2682818, situado en el pre-miR618, que presentó el valor más significativo bajo el modelo dominante (CC vs AC + AA). Los genotipos AC/AA disminuyeron 0,49 veces el riesgo de desarrollar LLC (95% IC: 0,29-0,81;  $P=0,0047$ ). En el caso de los SNPs rs4822739, rs75715827 y rs12355840 fueron los alelos G, C y el genotipo CC, respectivamente, los que confirieron protección a desarrollar LLC ( $OR < 1$ ). Solo en un caso, para el SNP rs61938575, se encontró un incremento del riesgo en los individuos con el genotipo AA ( $OR=2,22$ ; 95% IC: 1,13-4,36).

Tabla 2. SNPs significativos en miRNAs asociados con el riesgo a desarrollar LLC.

miRNA	SNP	Localización	Posición	Genotipo	N (%) Controles	N (%) Casos	OR (IC 95%)	P
1	mir-618	PM	12q21.31	CC	172 (72,9)	138 (84,7)	1	<b>0,004707</b> Dominante
				AC	59 (25,0)	22 (13,5)	0,49 (0,29-0,81)	
				AA	5 (2,1)	3 (1,8)		
2	mir-548j	PM	22q12.1	CC	211 (89,0)	156 (95,7)	1	<b>0,01317</b> Codominante
				CG	26 (11,0)	7 (4,3)	0,36 (0,15-0,86)	
3	mir-944	PM	3q28	TT	194 (81,9)	147 (90,2)	1	<b>0,01840</b> Dominante
				CT	41 (17,3)	16 (9,8)	0,49 (0,27-0,91)	
				CC	2 (0,8)	0 (0,0)		
4	mir-3922	M	12q23.3	GG	114 (49,4)	80 (49,4)	1	<b>0,01870</b> Recesivo
				AG	101 (43,7)	59 (36,4)	2,22 (1,13-4,36)	
				AA	16 (6,9)	23 (14,2)		
5	mir-202	PM	10q26.3	TT	148 (64,6)	102 (62,2)	1	<b>0,01958</b> Recesivo
				CT	66 (28,8)	59 (36,0)	0,27 (0,08-0,93)	
				CC	15 (6,6)	3 (1,8)		
6	mir-1302-4	pri-miR	2q33.3	TT	182 (76,8)	125 (76,2)	1	<b>0,02255</b> Recesivo
				CT	53 (22,4)	32 (19,5)	5,24 (1,07-25,55)	
				CC	2 (0,8)	7 (4,3)		
7	mir-412	M	14q32.31	GG	79 (33,5)	38 (23,2)	1	<b>0,02464</b> Dominante
				AG	104 (44,1)	87 (53,0)	1,67 (1,06-2,62)	
				AA	53 (22,5)	39 (23,8)		
8	mir-3649	PM	12p13.33	TT	237 (100,0)	160 (97,6)	1	<b>0,02737</b> Codominante
				GT	0 (0,0)	4 (2,4)	0,00	
9	mir-576	PM	4q25	AA	226 (96,2)	149 (90,9)	1	<b>0,0295</b> Codominante
				AT	9 (3,8)	15 (9,1)	2,53 (1,08-5,93)	
10	mir-4804	seed	5q13.2	CC	182 (77,1)	109 (68,6)		<b>0,03198</b> Log-Aditivo
				CG	51 (21,6)	44 (27,7)	1,55 (1,04-2,31)	
				GG	3 (1,3)	6 (3,8)		
11	mir-604	PM	10p11.23	CC	132 (56,2)	97 (59,9)	1	<b>0,03479</b> Recesivo
				CT	82 (34,9)	59 (36,4)	0,39 (0,15-0,99)	
				TT	21 (8,9)	6 (3,7)		
12	mir-4432	PM	2p16.1	CC	69 (29,2)	50 (30,7)	1	<b>0,04078</b> Recesivo
				CT	125 (53,0)	70 (42,9)	1,66 (1,02-2,68)	
				TT	42 (17,8)	43 (26,4)		
13	mir-5707	PM	7q36.3	GG	225 (94,9)	147 (89,6)	1	<b>0,04606</b> Codominante
				AG	12 (5,1)	17 (10,4)	2,17 (1,01-4,67)	

Abreviaturas: PM, pre-miR; M miR maduro; OR, odds ratio; IC, intervalo de confianza

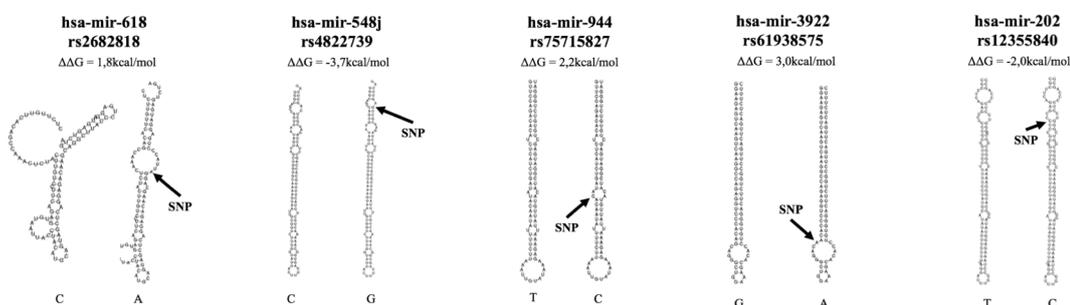
Ninguno de los SNPs se mantuvo significativo después de corregir por FDR

## 2.2.4 Análisis bioinformático

### 2.2.4.1 Estructura secundaria de los miRNAs

Con el fin de determinar el posible efecto funcional de los cinco SNPs más significativos, se analizó su estructura secundaria y el cambio de energía libre de Gibbs *in silico* ( $\Delta\Delta G$ ) (**Figura 4**). Por un lado, el cambio del alelo C al A en el SNP rs2682818 fue el único en el que se predijo un cambio drástico en la estructura secundaria del miRNA, mientras que para los otros cuatro SNPs la predicción de la estructura de sus respectivos miRNAs no mostró grandes cambios aparentes.

Por otro lado, el mayor cambio de energía libre lo presentó el SNP rs4822739, localizado en el miR548j, con un valor de  $\Delta\Delta G = -3,7$  kcal/mol, lo que significa que el cambio del alelo C por el G da estabilidad al miRNA. Para los SNPs rs2682818, rs75715827 y rs61938575 el cambio del alelo más común por el menos común provocaron una pérdida de estabilidad en sus respectivos miRNAs. Sin embargo, este mismo cambio para el SNP rs12355840 provocó un aumento de la estabilidad de su miRNA.



**Figura 4. Estructuras secundarias de aquellos miRNAs que presentaban SNPs significativos.** Las estructuras fueron predichas por la herramienta web RNAfold.

### 2.2.4.2 Análisis de rutas

Considerando los cinco SNPs más significativos se buscaron las rutas en las que un mayor número de genes se encontrasen regulados por ellos.

En total se encontraron 6467 posibles dianas (**Tabla 3**), de las cuales 2686 (41,5%) se encontraban reguladas por más de un miRNA.

**Tabla 3. Número de posibles dianas reguladas por los miRNAs.**

	1 miRNA	2 miRNAs	3 miRNAs	4 miRNAs	5 miRNAs	Total
<b>N Genes</b>	3781	1711	736	219	20	6467

Teniendo en cuenta los genes regulados por estos cinco miRNAs (**Tabla 4**) se identificaron un total de 4 rutas significativas (**Tabla 5**). La ruta más significativa fue “Rutas en cáncer” con un p-valor de  $2,45 \times 10^{-9}$ . Considerando los 398 genes que componen esta ruta, observamos que 192 (48,2%) eran posibles dianas de los miRNAs seleccionados. Las siguientes rutas más significativas fueron la ruta de señalización FoxO, la ruta de señalización Wnt y rutas descritas en el cáncer colorrectal, todas ellas rutas implicadas en cáncer.

**Tabla 4. Número de posibles dianas que comparten los miRNAs.**

	mir-618	mir-548j	mir-944	mir-3922	mir-202
<b>mir-618</b>	1539	-	-	-	-
<b>mir-548j</b>	669	3059	-	-	-
<b>mir-944</b>	671	1380	3102	-	-
<b>mir-3922</b>	125	197	189	619	-
<b>mir-202</b>	437	786	817	162	2068

**Tabla 5. Rutas significativas que contienen posibles dianas de los miRNAs seleccionados.** El tamaño de la ruta hace referencia al número de genes que la componen, mientras que los candidatos son las posibles dianas que forman parte de la ruta.

Rutas	Tamaño	Candidatos (%)	p-valor
Rutas en cáncer	398	192 (48,2%)	$2,45 \times 10^{-9}$
Ruta de señalización FoxO	134	78 (58,2%)	$8,64 \times 10^{-9}$
Ruta de señalización Wnt	140	75 (53,6%)	$1,61 \times 10^{-6}$
Cáncer colorrectal	62	39 (62,9%)	$3,34 \times 10^{-6}$

## 2.3 DISCUSIÓN

En este trabajo se ha estudiado la correlación entre 213 SNPs en 206 miRNAs y la susceptibilidad a desarrollar LLC, con el objetivo de identificar nuevos marcadores de riesgo en LLC. Se han encontrado un total de 13 SNPs en 13 miRNAs que muestran una asociación estadística significativa; entre ellos cinco SNPs en cinco miRNAs con un p-valor  $< 0,02$ .

El SNP más significativo fue rs2682818 en el miR618, donde los genotipos AC/AA disminuyeron 0,49 veces el riesgo de desarrollar LLC bajo un modelo dominante ( $P=0.0047$ ). Este SNP se localiza en el pre-miRNA. Al analizar el efecto del SNP en la estructura secundaria del miRNA, observamos que el cambio del alelo C al A producía una variación de energía libre positiva ( $\Delta\Delta G = 1,8$  kcal/mol), provocando un cambio drástico en la estructura secundaria del miRNA. Gong et al., (2012) observaron que cuando aumenta el cambio de energía libre, disminuye la estabilidad del miRNA, generando una disminución en sus niveles de expresión y por tanto una reducción de la represión de los genes diana. En línea con estos resultados, Fu et al., (2014) analizando rs2682818 en linfoma folicular, demostraron *in vitro* que el alelo A provocaba una reducción de los niveles del miR618, alterando la expresión de sus genes diana. Teniendo en cuenta lo anterior, una posible explicación a nuestro resultado es que rs2682818 altera la expresión del miR618 en LLC, lo que podría afectar a las rutas reguladas por este miRNA, entre ellas rutas relacionadas con la linfomagénesis. Otros cuatro SNPs en cuatro miRNAs mostraron p-valores  $< 0,02$ . Entre ellos, destaca el rs12355840 en el miR202. Se ha observado que este miRNA se encuentra sobrerrepresentado en los exosomas de las células de LLC con respecto a los de las células B normales, lo que resulta en un descenso de su efecto anti-tumorigénico dentro de las células tumorales (Farahani et al., 2015). Por lo tanto, la existencia de rs12355840 en el miRNA podría alterar dicho efecto, aumentando la tumorigénesis.

Cuando consideramos los genes regulados por estos cinco miRNAs y realizamos un análisis de enriquecimiento de rutas *in silico*, observamos cuatro rutas significativas, todas ellas implicadas en cáncer. Sin embargo, de éstas, solo la ruta de señalización FoxO (**Figura 5**) y la ruta de señalización Wnt, que tienen más del 50% de los genes de sus rutas regulados por los miRNAs seleccionados (**Tabla 5**), están implicadas directamente en LLC (Li y Wang, 2013; Palacios et al., 2015). La ruta de señalización FoxO es la más interesante porque comprende una serie de rutas intracelulares como la TGF- $\beta$ , MAPK o PI3K-Akt encargadas de regular la subfamilia de factores de transcripción FoxO. En concreto, *Akt* y *ERK1/2*, presentes en las rutas de señalización PI3K-Akt y MAPK, respectivamente, son dos quinasas oncogénicas que fosforilan a FoxO, provocando su translocación desde el núcleo al citoplasma y promoviendo su posterior degradación (Palacios et al., 2015). Mientras que la quinasa *AMPK*, presente en la ruta de señalización TGF- $\beta$ , va a activar al factor de transcripción FoxO favoreciendo su transporte al núcleo



#### 4. FUTUROS ESTUDIOS

Validar los resultados significativos en una segunda población. Posteriormente, y en caso de confirmarse los resultados, analizar el efecto de los SNPs en los niveles de los miRNAs y en los genes diana de la ruta de señalización FoxO.

#### 5. BIBLIOGRAFÍA

Benjamini, Y., y Hochberg, Y. (1995). - Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. - 57, - 300.

Berndt, S.I., Camp, N.J., Skibola, C.F., Vijai, J., Wang, Z., Gu, J., Nieters, A., Kelly, R.S., Smedby, K.E., Monnereau, A., *et al.* (2016). Meta-analysis of genome-wide association studies discovers multiple loci for chronic lymphocytic leukemia. *Nat Commun* 7, 10933.

Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., *et al.* (2004). MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 11755-11760.

Dweep, H., Sticht, C., Pandey, P., y Gretz, N. (2011). miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 44, 839-847.

Farahani, M., Rubbi, C., Liu, L., Slupsky, J.R., y Kalakonda, N. (2015). CLL Exosomes Modulate the Transcriptome and Behaviour of Recipient Stromal Cells and Are Selectively Enriched in miR-202-3p. *PLoS One* 10, e0141429.

Fu, A., Hoffman, A.E., Liu, R., Jacobs, D.I., Zheng, T., y Zhu, Y. (2014). Targetome profiling and functional genetics implicate miR-618 in lymphomagenesis. *Epigenetics* 9, 730-737.

Goldin, L.R., Björkholm, M., Kristinsson, S.Y., Turesson, I., y Landgren, O. (2009). Elevated risk of chronic lymphocytic leukemia and other indolent non-Hodgkin's lymphomas among relatives of patients with chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 94, 647-653.

Goldin, L.R., Slager, S.L., y Caporaso, N.E. (2010). Familial chronic lymphocytic leukemia. *Curr Opin Hematol* 17, 350-355.

Gong, J., Tong, Y., Zhang, H.M., Wang, K., Hu, T., Shan, G., Sun, J., y Guo, A.Y. (2012). Genome-wide identification of SNPs in microRNA genes and the SNP effects on microRNA target binding and biogenesis. *Hum Mutat* 33, 254-263.

- Griffiths-Jones, S., Grocock, R.J., van Dongen, S., Bateman, A., y Enright, A.J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* *34*, D140-144.
- Gruber, A.R., Lorenz, R., Bernhart, S.H., Neuböck, R., y Hofacker, I.L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Res* *36*, W70-74.
- Kamburov, A., Stelzl, U., Lehrach, H., y Herwig, R. (2013). The ConsensusPathDB interaction database: 2013 update. *Nucleic Acids Res* *41*, D793-800.
- Kanehisa, M., Sato, Y., Kawashima, M., Furumichi, M., y Tanabe, M. (2016). KEGG as a reference resource for gene and protein annotation. *Nucleic Acids Res* *44*, D457-462.
- Li, P.P., y Wang, X. (2013). Role of signaling pathways and miRNAs in chronic lymphocytic leukemia. *Chin Med J (Engl)* *126*, 4175-4182.
- Martin-Guerrero, I., Gutierrez-Camino, A., Lopez-Lopez, E., Bilbao-Aldaiturriaga, N., Pombar-Gomez, M., Ardanaz, M., y Garcia-Orad, A. (2015). Genetic variants in miRNA processing genes and pre-miRNAs are associated with the risk of chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One* *10*, e0118905.
- Palacios, F., Prieto, D., Abreu, C., Ruiz, S., Morande, P., Fernández-Calero, T., Libisch, G., Landoni, A.I., y Oppezzo, P. (2015). Dissecting chronic lymphocytic leukemia microenvironment signals in patients with unmutated disease: microRNA-22 regulates phosphatase and tensin homolog/AKT/FOXO1 pathway in proliferative leukemic cells. *Leuk Lymphoma* *56*, 1560-1565.
- Ryan, B.M., Robles, A.I., y Harris, C.C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat Rev Cancer* *10*, 389-402.
- Sambrook, J., y Russell, D.W. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sana, J., Faltejskova, P., Svoboda, M., y Slaby, O. (2012). Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med* *10*, 103.
- Swerdlow, S.H., Cancer, I.A.f.R.o., y Organization, W.H. (2008). *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (International Agency for Research on Cancer).
- Wojcik, S.E., Rossi, S., Shimizu, M., Nicoloso, M.S., Cimmino, A., Alder, H., Herlea, V., Rassenti, L.Z., Rai, K.R., Kipps, T.J., *et al.* (2010). Non-codingRNA sequence variations in human chronic lymphocytic leukemia and colorectal cancer. *Carcinogenesis* *31*, 208-215.
- Yang, J.Y., y Hung, M.C. (2009). A new fork for clinical application: targeting forkhead transcription factors in cancer. *Clin Cancer Res* *15*, 752-757.
- Zorc, M., Obsteter, J., Dovc, P., y Kunej, T. (2015). Genetic Variability of MicroRNA Genes in 15 Animal Species. *J Genomics* *3*, 51-56.