



Utilidad de la familia miR-200 como marcador pronóstico en dos tumores de origen endodérmico: Cáncer de Pulmón y Cáncer Colorrectal

Rut Tejero Villalba

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

TESIS DOCTORAL

FACULTAD DE MEDICINA

PROGRAMA DE DOCTORADO

MEDICINA

**Utilidad de la familia miR-200 como marcador
pronóstico en dos tumores de origen
endodérmico: Cáncer de Pulmón y Cáncer
Colorrectal.**

Directores de Tesis

Dr. Alfons Navarro Ponz

Prof. Mariano Monzó Planella

Rut Tejero Villalba

Barcelona, Junio 2014

A mis padres,
a mi hermana
y a Gerardo.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a todas y a cada una de las personas que me han acompañado en los últimos cuatro años en la realización de esta tesis doctoral. Les agradezco a todos el haberme brindado su conocimiento, su colaboración, todo su apoyo, ánimo y sobre todo cariño.

En primer lugar me gustaría agradecer a mis dos directores de tesis, al profesor Marià Monzó y al Dr. Alfons Navarro, la oportunidad de realizar con ellos mi tesis doctoral. Al profesor Marià Monzó agradecerle la confianza y la oportunidad de poder haber trabajado en su grupo durante estos cuatro años, que me ha servido de mucho en el ámbito profesional y personal, que siempre me ha transmitido su profesionalidad y buen hacer. Siempre ha sido un buen referente y sus frases como “cada vegada que t’equivoquis, estaràs aprenent el doble” me han hecho crecer todavía más. Al Dr. Alfons Navarro su apoyo y confianza en mi trabajo y su participación en mi formación como investigadora. Agradecerle dejarme participar en sus inquietudes científicas y “volverme loca” con sus cosas. Le agradezco todo lo que me ha enseñado y transmitido en estos años a cerca de lo que es la ciencia y como el trabajo constante y bien hecho siempre da sus resultados.

A mis padres, Angel y Montse, y a mi hermana Montse, agradecerles el apoyo incondicional que siempre me han dado. Ha sido difícil, pero al final lo hemos conseguido. Les agradezco sus consejos y su ayuda en todo momento, su paciencia y comprensión, gracias por apoyarme en esta etapa, como siempre lo han hecho.

A Gerardo, porque siempre le he considerado un gran compañero de trabajo y amigo. Agradezco su apoyo diario tanto dentro como fuera del laboratorio. Agradezco toda su disponibilidad sin esperar nada a cambio. Por soportarme aun estando a kilómetros de mi y siempre darme buenos consejos. Gracias por estar a mi lado.

A mis compañeros de laboratorio. A Tania, que ha sido y sigue siendo mi gran confidente. Hemos trabajado horas juntas y siempre le agradeceré lo que me ha enseñado tanto en la poyata como fuera de ella. Gracias por sus abrazos y por todos los momentos que hemos pasado juntas. A Marina, por entrar siempre con una sonrisa en el laboratorio y dar sus consejos sabios de cómo tomarse la vida de manera positiva. A Carmen, por sus primeros buenos días de buena mañana y poder ver en ella una persona trabajadora. A Rosa, por su atención y por los momentos compartidos en el laboratorio.

A Dolors, porque siempre ha estado allí para lo que he necesitado. A Gloria, por sus facturas y su buen humor. A Marc, por hacer los días divertidos. A Anna y Sandra, por compartir buenos momentos en el comedor tomando café e infusiones. A Oriol por ayudar siempre en todo.

Agradecer al grupo de cáncer de pulmón del Hospital Clínic Provincial de Barcelona, su participación e implicación en el trabajo. Esta investigación no habría sido posible sin las muestras biológicas y datos recibidos de los doctores Marrades, Viñolas, Campayo, Ramirez y Molins.

Agradecer especialmente, a la Dra. Isabel Moreno y al servicio de Oncología Médica y cirugía del Hospital Municipal de Badalona, por toda su colaboración y por hacerme recordar que detrás de cada muestra hay un paciente y detrás de este, una persona.

A la Universidad de Barcelona tanto en los inicios de la carrera, en la formación universitaria recibida durante la misma y a los buenos profesores que he encontrado. En estos últimos cuatro años, a la beca APIF recibida que me ha permitido entregarme por completo al desarrollo de la presente tesis doctoral. También agradezco al departamento de Obstetricia y Ginecología, Pediatría, Radiología y Anatomía la oportunidad de haber podido impartir clases durante estos cuatro años en las prácticas de las asignaturas de anatomía a los cursos de primero y segundo de Medicina. La transmisión de conocimientos siempre ayuda a interiorizarlos a uno mismo. La educación es una parte de la investigación.

A los profesores Josep M^a Potau y Jordi Ribes por hacer las clases tan animadas y divertidas. A Carlos por siempre contar conmigo y a Rennè porque sin ella los artículos no serian lo mismo.

También agradecer a mis amigos de siempre su apoyo, que han sabido escucharme y distraerme cuando lo he necesitado, y por su paciencia cuando les explicaba que es un microRNA. Y a las nenas de la uni, porque ellas han entendido en todo momento que es realizar una tesis, los días largos, mil maneras de no hacer un experimento y todo lo que lleva consigo, la dedicación, el esfuerzo y la voluntad de seguir adelante con la misma ilusión del primer día.

Todos me han ayudado mucho y han estado conmigo en este proceso.

Gracias a todos.

“Todo parece imposible hasta que se hace”

-Nelson Mandela-

CONTENIDO

Contenido

Abreviaturas	13
1. Introducción.....	19
1.1 Generalidades de los tejidos de origen endodérmico	19
1.2 Generalidades del cáncer de pulmón	20
1.2.1 Epidemiología y Etiología.....	20
1.2.2 Clasificación histológica del cáncer de pulmón	25
1.2.3 Origen celular del cáncer de pulmón.....	30
1.2.4 Biología molecular del cáncer de pulmón de célula no pequeña	34
1.2.5 Diagnóstico, estadiaje, pronóstico y tratamiento.....	38
1.3 Generalidades del cáncer colorrectal	47
1.3.1 Epidemiología y etiología.....	47
1.3.2 Clasificación del cáncer colorrectal.....	50
1.3.3 Origen celular del cáncer colorrectal.....	53
1.3.4 Biología molecular del cáncer colorrectal.....	56
1.3.5 Diagnóstico, estadiaje, pronóstico y tratamiento.....	59
1.4 Generalidades de los microRNAs.....	66
1.4.1 Historia y características	66
1.4.2 Identificación de dianas de microRNAs	69
1.4.3 Biogénesis	71
1.4.4 Mecanismos de acción.....	73
1.4.5 MicroRNAs en cáncer.....	76
1.4.6 Familia miR-200	81
2. Hipótesis y Objetivos.....	93
2.1 Hipótesis.....	93
2.2 Objetivos	94
2.2.1 Objetivo general.....	94

2.2.2	Objetivos específicos	94
3.	Material y Métodos	97
3.1	Pacientes	97
3.2	Líneas celulares	100
3.3	Extracción de RNA.....	101
3.4	Cuantificación de microRNAs.....	102
3.5	Transfección	102
3.6	Tratamiento con fármacos.....	103
3.7	Análisis de los niveles de VEGF	103
3.8	Análisis de migración	103
3.9	Western blot	103
3.10	Análisis de los niveles de mRNA.....	104
3.11	Inmunohistoquímica	104
3.12	Cuantificación de la formación de nuevos vasos	104
3.13	Análisis estadístico	104
4.	Resultados.....	109
5.	Discusión	133
6.	Conclusiones	141
7.	Bibliografía	145
8.	Anexos.....	161
8.1	Publicaciones a las que ha dado lugar la tesis	161
8.2	Otras publicaciones en las que he participado durante el período de tesis	213
8.3	Abstracts enviados a congresos durante el período de tesis	215

ABREVIATURAS

Abreviaturas

ACE: Antígeno carcinoembrionario

ADK: Adenocarcinoma

ALK: *Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*

BMP1A: *Bone morphogenetic protein 1A*

CCR: Cáncer colorrectal

CCHNP: Cáncer colorrectal hereditario no polipósico

CDK: Cinasa dependiente de ciclina

CE: Cáncer escamoso

CEBPA: *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

CHRNA: *Cholinergic receptor nicotinic alpha*

CP: Cáncer de pulmón

CpG: Islas de citosina y guanina

CPNPC: Cáncer de pulmón de célula no pequeña

CPCP: Cáncer de pulmón de célula pequeña

CYP: Familia de genes del citocromo P450

CYP1A1: *Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1*

DICER: *Ribonuclease type III*

DNA: Ácido desoxirribonucleico

DNMT3A: DNA (citosina-5-) metiltransferasa 3 alfa

ECOG PS: *Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status*

EGFR: *Epidermal growth factor receptor*

EML4-ALK: *Echinoderm microtubule associated protein like 4-anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase*

EPOC: Enfermedad pulmonar obstructiva crónica

ERBB: Familia de proteínas de EGFR

ERCC1/2: *Excision repair cross-complementing group 1 and 2*

ERK: *Extracellular signal-regulated kinase*

FHIT: *Fragile histidine triad*

GSTM1: *Glutathione s-transferase mu 1*

HPA: Hidrocarburos policíclicos aromáticos

IARC: Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer

IHQ: Inmunohistoquímica

MSI: Inestabilidad de microsatélites

KLF4: *Factor 4 Kruppel-like*

KRAS: *V-ki-ras2 Kirsten rat sarcom vira oncogen homolog*

LLC: Leucemia linfática crónica

M: Metástasis

MAPK: *Mitogen activated kinase-like protein*

MET: *Met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor)*

miRNA: microRNA

miRISC: RISC con una cadena guía de un miRNA

MLH1: *Mut L homolog 1*

MMR: Reparación de emparejamientos erróneos

MSH: Hormonas estimulantes de melanocitos

MYC: *V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*

ncRNA: RNA no codificante

NNK: 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona

nt: nucleótidos

OCT3/4: *Octamer-binding transcription factor 3/4*

OMS: Organización Mundial de la Salud

PAF: Poliposis adenomatosa familiar

PAFA: Poliposis adenomatosa familiar atenuada

PELP1: proteína rica en leucina 1

PET: Tomografía con emisión de positrones

Pb: Pares de bases

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PI3K/AKT: Vía de la fosfatidil inositol-3-kinasa

PMS2: *Mismatch repair endonuclease*

PS: *Performance status*

Pri-miRNA: miRNA primario

Pre-miRNA: miRNA precursor

P16: Inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina (CDKN2A)

RASSF1A: *Ras association (Ral GDS/AF-6) domain family member 1*

Rb: Retinoblastoma

RM: Resonancia magnética

RNA: Ácido ribonucleico

RNAi: RNA de interferencia

RISC: Complejo de silenciamiento inducido por RNA.

RT-PCR: Reacción en cadena de la polimerasa mediante retro-transcriptasa.

siRISC: RISC con una cadena guía de un siRNA

SG (OS): Supervivencia global (*Overall survival*)

SLE (DFS): Supervivencia libre de enfermedad (*Disease free survival*)

SOX2: *SRY (Sex Determining Region Y)-Box 2*

SPJ: Síndrome de Peutz-Jeghers

STK11: *Serine/Threonine Kinase 11*

T: Tumor

TC: Tomografía computarizada

TGF- β : Factor de crecimiento transformante beta

TP53: *Tumor protein P53*

TP63: *Tumor protein P63*

TRBP: *Tar RNA-binding protein*

TR: Tiempo a la recaída

TTF1: *Thyroid transcription factor 1*

UTR: *Untranslated región*

VEGF: *Vascular Endothelial Growth Factor*

WNT: *Wingless-type MMTV integration site family*

XPO5: Exportina-5

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1 Generalidades de los tejidos de origen endodérmico

Una propiedad biológica de los epitelios que forman el aparato respiratorio y digestivo en el adulto, es su origen común embrionario. Ambos derivan del tubo endodérmico embrionario, que en el embrión humano de 28 días se divide en tres segmentos: intestino anterior, intestino medio e intestino posterior, que desarrollaran funciones y destinos diferentes en el adulto.

El intestino anterior, se caracteriza por la presencia de una evaginación tisular en su cara anterior que se denomina bolsa gastropulmonar, que evoluciona formando el brote pulmonar, que se separa y se sitúa anteriormente al tubo gástrico. Del brote pulmonar endodérmico se formarán los epitelios traqueales y bronquiales; y del tubo gástrico endodérmico los epitelios esofágicos y gástricos.

El endodermo de intestino medio formará los epitelios del intestino delgado. El endodermo de intestino posterior formará los epitelios del intestino grueso.

El tejido endodérmico de los intestinos anterior, medio y posterior, están rodeados de tejido mesenquimatoso indiferenciado de origen mesodérmico, que dará lugar a todos los componentes que forman el tejido conjuntivo y muscular.

Las interacciones entre células mesodérmicas mesenquimales y epiteliales endodérmicas, son fundamentales para la correcta diferenciación molecular y estructural de los sistemas respiratorio y digestivo.

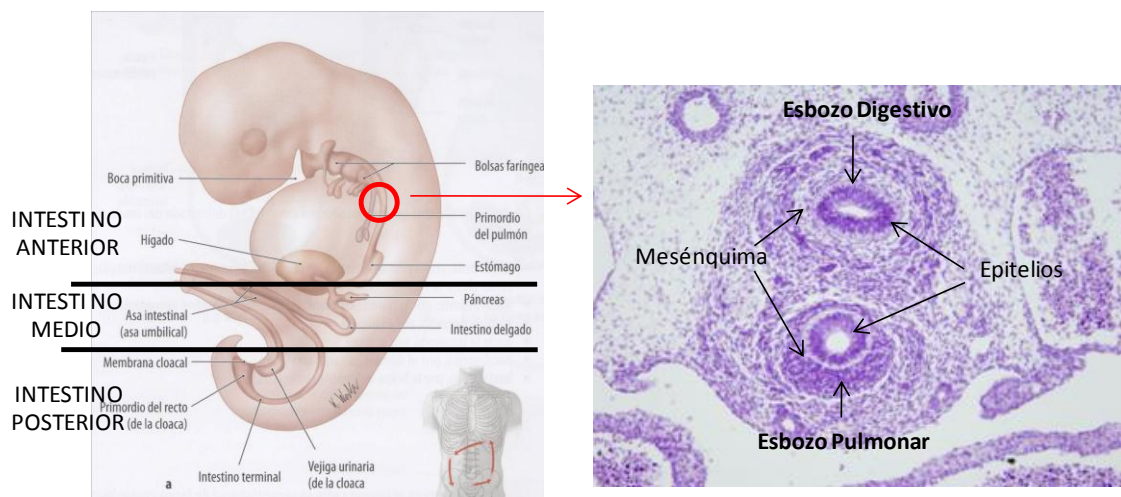


Figura 1. Embrión de 28 días donde se observa el origen del pulmón e intestino [1]. Corte histológico de un embrión de 6 semanas en el cual se observan el epitelio digestivo y pulmonar rodeado de células mesenquimales.

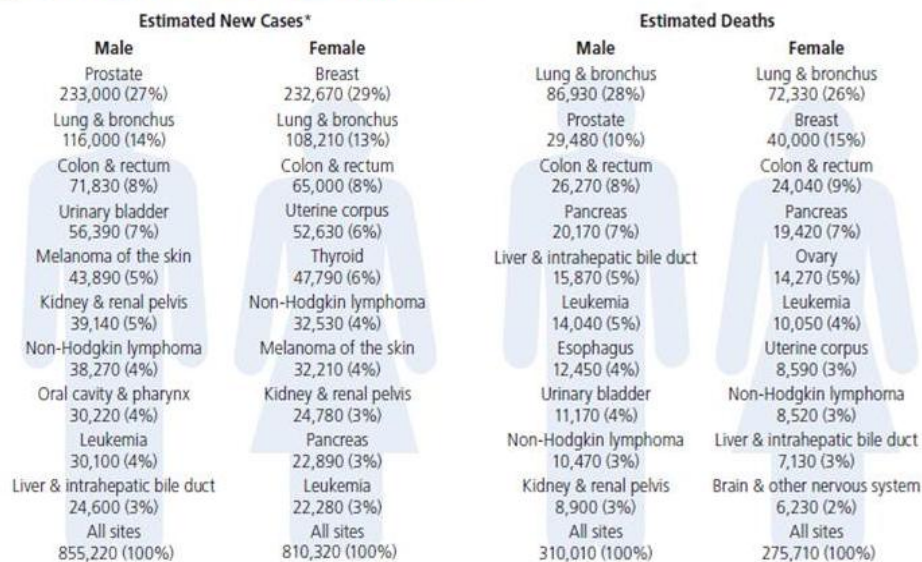
1.2 Generalidades del cáncer de pulmón

1.2.1 Epidemiología y Etiología

Epidemiología

El cáncer de pulmón (CP) representa un problema sanitario en los países occidentales por su elevada incidencia y mortalidad. Es el tumor sólido más frecuente a nivel mundial y es la primera causa de muerte por cáncer si consideramos conjuntamente ambos sexos (Figura 2). En el 2014, en Estados Unidos se diagnosticarán 224.210 casos nuevos de CP, que representarán alrededor de un 13% de todos los tipos de cáncer diagnosticados y se producirán 159.260 muertes por este cáncer, alrededor de un 27% [2].

Leading New Cancer Cases and Deaths – 2014 Estimates



*Excludes basal and squamous cell skin cancers and in situ carcinoma except urinary bladder.

©2014, American Cancer Society, Inc., Surveillance Research

Figura 2. Estimación de nuevos casos de cáncer y muertes asociadas a cáncer en el 2014. (Cancer Facts and Figures 2014. American Cancer Society.

<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/cancerfactsfigures2014/>)

En España, la incidencia global ha venido aumentando a lo largo del pasado siglo, especialmente en los hombres, estimándose que cada año se diagnostican unos 20.000 casos nuevos, lo que representa un 12% de todos los cánceres. Según el Instituto Nacional de Estadística en España el cancer de pulmón es una enfermedad que se encuentra en clara progresión y cuenta con la mortalidad más elevada de todos los tumores.

El CP se presenta principalmente en personas mayores, con una edad promedio en el momento del diagnóstico de 70 años [3]. Aproximadamente 2 de cada 3 personas diagnosticadas de CP son mayores de 65 años y menos del 2% de los casos se presentan en menores de 45 años. En general, la probabilidad de que un hombre desarrolle CP en su vida es 1 de cada 13 y para una mujer es 1 de cada 16 [4].

La incidencia de este tipo de cáncer en las mujeres empezó a aumentar de manera significativa en 1973 y llegó a su punto más elevado a finales de 1990 [5]. La mortalidad por CP en las mujeres se estabilizó por primera vez en 2003, dos décadas más tarde que los hombres [5, 6]. Las diferencias de género en el CP reflejan las diferencias históricas en la captación y la reducción del consumo de cigarrillos en los últimos 50 años.

La incidencia también difiere según la etnia y la más elevada se encuentra en los países desarrollados. En Estados Unidos, durante el período 2006-2010, los afroamericanos tuvieron la mayor tasa de incidencia, mientras que los hispanos presentaron la menor (Figura 3) [3, 7].

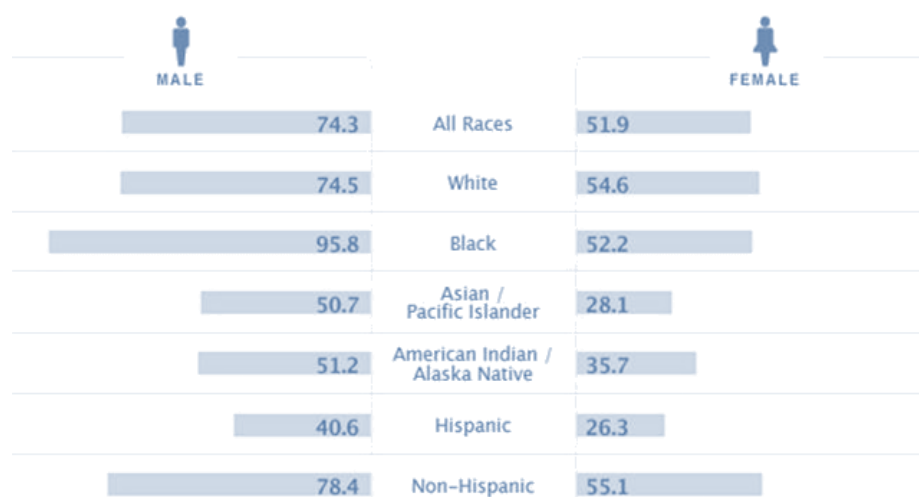


Figura 3. Número de casos de cáncer de pulmón por 100.000 habitantes por etnia y sexo [3].

La tasa de supervivencia en pacientes con CP varía dependiendo del estado de evolución del tumor en el momento del diagnóstico. La supervivencia global a los cinco años es menor del 14% en hombres y menor del 18% en mujeres. Estos valores no han cambiado en las últimas dos décadas a pesar de los esfuerzos y avances realizados en su tratamiento y diagnóstico [8].

Etiología

La aparición de esta enfermedad deriva de la interacción entre exposición a agentes causantes y una susceptibilidad individual frente a los mismos. Cada uno de los factores de riesgo tiene una importancia diferente en la etiología de esta enfermedad. A continuación enumeraremos algunos de los más importantes.

El tabaco

El consumo de tabaco es la principal causa de CP y el riesgo aumenta con la cantidad y la duración del consumo de éste. En Estados Unidos aproximadamente un 80% de las muertes por CP en hombres y mujeres son directamente atribuidas al consumo del tabaco.

Cada cigarrillo contiene diferentes componentes químicos, algunos de los cuales son altamente cancerígenos. Los componentes más agresivos son el 4-(metilnitrosamino)-1-(3-piridil)-1-butanona (NNK) y los hidrocarburos policíclicos aromáticos (HPA), siendo necesaria su activación metabólica para inducir carcinogénesis. El NNK se une a determinados receptores que activaran la vía de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K/AKT), crucial en el crecimiento y la supervivencia celular. La activación anormal de la vía PI3K/AKT provoca alteración de los mecanismos de control del crecimiento y la supervivencia celular, lo que favorece el crecimiento competitivo, la capacidad metastásica y frecuentemente, una mayor resistencia a los tratamientos. Además, pueden activar genes de la familia Ras, como el *KRAS*; y aumentar la activación de las DNA metiltransferasas en los neumocitos [9]. Los HPA promueven la aparición de mutaciones y si estas afectan a los genes supresores de tumores como *TP53*, *RASSF1A* y *FHIT*, pueden producir alteraciones en la regulación del ciclo celular, en la reparación del DNA y la apoptosis [10]. La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) ha identificado al menos 50 componentes carcinogénicos en el humo del tabaco que tienen como diana genes importantes en la biología del CP [11, 12].

La nicotina que contiene el tabaco se ha descrito que inhibe la apoptosis y puede actuar como un carcinógeno en las células epiteliales del pulmón. Además, se ha identificado un locus de dependencia en el cromosoma 15q24-25, que se incluye en el clúster de los genes del receptor nicotínico $\alpha 5\text{-}\alpha 3\text{-}\beta 4$. La alteración de un aminoácido en la subunidad $\alpha 5$ del receptor nicotínico también influye en el riesgo de padecer un CP, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC) y en la enfermedad vascular [13].

Por lo tanto, en la actualidad disponemos de suficiente evidencia científica que demuestra la relación de causalidad entre los carcinógenos del humo del tabaco, el daño celular y el desarrollo de cáncer de pulmón (Figura 4) [14].

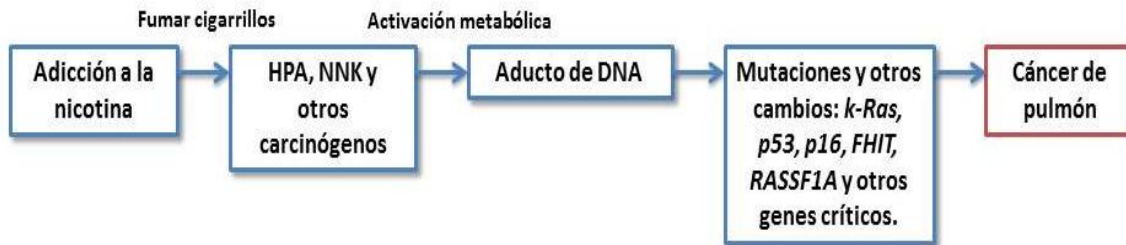


Figura 4. Carcinógenos del humo del tabaco y cáncer de pulmón [14].

El consumo de tabaco de pipa y puros también está relacionado con la posibilidad de desarrollar CP, el humo de este tipo de tabaco es más fuerte y alcalino que el producido por los cigarrillos [15]. Recientemente, ha aumentado el consumo de cigarrillos *light*. El contenido de nicotina en estos cigarrillos es inferior, pero se inhala la misma cantidad de productos químicos tóxicos. Además, al ser cigarrillos más suaves la persona inhala más profundamente [16].

Fumar daña prácticamente todos los órganos del cuerpo y disminuye la salud general de la persona. Aparte de CP, fumar puede causar cáncer de esófago, laringe, boca, garganta, riñón, vejiga, páncreas, estómago, cuello del útero y leucemia mieloide aguda. Independientemente de su edad, los fumadores pueden reducir considerablemente el riesgo de enfermedades, incluyendo el cáncer, al dejar de fumar [17, 18].

El tabaquismo pasivo, inhalación de humo de tabaco generado por un fumador, también se considera un factor de riesgo. Alrededor de una cuarta parte de los casos entre no fumadores pueden ser atribuidos al humo del tabaco.

Exposición a otros componentes carcinogénicos

La segunda causa principal de CP se relaciona a la exposición al gas radón liberado de los materiales del suelo y la construcción en Europa y América del Norte [19]. El radón emite partículas alfa que provocan daños en el DNA de las células epiteliales de los bronquios. El estudio "*The low a radon lung cancer study*" demostró un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón con la exposición ambiental a este componente [20].

El aire exterior puede contener una serie de agentes peligrosos, muchos de los cuales se generan por la ignición de combustibles fósiles. Carcinógenos generados por esta combustión

incluyen los **HPA** y los metales tales como el **níquel, plomo y cromo** [21]. Existe una gran lista de otros factores que promueven el desarrollo de este cáncer: la **inhala**ción de **amianto** (especialmente entre los fumadores), **ciertos metales** (cromo, cadmio, níquel) [22], la **radiación, la pintura, exposiciones a los gases emitidos por la fabricación de caucho, pavimentos, techos y limpieza de chimeneas** (hollín). También se ha descrito la presencia de compuestos carcinogénicos en los humos que se producen **al cocinar con los aceites fritos** [23].

Susceptibilidad genética hereditaria

La genética desempeña un papel importante en la susceptibilidad a desarrollar CP, especialmente en las mujeres, en las personas no fumadoras y en las personas que desarrollan la enfermedad a una edad temprana (CP que se produce antes de los 60 años). Se estima que el 1,7% de los CP hasta la edad de 68 años son hereditarios. Se conoce que las personas con historia familiar de la patología tienen un riesgo mayor de padecer CP.

Se ha descrito un locus en la región cromosómica 6q23-25p donde la presencia de polimorfismos puede utilizarse para identificar a individuos que pueden ser adecuados para los programas de cribado de CP [24]. En un 14% de los casos, un locus en la región cromosómica 15q25 se ha asociado fuertemente a CP. Esta región contiene varios genes, que codifican subunidades del receptor nicotínico de la acetilcolina (*CHRNA3*, *CHRNA4* y *CHRNA5*). Estas subunidades se expresan en las neuronas y otros tejidos, particularmente en células epiteliales alveolares, células neuroendocrinas pulmonares y líneas celulares de pulmón [25, 26].

Enfermedad pulmonar preexistente

Después de haber tenido una enfermedad o lesión que causó una cicatrización en los pulmones o enfermedades relacionadas, como las neumonías, asma y la fibrosis pulmonar, son factores potenciales de riesgo para el desarrollo de este tipo de cáncer, sobretodo para el subgrupo adenocarcinoma [27, 28]. La tuberculosis también puede suponer un riesgo a padecerlo. También se ha visto que las personas con anticuerpos frente a *Chlamydia pneumoniae*, bacteria que causa infección en el pecho, tienen mayor riesgo a padecer este tipo de cáncer.

1.2.2 Clasificación histológica del cáncer de pulmón

La organización mundial de la salud (OMS) divide el CP en dos grupos principales sobre la base de su biología, terapia y pronóstico: cáncer de pulmón de células pequeñas (CPCP) y cáncer de pulmón de célula no pequeña (CPCNP) [29].

Cáncer de pulmón de célula pequeña

El CPCP representa del 10 al 15% de los casos de CP y está estrechamente relacionada con la intensidad y duración del consumo de tabaco [30], el nombre es debido al tamaño de las células cancerosas cuando se observan al microscopio. Se caracteriza por un perfil agresivo, con un rápido crecimiento y gran capacidad de producir metástasis [31] y por ello debe de ser tratado lo antes posible, de dos a cuatro meses desde su diagnóstico [31, 32]. Las primeras técnicas usadas en su tratamiento son la cirugía o la radioterapia [31, 33]. Ambas técnicas presentan tasas de supervivencia muy bajas a largo plazo y recaídas, por lo general con enfermedad metastásica a distancia. Su tasa de supervivencia a 5 años, del 5 al 10%, no ha mejorado significativamente en los últimos 40 años [30, 34].

Cáncer de pulmón de célula no pequeña

El CPCNP representa más del 85% de los casos. Parte del trabajo de esta tesis se centra en una serie de pacientes de CPCNP. La clasificación histológica del CPCNP se divide principalmente en cáncer escamoso (CE) un 25% y cáncer no escamoso, que incluye dos grupos: adenocarcinoma (ADC) un 40% y carcinoma de célula grande un 10% (Tabla 1).

El CE es un tumor epitelial maligno que muestra queratinización y/o puentes intercelulares. La mayoría (90%) se desarrollan en fumadores [35] y se originan en el epitelio bronquial de las porciones proximales del árbol traqueo-bronquial (bronquios principales, lobares o segmentarios). Son tumores blancos o grises, con áreas centrales con depósitos focales de pigmento de carbón y retracción en forma de estrella en la periferia. Puede presentar un crecimiento endobronquial o invasivo y suele cavitarse. Las metástasis a distancia son menos frecuentes que en el ADC y ocurren en fases tardías de la historia natural de la enfermedad. La mayoría de los CE expresan queratinas de alto peso molecular, citoqueratinas 5/6 y la proteína p63 (Figura 5).

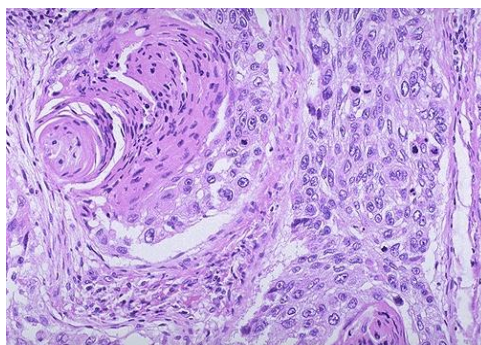


Figura 5. Corte histológico de un carcinoma escamoso de CPCNP.

El ADC es el tipo más común de cáncer de pulmón, representa aproximadamente un 30-45% de los tumores pulmonares malignos y su incidencia está aumentando. Es el más frecuente en las personas no fumadoras, particularmente en mujeres [36]. Es un tumor epitelial con diferenciación glandular o producción de mucina, que muestra un patrón de crecimiento acinar, papilar, bronquioloalveolar, sólido con mucina, o una combinación de estas variantes. Histológicamente, presenta varios patrones de crecimiento, que pueden aparecer de forma aislada o combinados en diferentes áreas del mismo tumor. Lo más frecuente es que haya una combinación de varios patrones histológicos, lo que da lugar al denominado adenocarcinoma mixto. Este subtipo representa aproximadamente el 80% de los adenocarcinomas resecados quirúrgicamente. Cuanto más grande es el tumor, más frecuente es que presente una combinación de diferentes patrones histológicos. La subclasificación de este grupo que se usa actualmente añade numerosos subtipos [37] (Figura 6).

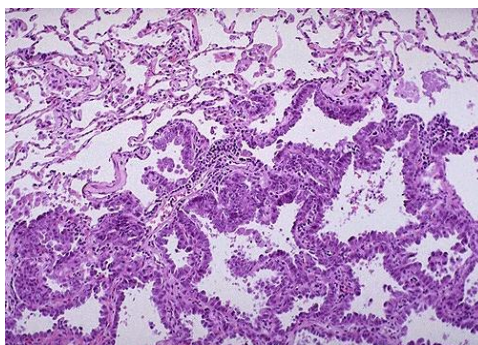


Figura 6. Corte histológico de un adenocarcinoma de CPCNP.

Uno de los subtipos más estudiados es el carcinoma bronquioloalveolar que crece de una forma lepidíca a lo largo de los septos alveolares. Más del 50% de estos tumores se asocian con zonas cicatriciales y, con frecuencia, el tumor crece alrededor de la cicatriz.

Histológicamente, el carcinoma bronquioloalveolar puro es raro, siendo más frecuente el adenocarcinoma mixto con rasgos bronquioloalveolares. Típicamente, se presenta en una de estas 2 formas: mucinoso (más frecuente y con tendencia a ser multicéntrico) y no mucinoso (tiende a ser solitario). Este tipo de CP se desarrolla en pacientes no fumadores y se asocia con mutaciones en *EGFR*. Por otra parte, las lesiones de pequeño tamaño que se detectan en las tomografías computarizadas (TCs) con frecuencia corresponden a carcinomas bronquioloalveolares.

El carcinoma de células grandes es un tumor pobremente diferenciado que carece de las características citológicas y de la citoarquitectura de los carcinomas microcíticos (de células pequeñas) y que no presenta diferenciación glandular o escamosa. Por lo tanto, el diagnóstico se realiza por exclusión. Aproximadamente el 10% de todos los cánceres de pulmón son carcinomas de células grandes, y la mayoría de ellos se presentan en hombres. Estos tumores se desarrollan principalmente como masas de gran tamaño en la periferia del pulmón, por lo que se detectan habitualmente en las radiografías de tórax. Con frecuencia, el tumor invade la pleura visceral, la pared torácica y otras estructuras vecinas. Las metástasis a distancia se observan fundamentalmente en los ganglios linfáticos hiliares o mediastínicos, la pleura, el hígado, el hueso, el cerebro y el pericardio.

Clasificación histológica de la OMS del cáncer de pulmón de células no pequeña	
1.	Carcinoma de células escamosas
	Papilar
	Célula clara
	Célula pequeña
	Basaloide
2.	Adenocarcinoma
	Adenocarcinoma con subtipos mixtos
	Adenocarcinoma Acinar
	Adenocarcinoma Papilar
	Carcinoma bronquioloalveolar
	No mucinoso
	Mucinoso
	Mucinoso y no mucinoso mixto o de tipo celular indeterminado
	Adenocarcinoma sólido con mucina
	Adenocarcinoma fetal bien diferenciado
	Adenocarcinoma mucinoso (coloide)

Cistoadenocarcinoma mucinoso
Adenocarcinoma de células en anillo de sello
Adenocarcinoma de células claras
3. Carcinoma de células grandes
Carcinoma neuroendocrino de células grandes
Carcinoma neuroendocrino de células grandes combinado
Carcinoma basaloide
Carcinoma de tipo linfoepitelioma
Carcinoma de células claras
Carcinoma de células grandes con fenotipo rabdoideo
4. Carcinoma Adenoescamoso
5. Carcinoma sarcomatoide
Carcinoma pleomórfico
Carcinoma fusiforme
Carcinoma de células gigantes
Carcinosarcoma
Blastoma pulmonar
6. Tumor carcinoide
Carcinoide típico
Carcinoide atípico
7. Carcinoma de tipo de glándulas salivales
Carcinoma mucoepidermoide
Carcinoma quístico adenoide
Carcinoma epitelial-mesenquimal

Tabla 1. Clasificación histológica del CPCNP. Adaptado de la clasificación de la OMS del 2004.

El primer criterio de diagnóstico es el morfológico, de acuerdo a lo establecido por la OMS en 2004. El diagnóstico de cáncer escamoso requiere la presencia de puentes intercelulares o queratinización evidenciable como disqueratosis o perlas córneas. El de adenocarcinoma se realiza cuando se observan cuerpos glandulares y/o producción de mucina en forma de vacuolas. El segundo criterio consiste en la utilización de técnicas auxiliares como la preparación de histoquímicas del tipo PAS diastasa y mucicarmín o el uso de la inmunohistoquímica (IHQ) con paneles de anticuerpos (Tabla 2).

Se recomienda la utilización de PAS diastasa o mucicarmín cuando se observan vacuolas intracitoplasmáticas no categóricas de secreción. Si con estas técnicas se demuestra que contienen mucina se define el diagnóstico de ADC poco diferenciado. Si los criterios morfológicos y de histología no son suficientes se deben utilizar técnicas de IHQ [38, 39].

Marcador	Patrón Glandular	Patrón Escamoso
TTF1	+	-
CK7	+	-
Proteína surfactante	+	-
Napsina	+	-
P63	-	+
CDK20	+/-	-
CK5/6	-	+
CK 34βE12	-	+
Desmocolina-3	-	+
KRT81	-	+

Tabla 2. Marcadores utilizados de rutina en la clasificación del tipo histológico.

En estudios moleculares se ha sugerido un panel mínimo de dos marcadores, el TTF1 y p63 en el diagnóstico diferencial entre ADC y CE por IHQ. El TTF1 es el mejor marcador de ADC y como marcador de linaje ayuda a confirmar el diagnóstico de origen pulmonar en 75-80% de los ADC de pulmón [40]. p63 es un marcador recomendado para establecer diferenciación de células escamosas, con alta sensibilidad aunque en baja proporción también puede expresarse en adenocarcinomas [41]. p40, una de las isoformas de p63 (Δ Np63-p40) es un marcador de diferenciación escamosa más específico que el marcador p63 habitualmente usado. El cuidadoso examen morfológico e interpretación estricta de la IHQ nos facilitan unas suficientes y apropiadas herramientas para determinar los diferentes grupos dentro de los CPCNP. Uno de los trabajos realizados por nuestro grupo determinó la proteína KRT81 como buen marcador de CE con una especificidad superior al 95% [42].

1.2.3 Origen celular del cáncer de pulmón

El origen celular del cáncer de pulmón sigue siendo en gran medida desconocido. Los subtipos histológicos de CP siguen un patrón de distribución del eje proximal a distal, desde la tráquea. Los diferentes subtipos histopatológicos surgen a partir de células localizadas en diferentes áreas dentro de un compartimiento o microambiente definido (Figura 7) [43]. Sullivan y colaboradores, mediante un trabajo con tumores de pulmón en ratones transgénicos, determinaron que en este patrón de distribución, el CE podría derivar de la vía aérea proximal y el ADC de ubicaciones más distales [44]. Identificar el origen de estas células tiene implicaciones importantes, no sólo para la comprensión de la biología del cáncer de pulmón sino también para terapias contra éste [45].

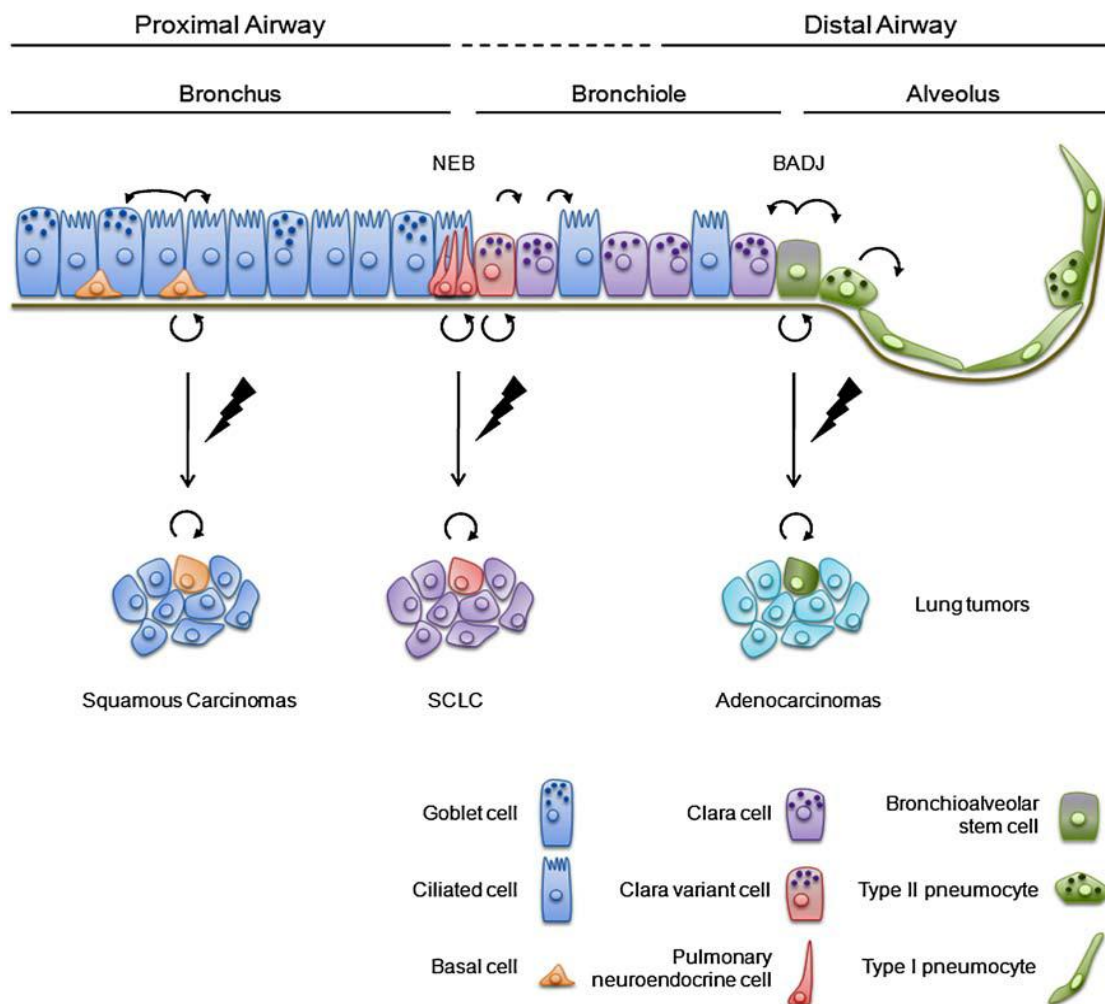


Figura 7. Sitios propuestos para la auto-renovación y la iniciación del tumor en el epitelio pulmonar [43].

El epitelio de pulmón está formado por una gran diversidad de células, cuyas funciones principales consisten en facilitar el intercambio de gases, mantener el equilibrio de los fluidos en el pulmón, desintoxicación y limpieza de los agentes externos y la activación de la inflamación debido a la lesión. La vía aérea proximal del tracto respiratorio incluye la faringe, la laringe, la tráquea y los bronquios. El epitelio traqueal de la vía aérea se compone principalmente de células ciliadas que segregan mucosidad para mantener la superficie del epitelio lubricado y permiten atrapar y eliminar los elementos extraños. El tracto pulmonar a continuación se ramifica en los bronquiolos y alvéolos, las células presentan una morfología cúbica. En esta región, el epitelio pulmonar está cubierto por las células Clara, que sirven para proteger y desintoxicar el epitelio bronquiolar. Las regiones más distales del pulmón contienen los bronquiolos terminales y los alvéolos, donde se produce el intercambio gaseoso en los sacos alveolares dentro de los lechos capilares. Los alvéolos están formados por los neumocitos tipo 1 y tipo 2. La morfología plana de los neumocitos tipo 1 permite la difusión del gas en los lechos capilares adyacentes. Los neumocitos tipo 2 presentan estructuras más cúbicas, su principal función es la de secretar proteínas que sirven para regular el equilibrio de líquido pulmonar y proporcionar elasticidad al epitelio pulmonar.

Las células iniciadoras de cáncer son propensas a exhibir propiedades inherentes a las células madre de los tejidos. Se ha demostrado en muchos tumores sólidos la existencia de subpoblaciones de células de cáncer con propiedades de este tipo [46]. En el caso del tejido pulmonar la identificación y caracterización de células madre ha progresado lentamente. Esto se puede atribuir en gran parte a la compleja estructura anatómica del pulmón y su heterogeneidad celular. Las células madre presentan una alta capacidad para la auto-renovación, producción de células nuevas y una gran capacidad de proliferar, lo que permitiría acumular mutaciones genéticas que causan displasia y crecimiento tumoral [47]. La regeneración del epitelio pulmonar ocurre cada 30 a 50 días y es menos frecuente que otros tejidos, como la sangre, la piel, entre otros. Sin embargo durante la lesión, la renovación celular se acelera en distintas regiones en el pulmón, donde se cree que la auto-renovación reside en las células madre [48].

Las células basales poseen la capacidad de diferenciación multipotente y pueden ser consideradas una población candidata como iniciadoras de tumor. Las células Clara también poseen esta capacidad de diferenciación, sin embargo se cree que la mayoría de estas células no lo hacen. Las variantes de células Clara y células cercanas neuroendocrinas pulmonares (PNEC) localizadas en la zona de bifurcación de los bronquiolos se ha demostrado que proliferan y participan en la renovación de las vías respiratorias. Estas células se las consideran las principales responsables del CPCP [45]. En la región más distal del pulmón donde el epitelio está compuesto por neumocitos tipo 1 y 2, son los de tipo 2 considerados como células progenitoras o células madre del epitelio alveolar en base a su capacidad tanto para dar lugar a células alveolares tipo I y su capacidad de autorenovación. La transición entre los alvéolos y bronquiolos terminales se conoce como la unión del conducto broncoalveolar (BADJ), donde existen células variante de Clara con propiedades de célula madre llamadas células madres broquioalveolares (BASCs), con capacidad de auto-renovación después de producirse un daño. Estos estudios sugieren que estas células podrían ser las responsables del inicio tumoral del subtipo histológico adenocarcinoma [49].

Kajstura y colaboradores, fueron los primeros en evidenciar la existencia de células multipotentes en pulmón humano adulto. Identificaron un conjunto de células que presentaban las características de célula madre. Determinaron mediante muestras de tejido tumoral de pacientes, como las células basales epiteliales, las células madres broquioalveolares, las células Clara y las células epiteliales alveolares tipo II estaban involucradas en la respuesta inflamatoria o daño, causado por agentes externos. Comprobaron *in vitro*, que en el pulmón humano hay diferentes tipos de células madres, con capacidad auto-regeneradora, con capacidad de clonar y multipotente. En estas células, observaron la pérdida de la expresión de marcadores hematopoyéticos, epiteliales, endoteliales o del linaje mesenquimal. Además, observaron que estas células presentaban expresión de genes que gobiernan la pluripotencia de las células madres embrionarias, tales como, el *NANOG*, *OCT3/4*, *SOX2* y *KLF4* [50]. Estos hallazgos, junto con los resultados de estudios *in vitro*, proporcionan la evidencia de que existen células madre multipotentes en el pulmón humano.

La autorenovación de las células madre es un proceso muy controlado que es gobernado por señales del propio nicho de las células madre, así como el control de las vías Wnt, Shh y Notch. La vía Wnt/ β -catenina desempeña un papel importante en la regulación de la auto-renovación de células madre hematopoyéticas, sin embargo, el papel de la señalización de Wnt en las células madre epiteliales de pulmón es menos conocido [51].

Recientemente, se ha descubierto que la activación de la vía Wnt/ β -catenina en el desarrollo del pulmón coincide con una expansión de BASCs y una atenuada diferenciación bronquiolar [52]. La vía de Shh es una vía clave en el desarrollo requerido para la embriogénesis adecuada. Alteraciones en la expresión y la activación de esta vía dará lugar a deformaciones en el desarrollo, así como a contribuir a la tumorigénesis [53]. La vía de señalización Notch está implicada en el destino celular, la organogénesis y la homeostasis del tejido. La señalización de Notch parece ser necesaria para la determinación de los destinos de células del epitelio pulmonar proximal y distal [54].

1.2.4 Biología molecular del cáncer de pulmón de célula no pequeña

En el cáncer de pulmón se da una serie de anomalías de origen genético y epigenético que pueden afectar a oncogenes que dan lugar a una pérdida del control en el mecanismo de crecimiento celular que conduce a una proliferación clonal de poblaciones celulares anormales, y genes supresores de tumores que alteran la fisiología celular y promueven un crecimiento tumoral maligno, induciendo una invasión tisular y expansión clonal. El saber identificar estos cambios nos puede ayudar a mejorar la detección precoz de tumores y así mejorar las estrategias de prevención.

Se ha observado que padecer un cáncer de pulmón puede ser debido a la relación entre la exposición a carcinógenos ambientales y la susceptibilidad genética de cada individuo, anteriormente comentado. Es esta susceptibilidad genética la que resulta determinante para entender por qué siendo el tabaco responsable de más del 90% de los casos de cáncer de pulmón en el hombre y del 80% en la mujer, sólo un 11-12% de los fumadores lo desarrollan.

Como se ha expuesto anteriormente, gran parte de los casos de cáncer de pulmón están relacionados con la exposición ambiental a los carcinogénicos, que promueven la aparición de mutaciones por medio de diversos mecanismos. Las proteínas más importantes en el metabolismo de los carcinógenos son el CYP1A1 y GSTM. El CYP1A1 es un miembro del gran sistema enzimático de los citocromos P450 que actúan activando a los carcinógenos y permitiendo así su unión al DNA y resultando así dañado. Por otra parte el GSTM1 es una forma activa del sistema enzimático Glutathion-S-transferasas. Su acción consiste en la inactivación de los carcinógenos, en concreto a los metabolitos reactivos de los HAP. Por lo tanto, un individuo que presente un genotipo con expresión de CYP1A1 y GSTM1-null, se considera de alto riesgo. Estas alteraciones y otras menos conocidas permiten que el DNA resulte aberrante, de lo que se derivan daños genéticos químicamente adquiridos. Los genes más susceptibles a padecer anomalías genéticas son aquellos que participan en la fiabilidad de la reparación del DNA, su replicación y la estabilidad genómica [55, 56].

La activación oncogénica puede ser causada por una amplificación genética, una mutación, la sobre-expresión o por otros mecanismos que afectan al gen. Los oncogenes más conocidos son el *ERBB-1*, *ERBB-2*, *MYC*, *MET*, *KRAS* y *EML4-ALK*. *ERBB-1* se conoce como el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Es una proteína transmembrana con actividad quinasa citoplasmática. Esta actividad tirosina quinasa de *EGFR* puede ser desregulada por varios mecanismos, como la mutación y el aumento de número de copias del gen o la sobreexpresión

de la proteína [57]. Dado que más del 60% de los CPCNP lo expresan, se ha convertido en una importante diana terapéutica para el tratamiento de estos tumores. Muchos otros factores de crecimiento están asociados e implicados en el cáncer de pulmón aunque de estos no se han realizado tantos estudios. El *ERBB-2* codifica para un miembro de la familia de los receptores de factores de crecimiento epidérmico. Se sobreexpresa en las fases iniciales de la transformación tumoral, hasta el 25% en los CPCNP. La sobre-expresión de *ERBB-2* constituye en CPCNP un factor de mal pronóstico en supervivencia [58].

El gen *KRAS* está implicado en las señales de transducción y proliferación celular. El 90% de las mutaciones de *RAS* en los cánceres de pulmón son de tipo *KRAS*, afectando el codón 12. Las mutaciones de *KRAS* se encuentran con mayor frecuencia en los tumores que surgen de personas fumadoras ya que se ha evidenciado la correlación de la mutación con el consumo de cigarrillos. Cerca del 10-15% de los CPCNP presentan mutaciones en este gen que activan las vías de MEK y ERK [59]. La vía *RAS / RAF / MEK / ERK* desregulan las repuestas celulares de los factores de crecimiento y receptores de factores de crecimiento en muchos tipos de cáncer.

En el grupo de alteraciones de los genes supresores tumorales, se incluyen la de los genes que codifican proteínas que actúan de manera fisiológica en el control del crecimiento, división celular y en la reparación del DNA alterado. Lo patológico vendrá asociado con la pérdida de la función del gen supresor tumoral. Es común que un alelo se inactive por pérdida de heterocigotidad, a través de una translocación o deleción cromosómica, y el segundo alelo se altere por una mutación o por un silenciamiento transcripcional o epigenético. Los mejor estudiados son *RB*, *P16* y sobre todo *TP53*.

La función como gen supresor del *TP53* es compleja. Codifica para una proteína reguladora de la transcripción, que preserva la integridad del genoma delante de cualquier agresión. Su función en la vida celular se dirige a controlar la división celular a través del punto de control G1/S, inhibir la función y/o expresión del gen *C-MYC* (necesario para el ciclo celular) y *RAS*, y controlar la iniciación de la síntesis de DNA. En cáncer de pulmón mutaciones en *TP53* se asocian a la inactivación de la actividad transcripcional. Es una de las primeras mutaciones observadas durante la carcinogénesis pulmonar. Una lesión citotóxica de los agentes que dañan el DNA o la presencia de hipoxia causa la estabilización de la proteína *TP53* que conduce a la expresión de genes para la detención del ciclo celular, lo que permite la reparación del DNA o la iniciación de la apoptosis. Alteraciones en este gen están presentes en más del 50% de todos los tipos morfológicos de cáncer de pulmón. La mayoría de las alteraciones genéticas de *TP53* en tumor son mutaciones puntuales dentro de las secuencias codificantes. Se

encuentran agrupadas entre los exones 5 y 8 en regiones conservadas. Las mutaciones de *TP53* se encuentran más frecuentemente en los fumadores en comparación con los no fumadores, 71% en comparación con el 48%, respectivamente y confieren un mal pronóstico. Los patrones de mutación *TP53* son diferentes en los cánceres de pulmón que surgen en las personas fumadoras y no fumadoras. Los cambio de G:C a T:A y A:T a G:C en las islas CpG son más frecuentes en los fumadores, un 45% comparado con 10% en los no fumadores. Por lo contrario, los cambio de G:C a T:A en sitios no-CpG es más común en las persona que nunca han fumado, el 29% en comparación con el 4% en fumadores [60].

El gen del restinoblastoma actúa como un regulador del ciclo celular, deteniéndolo. La vía de PRB (proteína retinoblastoma) juega un papel esencial en la supresión de tumores en el epitelio pulmonar y también se encuentra alterada en otros tipos de cancer. En el estado hipofosforilado, la PRB está activa y lleva a cabo su función de supresora de tumor inhibiendo la progresión del ciclo celular. La hiperfosforilación de la ciclina D1/CDK4 inactiva PRB, durante la transición de la fase M a G1 en el ciclo celular y puede evitar que la célula entre en un nuevo proceso de división. La pérdida o mutación de la PRB se encuentra entre el 15-30% de los CPCNP [61].

El cáncer de pulmón muestra inestabilidad genética que da lugar a pérdidas o ganancias de porciones enteras o parciales de cromosomas. Las causas exactas de la inestabilidad del cromosoma son inciertas. Otra forma de inestabilidad cromosómica es la inestabilidad de microsatélites que resulta en cambios de la secuencia de DNA. Hay alteraciones en genes encargados de la reparación del DNA. Se trata de proteínas que regulan el ciclo celular y que reparan el DNA aberrante e impiden su replicación.

Los cambios epigenéticos también son comunes en el cáncer de pulmón. La hipermetilación de las citosinas en las islas CpG del promotor de un gen puede conducir a la pérdida de la expresión. El inhibidor 2A de quinasa dependiente de ciclina, también denominado P16 es una proteína supresora de tumores. P16 es inactivado por mutaciones, deleciones homocigóticas y la hipermetilación del promotor en el 70% de los casos de CPCNP.

La detección del DNA metilado en el esputo o sangre puede ser un biomarcador útil para la detección temprana de cáncer de pulmón. Se ha demostrado que la detección de tres o más genes metilados de un panel de seis genes seleccionados correlacionados con una aumento de 6,5 veces más en el cáncer de pulmón con una sensibilidad y especificidad de 64% [62]. Además, otro cambio epigenético que inhibe el gen de expresión es la desacetilación de histonas. La metilación del promotor y la desacetilación de la histona son procesos reversibles,

por lo tanto, la inhibición farmacológica es una estrategia terapéutica que puede revertir el silenciamiento de genes supresores de tumores.

Secuencias de telómero TTAGGG repetitivas localizadas en el extremo de cromosomas de mamíferos protegen los cromosomas de la degradación. Los telómeros se acortan después de cada división celular. La telomerasa mantiene los telómeros alargados, por tanto su actividad son punto de interés en la biología molecular del CP. El incremento de la expresión de la telomerasa se cree que contribuye a la inmortalización inicial de las células, y la sobreexpresión de las telomerasas se encuentra en el 80% de CPCNP. El fumar se asocia con el incremento de la actividad de la telomerasa en células epiteliales bronquiales normales.

Otros genes importantes involucrados en cáncer de pulmón son los relacionados con las vías de señalización involucrados en la auto-renovación y el mantenimiento de las células madre: *NOTCH*, *WNT* Y *SHH*. Se pueden encontrar mutaciones en estos genes que implican la desregulación de sus vías de señalización. Es importante conocer estas vías para poder desarrollar estrategias terapéuticas más efectivas, que tengan como diana las células madres tumorales que tienen un papel importante en la progresión del cáncer [63].

En los últimos años también se ha descrito como los micro-RNAs participan en la biología del CPCNP [64], el estudio de estas pequeñas moléculas ha sido el principal objetivo de esta tesis doctoral y por ello las explicaré ampliamente más adelante.

1.2.5 Diagnóstico, estadiaje, pronóstico y tratamiento

Diagnóstico

El diagnóstico y la estadificación de un cáncer de pulmón deben de comenzar por una buena historia clínica y exploración. La mayoría de los pacientes, entre el 87% y el 94%, que presentan cáncer de pulmón suelen mostrar síntomas clínicos en el momento de su diagnóstico, cuando acuden a ser visitados por un profesional [65]. El cáncer de pulmón puede producir síntomas causados por el tumor primario, por compromiso del parénquima o invasión de estructuras vecinas, o debidos a las metástasis [65, 66]. Los síntomas son principalmente de origen respiratorio: tos, disnea, dolor torácico y hemoptisis, por compromiso local del tumor primario o de las metástasis.

Los estudios de imagen se realizan por medio de las radiografías de tórax, prueba sencilla y de fácil acceso, y puede servir para pacientes asintomáticos o para el seguimiento de otras enfermedades. Las TCs deben realizarse en todos los pacientes con sospecha clínica de cáncer de pulmón ya que permite evaluar las características del tumor (tamaño, localización, densitometría, refuerzo del contraste, cavitación) y establecer su extensión (relación con las cisuras, superficie pleural, infiltración de pared, mediastino, hilio, pericardio o diafragma) [67-69]. La tomografía con emisión de positrones (PET) es recomendable para la estadificación mediastinal [70, 71], es muy útil en el diagnóstico diferencial del nódulo pulmonar solitario. El PET puede revelar de 5 - 20% de lesiones ocultas, no sospechables clínicamente pero a la vez presenta muchos falsos positivos [72]. La resonancia magnética (RM) tiene eventual utilidad en tumores del sulco superior para evaluación de la extensión y el compromiso óseo y de partes blandas [73].

Una vez se confirma histológicamente el cáncer de pulmón, se evalúa la existencia de enfermedad metastásica. Se realiza una resonancia cerebral y una gammagrafía ósea que sirva para descartar posibles lesiones en la distancia. En el momento del diagnóstico, del 50- 55% de los pacientes presentan diseminación a distancia. Los sitios y hallazgos más frecuentes son el cerebro (10% al diagnóstico). Las metástasis raquídeas son menos frecuentes y generalmente secundarias a afectación central. Cuando llega a hueso se manifiestan con dolor y fracturas patológicas frecuentes.

Estadíaaje

La estadificación del cáncer de pulmón es crítica para realizar una descripción estandarizada de la enfermedad que permita determinar el tratamiento a seguir y establecer el pronóstico de los pacientes. La responsabilidad de la estadificación estará determinada por la participación del cirujano torácico, el neumólogo, el radiólogo, el patólogo y el oncólogo. Lo ideal en la estadificación clínica es excluir la presencia de metástasis ganglionar con la mayor exactitud posible que permitirá ofrecer al paciente el mejor tratamiento posible, que es la resección tumoral, ya que el compromiso ganglionar mediastinal indica mal pronóstico. Esta estadificación pretende establecer la situación del tumor de acuerdo con el patrón habitual de diseminación de este cáncer y se utiliza el sistema TNM, proveniente del Ingles, *Tumor, Node, Metastasis*. El parámetro “*T*” tumor, se establece respecto al crecimiento del tumor primario en tamaño o su extensión a estructuras vecinas. El parámetro “*N*” define la afectación a nivel de los ganglios linfáticos y el parámetro “*M*” nos describe la presencia o ausencia de metástasis.

En los pacientes que padecen CPCNP se realiza inicialmente antes de cualquier tratamiento un estadíaaje clínico, basado en la historia clínica del paciente registrada en el hospital, en todas las pruebas físicas evaluadas en él, todos los análisis a nivel de laboratorio y radiológico. En este tipo de estadíaaje se le añade un prefijo “*c*” delante del estadio. El segundo estadíaaje que se efectúa es a nivel del estadio patológico, se elaborará a partir del estadio clínico más los datos histopatológicos del tumor extraído. A este nivel se tienen en cuenta el grado histológico, el estado de los márgenes de resección y la presencia o ausencia de invasión linfovascular. La nomenclatura para identificar este estadíaaje es añadiendo una “*p*” delante del estadio, cuyo máximo interés es la estimación del pronóstico [74].

La clasificación TNM utilizada en este trabajo es la que se estableció en 1997 (Tabla 3). En el 2007 se realizó una actualización y ésta es la que se utiliza actualmente y se recoge en el *International Asociation for the Study of Lung Cancer (IASLC)* en la 7ª edición [75] (Tabla 4).

Categoría T (Tumor primario)
T0: Sin evidencia de tumor primario.
TX: No se puede valorar el tumor primario o hay tumor demostrado por la presencia de células malignas en el esputo o lavados bronquiales, pero no visualizado por técnicas de imagen o broncoscopia.
TIS: Carcinoma in situ.
T1: Tumor de ≤ 3 cm en su diámetro mayor, rodeado de pulmón o pleura visceral, y sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal que el bronquio lobar (no en el bronquio principal).
T2: Tumor con cualquiera de los siguientes datos en relación al tamaño o a la extensión: $>$ de 3 cm en su diámetro mayor; afecta el bronquio principal a 2 cm o más de la carina principal; invasión de la pleura visceral; asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende a la región hiliar pero no afecta a un pulmón entero.
T3: Tumor de cualquier tamaño que directamente invade cualquiera de lo siguiente: pared torácica (incluye tumores del surco superior), diafragma, pleura mediastínica o pericardio parietal; o tumor en el bronquio principal a menos de 2 cm de la carina principal, pero sin afectación de la misma; o atelectasia o neumonitis obstructiva asociada del pulmón entero.
T4: Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de lo siguiente: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, esófago, cuerpo vertebral, carina; nódulo/s tumoral separado del original en el mismo lóbulo; tumor con derrame pleural maligno.
Categoría N (Ganglios linfáticos regionales)
N0: Sin metástasis ganglionares regionales.
NX: No se pueden valorar los ganglios regionales.
N1: Metástasis en los ganglios peribronquiales y/o hilares ipsilaterales, incluyendo la extensión directa del tumor primario.
N2: Metástasis en los ganglio(s) mediastínicos ipsilaterales y/o subcarinales.
N3: Metástasis en los ganglio(s) mediastínicos contralaterales, hilares contralaterales, escalénicos o supraclaviculares (ipsi o contralaterales).
Categoría M (Metástasis a distancia)
M0: No metástasis a distancia.
MX: No se puede valorar la presencia de metástasis a distancia.
M1: Metástasis a distancia que incluye nódulo/s tumoral en otro diferente lóbulo ipsi- o contralateral.

Tabla 3. El sistema internacional de estadificación TNM para cáncer de pulmón de célula no pequeña. Adaptado de la OMS de 1997.

Las diferencias existentes en la séptima edición, con la anterior comentada, se basan en la reclasificación de los embasamientos pleurales malignos y de los nódulos pulmonares separados. Se ha cambiado algún punto de corte en la medida y se han subdividido los grupos T1, T2 y M1. El grupo T1 se subclasifica en T1a cuando el tumor es \leq a 2cm y T1b se designan aquellos tumores que se encuentran $>$ de 2cm y \leq a 3cm. El grupo T2 se subclasifica en T2a engloba los tumores $>$ de 3cm y \leq que 5cm y T2b engloba los tumores de $>$ de 5cm y \leq que 7cm. Los T2 $>$ de 7cm se reclasifica como T3. Los T4 por nódulo(s) adicional(es) en lóbulo del tumor primario se reclasifican como T3. Los M1 por nódulo(s) adicional(es) en lóbulo homolateral diferente del tumor primario se reclasifica como T4. Los T4 por derrame pleural maligno se reclasifica como M1a. En la categoría M, M1 se subclasifica en M1a englobando nódulo(s) tumoral(es) separado(s) en lóbulo contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno. Los M1b englobará a los pacientes con presencia de metástasis [76].

Categoría T (Tumor Primario)
T0: Sin evidencia de tumor primario.
TX: Tumor primario que no puede ser evaluado, o tumor probado por la existencia de células tumorales malignas en esputo o lavados bronquiales pero no visualizado por métodos de imagen o broncoscopia.
TIS: Carcinoma in situ.
T1: Tumor \leq 3 cm en su mayor diámetro, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal del bronquio lobar (es decir: no hay invasión en el bronquio principal).
T1a: Tumor \leq 2 cm en su mayor diámetro.
T1b: Tumor $>$ 2cm pero \leq 3 cm en su mayor diámetro.
T2: Tumor $>$ 3cm pero \leq 7 cm en su mayor diámetro o tumor con cualquiera de las siguientes características (Los tumores T2 con estas características se clasificarán como T2a si su diámetro es \leq 5cm): afecta al bronquio principal, distante 2 cm o más de la carina principal; invade la pleura visceral; asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva que se extiende hasta la región hilar pero no afecta al pulmón entero.
T2a: Tumor $>$ 3cm pero \leq 5 cm en su mayor diámetro.
T2b: Tumor $>$ 5cm pero \leq 7 cm en su mayor diámetro.
T3: Tumor $>$ 7cm o de cualquier tamaño que invada directamente cualquiera de las siguientes estructuras: pared torácica (incluyendo los tumores del sulcus superior), diafragma, nervio frénico, pleura mediastínica, pericardio parietal; o un tumor a menos de 2 cm de la carina principal pero sin invadirla; o asociado a atelectasia o neumonitis obstructiva del pulmón entero o

existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en su mismo lóbulo.
T4: Tumor de cualquier tamaño que invade cualquiera de las siguientes estructuras: mediastino, corazón, grandes vasos, tráquea, nervio recurrente laríngeo, esófago, cuerpo vertebral, carina; o existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo diferente del pulmón homolateral.
Categoría N (ganglios linfáticos regionales)
N0: No existen metástasis ganglionares linfáticas regionales.
NX: Los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
N1: Metástasis en ganglios linfáticos peribronquiales homolaterales y/o hiliares homolaterales e intrapulmonares, incluyendo la afectación por extensión directa.
N2: Metástasis en ganglios linfáticos mediastínicos homolaterales y/o subcarinales.
N3: Metástasis ganglionares linfáticas mediastínicas contralaterales, hiliares contralaterales, escalénicas homolaterales o contralaterales, o supraclaviculares.
Categoría M (metástasis a distancia)
M0: No existen metástasis a distancia.
MX: Las metástasis a distancia no pueden ser evaluadas.
M1: Existen metástasis a distancia.
M1a: Existencia de nódulo(s) tumoral(es) separado(s) del tumor primario, en un lóbulo del pulmón contralateral; tumor con nódulos pleurales o derrame pleural (o pericárdico) maligno.
M1b: Existen metástasis a distancia.

Tabla 4. El sistema internacional de estadificación TNM para cáncer de pulmón de célula no pequeña. Adaptado de la OMS del 2007.

Los pacientes, a su vez, se agrupan en estadios con un pronóstico similar con la intención de facilitar su manejo. En la tabla siguiente se muestra gráficamente la agrupación por estadios (Tabla 5).

Estadíaaje anatómico	Grupos pronósticos		
Carcinoma oculto	TX	N0	M0
Estadio 0	TIS	N0	M0
Estadio IA	T1a	N0	M0
	T1b	N0	M0
Estadio IB	T2a	N0	M0
Estadio IIA	T2b	N0	M0
	T1a	N1	M0
Estadio IIB	T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
Estadio IIIA	T3	N0	M0
	T1a	N2	M0
	T1b	N2	M0
	T2a	N2	M0
	T2b	N2	M0
Estadio IIIB	T3	N1	M0
	T3	N2	M0
	T4	N0	M0
	T4	N1	M0
	T1a	N3	M0
	T1b	N3	M0
	T2a	N3	M0
T2b	N3	M0	
Estadio IV	T3	N3	M0
	T4	N2	M0
	T4	N3	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1a
	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla 5. Clasificación de los estadios. Adaptada por la OMS del 2007.

Pronóstico

El CPCNP en estadio precoz se considera una enfermedad potencialmente curable mediante resección quirúrgica completa. Aproximadamente el 30% de los enfermos se diagnostican en estadios quirúrgicos pero, a pesar de la cirugía, un número importante de enfermos recaen durante los dos primeros años de seguimiento. En estadios I, II y IIIa pueden recaer hasta el 50% de los pacientes (Figura 8). Los pacientes se tratan con cirugía en estadios iniciales y con quimioterapia +/- radioterapia en fases más avanzadas. Aunque existen avances en el conocimiento de esta enfermedad, el pronóstico de los pacientes con CPCNP sigue siendo pobre, con una supervivencia global (SG) a los 5 años alrededor del 15%.

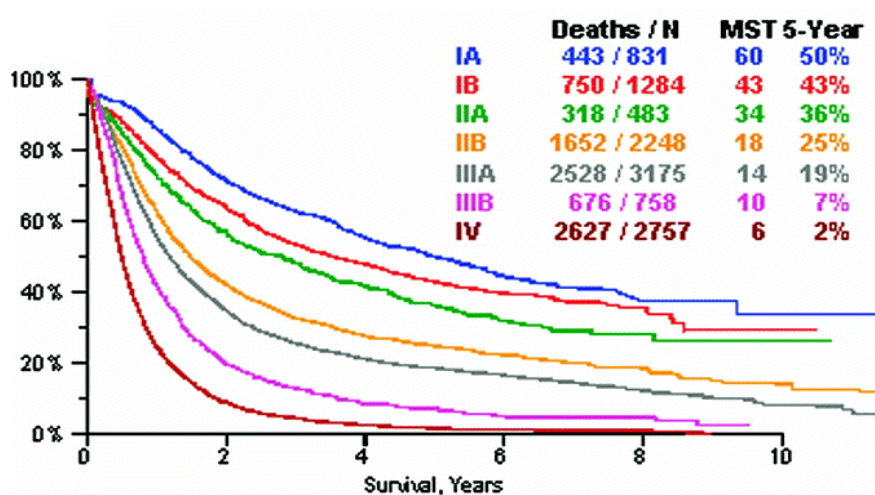


Figura 8. Supervivencia en años de pacientes de cáncer de pulmón clasificados en estadios.

Tratamiento del cáncer de pulmón de célula no pequeña.

El tratamiento quirúrgico ofrece la mayor supervivencia y actualmente es el único tratamiento que ofrece poder curativo. El objetivo de la cirugía es obtener la resección tumoral completa tal y como se ha definido por el comité de estadificación de la IASLC. En el CPCNP se considera que los estadios Ia, Ib, Ila y I Ib son susceptibles de un tratamiento quirúrgico. Los estadios IIIa, IIIb y IV no son quirúrgicos y el estadio IIIa puede ser tratado quirúrgicamente en algunos casos después de una quimioterapia neoadyuvante.

La preparación preoperatoria es muy importante y tiene que darse con un abandono total del consumo de tabaco, efectuar ejercicios de fisioterapia respiratoria y rehabilitación, la administración de terapia broncodilatadora o cardíaca (si está indicada) y el establecimiento de anticoagulación profiláctica pre y postoperatoria.

Las resecciones óptimas son la resección completa del pulmón (neumonectomía), la extirpación de un segmento del pulmón (lobectomía o segmentectomía), hasta la resección exclusiva de la lesión tumoral (tumorectomía). Pueden ampliarse a estructuras o tejidos afectados por contigüidad como pared torácica, diafragma o mediastino. En cualquier tipo de resección pulmonar completa se debe realizar una disección ganglionar sistemática que se define como la extirpación de todos los ganglios en todas las estaciones ganglionares del pulmón y del mediastino del lado operado.

Tras la cirugía el tumor se someterá a una reestadificación en función de los hallazgos patológicos con una nueva clasificación denominada pTNM.

La cirugía es el tratamiento favorito en aquellos pacientes de CPCNP en estadio I y II. Con la cirugía se puede llegar a curar un porcentaje importante de pacientes sin necesidad de realizar ningún tratamiento posterior, pero el 50% de los pacientes intervenidos recaen: dos terceras partes de forma sistémica y una tercera parte localmente. Por lo que el tratamiento adyuvante en los pacientes con cáncer de pulmón está justificado. Estudios recientes han validado los beneficios de la quimioterapia adyuvante tras la cirugía basada en combinaciones que incluyen platinos, sugerido por el meta-análisis de 1995 [77] en el grupo de pacientes con estadio IIa, IIb y IIIa. De este modo, salvo que existan contraindicaciones para su indicación (complicaciones postquirúrgicas, estado funcional, co-morbilidad), se recomienda la prescripción de 4 ciclos de quimioterapia en pacientes con estadio II-IIIa [78]. La indicación en pacientes con estadio Ib debe individualizarse ya que su eficacia es menos clara. La quimioterapia que se emplea es una combinación de medicamentos antitumorales que están basados en un fármaco clásico pero muy eficaz en cáncer de pulmón, el cisplatino. Junto con el cisplatino se añade otro fármaco antitumoral con capacidad de destruir las células tumorales; el más utilizado es el vinorelbina, ya que es el que ha demostrado más beneficio en los estudios desarrollados. Los pacientes con estadios I-II que presentan tumores resecables pero inoperables por disfunción respiratoria, edad, cardiopatía, o rechazo a cirugía tienen indicación de radioterapia radical con intención curativa. Existe posibilidad de curación en aquellos que presenten tumores de menos o igual a 4cm. En pacientes tratados con cirugía debe asociarse a radioterapia adyuvante si existen márgenes quirúrgicos positivos o afectación ganglionar mediastínica (N2, N3). Actualmente es controvertida su indicación en N1.

Los pacientes con estadio IIIa (excepto N2T3) se consideran subsidiarios de tratamiento multimodal con quimioterapia neoadyuvante seguido de cirugía. La quimioterapia preoperatoria permite una reducción del tamaño del tumor que puede facilitar la resección

quirúrgica. En los pacientes con tumores localmente avanzados no subsidiarios de cirugía curativa, el tratamiento de elección es la combinación de quimioterapia y radioterapia. La quimioterapia puede ser administrada antes de la radioterapia (terapia neo-adyuvante), o simultáneamente (terapia concomitante). En el estadio IIIb, el tratamiento con quimioterapia con cisplatino y radioterapia torácica, se considera el tratamiento estándar [79].

En los pacientes de estadio IV generalmente no se tratan con cirugía ni radioterapia. La mayoría de estos pacientes solo reciben quimioterapia que permite un incremento de la supervivencia. El propósito del tratamiento puede ser mejorar los síntomas mediante el control local del cáncer, incrementar las posibilidades de curación del paciente o prolongar su vida. Se tiende cada vez más a la individualización de los tratamientos, la decisión de que tipo de tratamiento se aplica se debe a unos criterios clínicos, pero también hay que tener en cuenta otras características como la anatomía patológica y concretamente, los subtipos histológicos de los pacientes. El uso de fármacos como el bevacizumab o pemetrexed restringe su eficacia al subtipo carcinoma no escamoso y son considerados tratamientos de primera línea. Cuando este tratamiento no ha sido eficaz o el tumor ha vuelto a crecer, se puede plantear aplicar un tratamiento quimioterapéutico de segunda línea. Los fármacos recomendados en esta situación son el docetaxel o el pemetrexed.

Otra manera de determinar un tratamiento se basa en los criterios moleculares. Se ha demostrado que en pacientes que presentan la mutación de *EGFR*, fármacos que se llaman inhibidores de tirosín-kinasa, como el erlotinib y gefitinib van a proporcionar un beneficio más alto que la quimioterapia convencional. También se ha demostrado que otro biomarcador, la translocación ALK, que ocurre en 5-7% de los ADC, es altamente sensible a un nuevo fármaco llamado crizotinib, inhibidor de la cinasa. La cinasa es una sustancia que se produce de manera natural y actúa en la multiplicación de las células cancerosas.

1.3 Generalidades del cáncer colorrectal

1.3.1 Epidemiología y etiología

Epidemiología

El cáncer colorrectal (CCR) presenta actualmente una alta incidencia y elevada mortalidad. Es una de las neoplasias más frecuentes en los países occidentales. Ocupa el tercer lugar en incidencia en ambos sexos, en el caso de los hombres se encuentra por detrás del cáncer de próstata y pulmón, y en el caso de las mujeres se encuentra por detrás del cáncer de pulmón y mama. Durante el 2014, en Estados Unidos se estima que se presenten unos 96.830 casos nuevos de cáncer de colon y 40.000 casos de cáncer de recto y se esperan 50.310 muertes causadas por cáncer colorrectal [80]. La alta incidencia ha ido decreciendo debido al incremento del uso de métodos de detección precoz que han posibilitado eliminar los pólipos (crecimientos anormales de tejido que surgen de la capa interior o mucosa del intestino grueso y sobresalen al canal intestinal) antes de que progresen a cáncer. Del 2006 al 2010, la tasa de incidencia ha disminuido un 3,7% por año en personas de más de 50 años. La tasa de mortalidad también se ha visto disminuida en las últimas dos décadas; desde el 2006 al 2010 en hombres ha disminuido un 2,5% y en mujeres un 3,0%.

La edad media de presentación es de 68 años y un 90% de los pacientes tienen más de 50 años en el momento del diagnóstico, pero también puede aparecer en personas jóvenes. Los casos que aparecen a edades tempranas suelen tener una predisposición genética. La mayor incidencia se registra en países de Europa, América del Norte y Oceanía, mientras que la incidencia es más baja en algunos países de Asia y África [81]. En Estados Unidos, la población con mayor incidencia es la afroamericana. En el periodo 2006 al 2010, este grupo presentó una incidencia un 25% mayor que la población blanca y un 50% superior que los asiáticos u originales del Pacífico (Figura 9)[3].

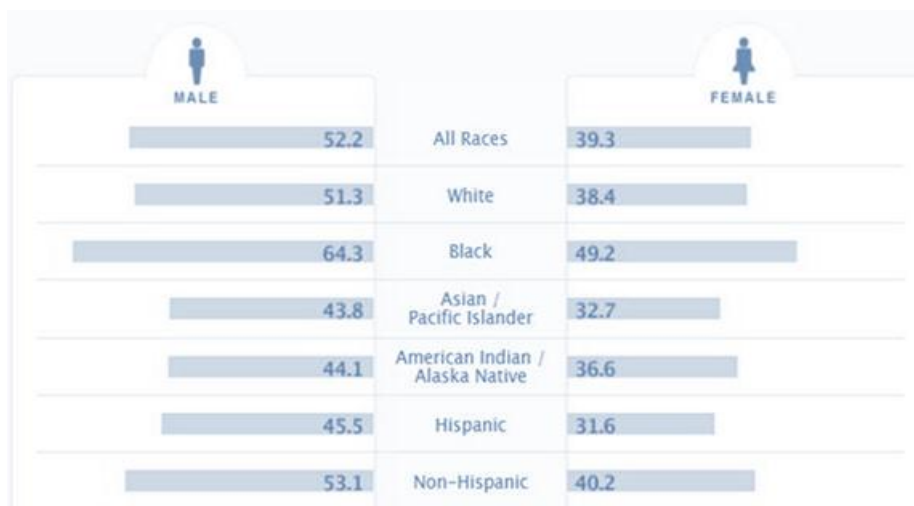


Figura 9. Número de casos de CCR por 100.000 habitantes por etnia y sexo [3].

Etiología

Se conocen muchos factores que pueden aumentar o disminuir el riesgo de padecer un CCR, algunos de estos factores son modificables y otros no. Factores no modificables incluyen los factores hereditarios o familiares, pólipos adenomatosos y antecedentes familiares de patologías asociadas a inflamación crónica del intestino. *The American Cancer Society* y otras organizaciones, recomiendan que las personas que tengan alta probabilidad de padecer un CCR se sometan lo más temprano posible a un *screening* de detección precoz de pólipos. Los factores de riesgo modificables son aquellos factores que cuando se cambian pueden suponer una disminución de padecer un CCR, por ejemplo el realizar actividad física, la disminución de la obesidad, disminuir el consumo de carne roja u otras carnes procesadas, dejar de fumar y reducir la cantidad de ingesta de alcohol [80].

El riesgo de padecer un CCR aumenta proporcionalmente con la edad. En el 2010, el 90% de los casos fueron diagnosticados en personas de más de 50 años. Por tanto la edad se considera uno de los factores de riesgo más importante en el CCR.

Familiares cercanos de una persona con antecedentes de CCR tienen mayor probabilidad de presentar esta enfermedad, especialmente si el familiar tuvo el cáncer en edad joven. Cambios en ciertos genes aumentan el riesgo de padecer cáncer colorrectal. El cáncer de colon hereditario no polipósico (CCHNP) o síndrome de Lynch, el tipo más común de CCR heredado, causado por mutaciones en los genes reparadores del DNA [82]. La poliposis adenomatosa familiar (PAF) es una enfermedad hereditaria en la que se forman cientos de pólipos en el colon y recto debido a mutaciones en el gen *APC*. Los familiares de personas que presentan

estos síndromes pueden hacerse pruebas genéticas para buscar mutaciones genéticas específicas. Es importante destacar, que las personas que ya han tenido un cáncer colorrectal en el pasado pueden recaer una segunda vez, por lo que es importante realizar pruebas de seguimiento y control de la persona.

Aquellos individuos que presentan otras enfermedades, como diabetes tipo II presentan un mayor riesgo de CCR [83]. Padecer colitis ulcerosa o enfermedad de Crohn, donde se observa una inflamación del colon también aumentan el riesgo [84]. El tabaco puede hacer que la persona presente un número mayor de pólipos y esto implique que tenga mayor riesgo de padecer un CCR [85].

La dieta tiene un papel muy importante y cada vez se tiene más en consideración. Las dietas ricas en grasa y pobres en frutas y verduras, con una pobre aportación de calcio, folato y fibra también pueden aumentar el riesgo de CCR [86]. El consumo de leche y calcio, y los niveles de vitamina D en sangre parecen disminuir el riesgo de CCR [87]. Se ha demostrado que hay factores protectores que se tienen que tener en cuenta y que son importantes para prevenir esta patología.

1.3.2 Clasificación del cáncer colorrectal

La mayoría de los tumores colorrectales se incluyen dentro de los tumores de tipo esporádico (75-80%). Se estima que hasta un 30% del total de tumores detectados podrían tener un componente hereditario familiar. Entre un 5-6% de la población afectada se asocia con síndromes hereditarios autosómicos dominantes, principalmente el CCHNP y la PAF (Figura 10) [88].

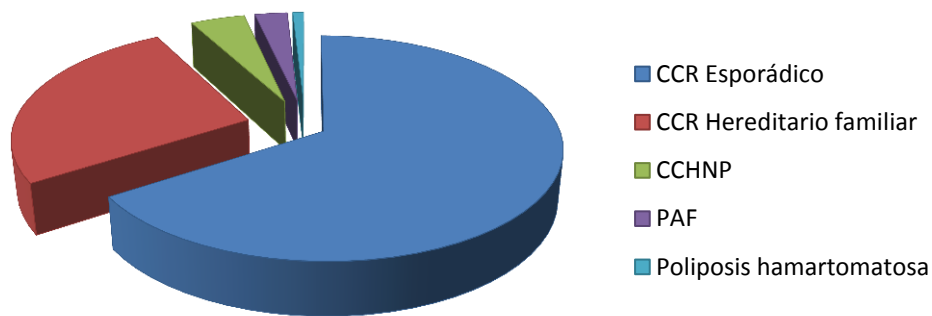


Figura 10. Distribución de los subtipos de cáncer colorrectal en la población.

Cáncer colorrectal esporádico

En el CCR esporádico se producen una serie de cambios genéticos que permiten la pérdida de genes supresores de tumores y activación de oncogenes. En 1990, Vogelstein describió en su modelo genético de múltiples etapas, que la acumulación de múltiples mutaciones genéticas conducían a un crecimiento de las células epiteliales en el colon [89]. En la actualidad se sabe que los cambios pueden ocurrir por dos mecanismos diferentes. El primero, denominado inestabilidad cromosómica (INC), se asocia a una pérdida de heterocigosidad en varios locus, en particular en determinados niveles de los cromosomas como el 5q, 17p y 18q1, lo que produce una acumulación de desórdenes cromosómicos. Esto aparece en el 80-85% de los CCR esporádicos. Un segundo mecanismo, es la inestabilidad de microsatélites (MSI), este conduce a una alta velocidad de mutaciones puntuales. Los microsatélites son regiones cortas de DNA que se repiten en tándem y que pueden estar dentro de genes, o bien, constituyen regiones del genoma que no codifican [90]. La MSI ocurre entre un 15-20% de los CCR y es el resultado de la inactivación del sistema de reparación de apareamientos erróneos (MMR), ya sea por mutaciones en dichos genes o bien por la hipermetilación del promotor del gen *MLH1*, uno de los genes del sistema.

En la mayoría de los casos esporádicos, la MSI aparece cuando la región promotora de *MLH1* resulta silenciada por una hipermetilación de islas CpG [91].

Cáncer hereditario familiar

El cáncer colorrectal familiar hace referencia a aquella situación en la que existen antecedentes familiares de CCR, pero no se cumplen ni los criterios clínicos ni los moleculares de los síndromes hereditarios conocidos. Está bien establecido que la existencia de antecedentes familiares de CCR aumenta el riesgo de desarrollar esta neoplasia y que este riesgo varía en función del número de familiares afectados, la edad al diagnóstico y el grado de parentesco.

Cáncer colorrectal no esporádico

El CCHNP es la causa más común de CCR hereditario, ocurren en un 3% de los casos hereditarios. Es un síndrome de herencia autosómica dominante, con elevada susceptibilidad a CCR y otras neoplasias extracolónicas asociadas. La edad media de presentación del cáncer colorrectal es aproximadamente 45 años. El CCHNP se produce por mutaciones en los genes que codifican para proteínas que participan en la reparación de bases mal apareadas. El CCHNP está asociado con mutaciones en uno o más de cuatro de estos genes: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2*, siendo las mutaciones en *MLH1* y *MSH2* las más frecuentes (40-50%). La frecuencia más baja de mutaciones se da en el gen *PMS2*, que se presenta mutado en menos de 2% de los casos [92]. *MLH1* y *MSH2* representan la base sobre la cual se realizan los estudios genéticos clínicos para determinar CCHNP en un individuo [93, 94].

La PAF constituye un 1% de los CCR y es un trastorno hereditario autosómico dominante, en el que se desarrollan múltiples pólipos (más de 100 pólipos) debido a la mutación del gen *APC*, situado en el brazo largo del cromosoma 5 (q21-q22) [95]. Pacientes con PAF heredan una copia mutada del gen *APC* y durante la vida adquieren la inactivación de la otra copia del gen *APC*, que acelera la progresión a padecer un CCR. Es diagnosticada a partir del año de edad, pero es a partir de los 40 años de edad cuando aparece el CCR si no se realiza el tratamiento adecuado [96, 97]. Más de 1.000 mutaciones diferentes del gen *APC* se describen como una causa de la PAF. La PAF atenuada (PAFA) es una variante menos agresiva de la PAF, que se caracteriza por un menor número de pólipos adenomatosos (de 10 a 100 pólipos) que aparecen a una edad más tardía y tienen un menor riesgo de padecer cáncer [98].

La poliposis hamartomatosa representa un pequeño porcentaje de todos los pólipos de colon, menos del 1%. Afecta principalmente a la población pediátrica y adolescente. Estos pólipos se derivan de una proliferación anormal de las células nativas del tejido de origen y pueden contener componentes celulares de cualquiera de las tres capas germinales que forman los intestinos [99]. Ejemplos típicos de este síndrome son el síndrome juvenil de poliposis que se asocia con mutaciones del gen *SMAD-4* [100] y *BMP1A* [101] y el síndrome de Peutz-Jeghers (SPJ). EL SPJ es un trastorno genético autosómico dominante, caracterizado por múltiples pólipos hamartomatosos en el tracto gastrointestinal, sobretodo se encuentran en el intestino delgado. Los pólipos presentan un diámetro de 0,1 a 5 cm y el número varía entre 1 a 20 por cada segmento del tracto gastrointestinal. Las manifestaciones extraintestinales más característicos son las lesiones mucocutáneas causando manchas de hiperpigmentación en la boca, manos y pies, que suelen presentarse en la infancia y se desvanecen en la adolescencia tardía. Los pacientes con SPJ tienen una mutación de línea germinal de la serina treonina quinasa 11 (STK-11), un gen supresor de tumores [102].

1.3.3 Origen celular del cáncer colorrectal

El epitelio del intestino se somete a una regeneración rápida y continua, con el apoyo de las células madre intestinales de las criptas. Esta característica aumenta gravemente el riesgo para la conversión maligna y de manifestar un cáncer [103].

Inicialmente, los estudios sobre la patogénesis del CCR se centraron en el proceso de selección clonal, un modelo de carcinogénesis postulado en 1975 [89]. La caracterización de los mecanismos genéticos que se relacionaban a este proceso vino de la mano de Vogelstein y colaboradores en 1990, que desarrollaron el modelo molecular de la progresión del CCR conocido como "modelo Vogelstein". De acuerdo con ello, el CCR se desarrolla a partir de células epiteliales que recubren el tracto gastrointestinal, sometidas a mutaciones secuenciales en genes supresores de tumor y oncogenes que afectan al balance entre la proliferación celular y la apoptosis (Figura 11) [89].

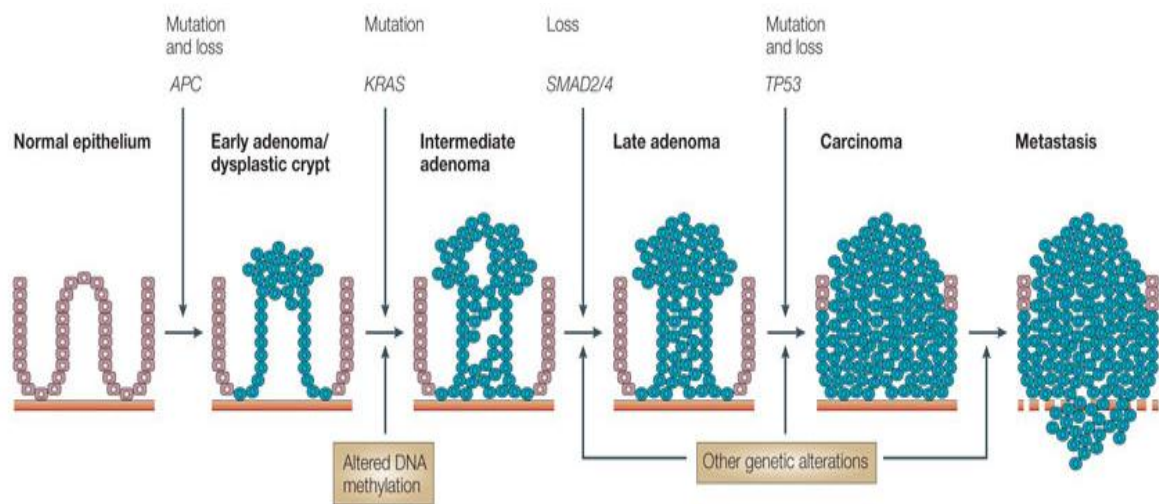


Figura 11. Progresión de epitelio normal a carcinoma colorrectal [104].

Cada uno de estos eventos mutacionales le confiere a cada una de las células del tumor una ventaja de crecimiento. Y cada evento que le sigue le confiere a la célula ventajas adicionales de crecimiento en comparación con el resto de las células del tumor que traen como resultado la expansión clonal en múltiples etapas y al final, la progresión del tumor. Como se ha comentado anteriormente, los eventos mutacionales pueden ser pequeñas deleciones, inserciones o sustituciones de un solo nucleótido, pero también pueden ocurrir cambios genéticos mayores como amplificación génica o pérdida de cromosomas completos.

La correcta identificación y el aislamiento de las células responsables de la formación del tumor siempre es un reto en la investigación del cáncer. Aunque las células madre se ha visto que están implicadas en la carcinogénesis de colon, debido a la complejidad de su biología y aspectos técnicos no resueltos, es todavía un tema de debate [105]. La fracción de células madre dentro del CCR puede ser identificado por la expresión del marcador de superficie celular CD133 [106]. CD133 es una glicoproteína transmembrana, expresada por progenitores pertenecientes a linajes neuronales, hematopoyéticos, epiteliales y endoteliales.

En los últimos años, CD133 ha sido reconocido como un marcador de células madre putativo de muchos tumores sólidos humanos, incluyendo neoplasias del hígado, páncreas y colon. Sin embargo, a pesar de los constantes esfuerzos de investigación, los mecanismos moleculares y vías de señalización que regulan el comportamiento de la expresión de CD133 en células madre sigue sin conocerse. Se ha demostrado que este antígeno se expresa en porcentaje significativamente mayor en las muestras de CCR en comparación con los respectivos tejidos normales. Hay sin embargo todavía algunas controversias sobre el papel de CD133 como marcador de célula madre en el CCR; las teorías opuestas emergen de la evidencia de que la mayoría de los anticuerpos se dirigen a CD133 con glicosilación dependiente de epítomos, cuya presencia se relaciona con la etapa de diferenciación de la célula [107, 108].

Del mismo modo que en el CP, uno de los puntos de más controversia es la célula responsable de la formación del cáncer. Se han sugerido dos hipótesis posibles: la teoría "*Bottom-up*" y la teoría "*Top-down*". La primera teoría propone que una célula madre intestinal de la cripta (ISC) (flecha amarilla en Figura 12A) es la primera célula transformada como consecuencia de la diferenciación anómala, dando lugar directamente a las células cancerosas o la adquisición de comportamiento de célula madre antes de inducir el cáncer. La segunda teoría propone que una célula diferenciada (flecha amarilla en Figura 12B) es la primera célula transformada que puede adquirir el comportamiento de células madre antes de inducir cáncer [109].

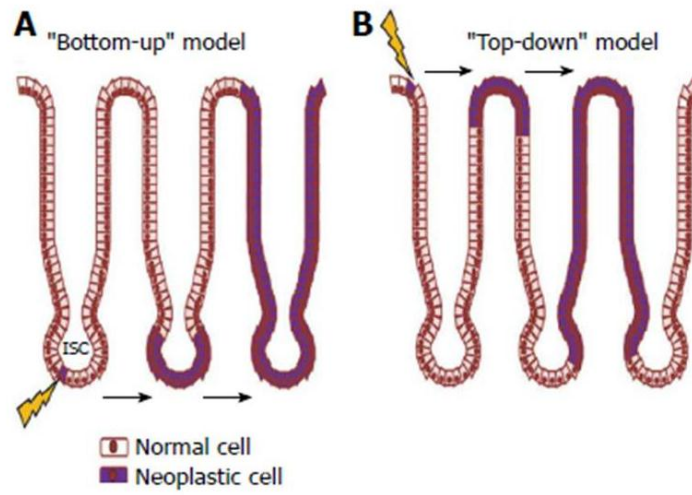


Figura 12. Presentación esquemática de las dos formas posibles de formación de un adenocarcinoma de colon. **A.** Teoría "Bottom-up"; **B.** Teoría "Top-down" [109].

1.3.4 Biología molecular del cáncer colorrectal

Mutaciones en genes supresores de tumores y oncogenes

En las primeras fases de la carcinogénesis, la mutación del gen *APC* ocurre en más del 80% de los adenomas y carcinomas colorrectales esporádicos y en el caso de la PAF [110], ya comentado anteriormente. El producto del gen supresor tumoral *APC* es una proteína multifuncional relacionada con la vía de señalización Wnt en la cual participa directamente la β -catenina. La β -catenina es un componente principal de las uniones intercelulares tipo adherentes, y participan en la señalización celular y procesos de transcripción. El mecanismo de acción de esta proteína opera en ausencia de señal por Wnt donde la β -catenina es fosforilada por un complejo proteico (conformado por la caseína cinasa-1 (CK1), sintasa de glucógeno 3 β (GSK3 β), axina y APC) para ser marcada por la ubiquitina y posteriormente ser degradada por el proteosoma (Figura 13A), por lo contrario, la presencia de Wnt desencadena la inactivación de GSK3 β , y en consecuencia los niveles de β -catenina aumentan y se translocan al núcleo actuando como coactivador de la transcripción al unirse a factores de transcripción como TCF/Lef (Figura 13B) generando señales de proliferación, diferenciación celular y resistencia a la apoptosis por la activación de los genes *C-MYC* y *CICLINA D* que favorecerán la aparición del adenoma [111].

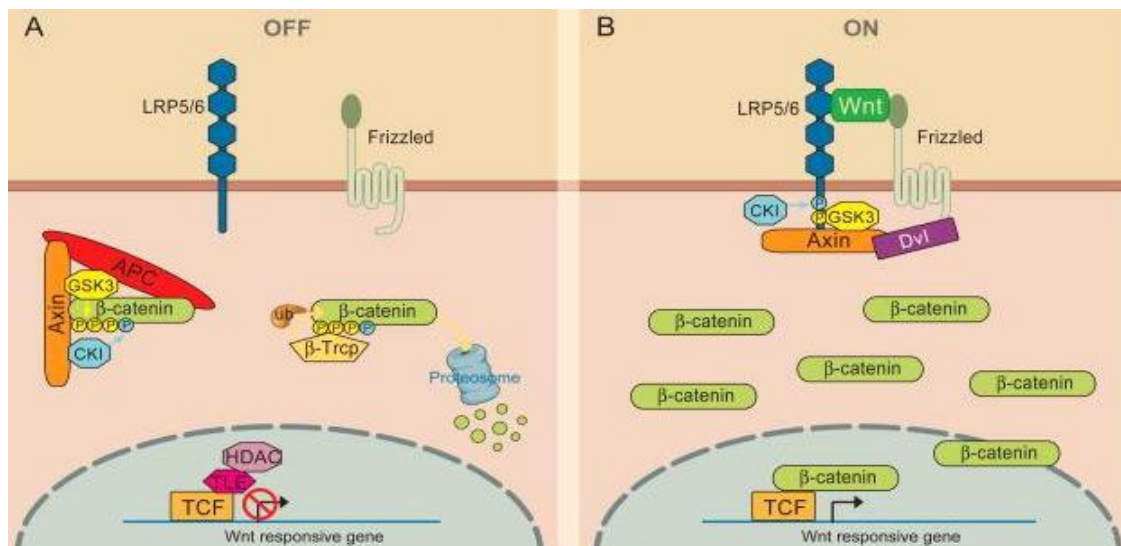


Figura 13. Representación de la señalización de Wnt/ β -catenina. **A.** En ausencia de la señal de Wnt, la β -catenina se degrada vía proteosoma gracias al complejo formado con APC, Axin, GSK3 β y CK1. **B.** En presencia del ligando de Wnt, un receptor Dvl no permite crear el complejo de la degradación de la β -catenina. Posteriormente se translocan al

núcleo y sirve como un co-activador para el TCF/Lef que permitirá activar los genes sensibles de Wnt [112].

En las siguientes etapas, cuando el proceso se dirige hacia un adenoma más avanzado, se producen mutaciones en diferentes genes, tales como *KRAS*, *SMAD2/4* y *TP53* que participan en la formación del carcinoma [113]. *KRAS* es un oncogén que se encuentra en el brazo corto del cromosoma 12. Alrededor de un 40% de los CCR presentan mutaciones en los codones 12 y 13. Las mutaciones en este gen suponen su activación, que implica la activación de la cascada de señalización de la MAPs quinasas que activan factores de transcripción que favorece la expresión de genes asociados con la proliferación celular. Esto implica que las células tumorales presenten más proliferación celular y resistencia a la apoptosis [114].

El gen *SMAD4* se encuentra en el cromosoma 18 y codifica una proteína implicada en la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta TGF- β [115]. Se observan deleciones en homocigosis, mutación puntual y/o pérdida de expresión en un 20% de los adenomas y este porcentaje aumenta en carcinomas, que se asocia a una metástasis a distancia [116].

El gen *TP53* se localiza en el brazo corto del cromosoma 17 afectando a vías determinantes en la progresión del adenoma a tumor maligno. En el caso del CCR los estudios han demostrado que las mutaciones somáticas en el gen *TP53* se han encontrado en el 43,3% de las muestras. Del mismo modo que en el CP, las mutaciones en *TP53* se asocian con la pérdida de la función de promover la reparación del daño en el DNA y la capacidad de inducir la apoptosis por este. Además las mutaciones se ven acompañadas por una inestabilidad cromosómica, que favorece la aparición de nuevas alteraciones.

Inestabilidad cromosómica

Las alteraciones cromosómicas se refieren a factores que alteran el número de cromosomas de la célula (aneuploidía o poliploidía), o factores que alteran fragmentos de cromosomas y por lo tanto alteran un número estimado de genes de forma simultánea (deleciones o adiciones). Los segmentos cromosómicos que se pierden con mayor frecuencia en el CCR son el brazo largo del cromosoma 5 (5q a nivel del gen *APC*), aunque la deleción en este cromosoma también ha sido asociada a lesiones benignas como pólipos. En las etapas posteriores, en los adenomas, se han identificado mutaciones en el cromosoma 12 (12p nivel del gen *KRAS*), las alteraciones cromosómicas responsables de la transformación maligna parecen estar ubicadas

en el brazo corto del cromosoma 17 (17p a nivel del gen *TP53*) y el brazo largo del cromosoma 18 (18q a nivel del gen *DCC*) [117].

Inestabilidad de microsatélites

La acumulación de mutaciones en una célula puede causar anomalías en el número de cromosomas y pérdida de alelos; como se ha comentado en apartados anteriores, un 15-20% de los tumores esporádicos en CCR están asociados a la MSI [117]. Los microsatélites se caracterizan por ser pequeños fragmentos de DNA (de aproximadamente 5 nt de longitud) los cuales se repiten a lo largo del genoma; las repeticiones más observadas en el genoma humano son el dinucleótido Adenina-Citosina (AC). Si una repetición muestra diferencias estables y heredables dentro de una población de individuos, se dice que las repeticiones son polimórficas, por el contrario, si las repeticiones son muy estables y no se observa variación de estas a lo largo de las generaciones se dice que el microsatélite es monomórfico [118].

Se ha encontrado que en individuos con CCR, ocurren inserciones o pérdidas de microsatélites y pueden suponer acumulación de mutaciones en diferentes genes como *Bat26*, *MSH2* y *MLH1* los cuales están asociados con cáncer a la vez que son cruciales en la iniciación y progresión del tumor.

Las mutaciones en los genes asociados a reparación de errores en la replicación del DNA están altamente relacionadas con el desarrollo de CCR esporádico y hereditario. En el CCHNP también se han descrito que sucede este mecanismo. Seis genes se han descritos como causantes de la MSI, el *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MLH3* y *MSH6* (Figura 14) [119].

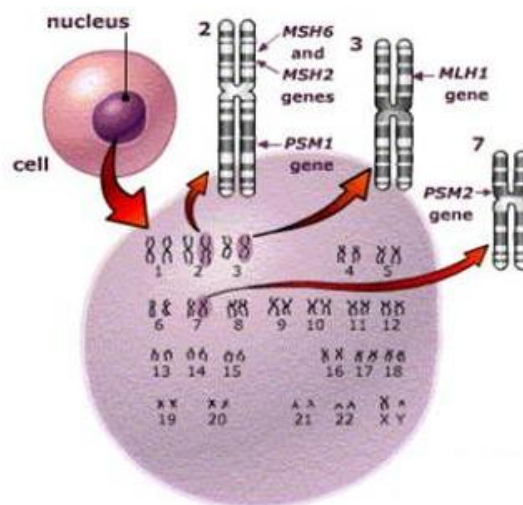


Figura 14. Localización cromosómica de los genes asociados a la MSI.

1.3.5 Diagnóstico, estadiaje, pronóstico y tratamiento

En estadios tempranos los pacientes con cáncer colorrectal no suelen presentar síntomas, por lo tanto, los cribados suelen ser necesarios para detectar este tipo de cáncer en las primeras etapas. Los síntomas de la enfermedad avanzada pueden incluir sangrado rectal, sangre en las heces, un cambio en los hábitos intestinales, dolor tipo cólico en el abdomen inferior, disminución del apetito o pérdida de peso.

Diagnóstico

Los exámenes médicos que se realizan de acuerdo a su situación personal, sexo, edad y salud son necesarios para encontrar pólipos o cáncer antes de que se tengan síntomas. A partir de los 50 años se recomienda las primeras revisiones, ya que son los individuos que presentan un mayor riesgo a desarrollar un cáncer colorrectal. Un cribado puede detectar y permitir la eliminación de los pólipos colorrectales que podrían desarrollarse a cáncer. En esta etapa es cuando el tratamiento puede ser menos extenso y más exitoso.

La primera prueba que se realiza es el análisis de sangre oculta en heces, si se detecta sangre se tiene que determinar de donde proviene, pero hemos de tener en cuenta que dolencias benignas también pueden provocar la presencia de sangre en las heces [120]. El examen rectal digital forma parte de un examen de rutina para buscar áreas anormales con el tacto. Si los resultados de los exámenes selectivos de detección sugieren que hay cáncer o síntomas lo primero que se realizará es un examen físico del paciente. Si el examen físico y los resultados de las pruebas no sugieren que haya cáncer, se puede decidir que no son necesarios otros exámenes y que no se necesita un tratamiento, pero podrá sugerir revisiones posteriores de seguimiento y control preventivo.

Si los exámenes muestran un área anormal, como un pólipo, es posible que sea necesaria una biopsia para buscar células cancerosas. Con frecuencia, el tejido anormal se puede extirpar durante la colonoscopia o sigmoidoscopia. Ambos procedimientos tienen la capacidad de extirpar los pólipos. Este tejido es estudiado y valorado por microscopia en busca de células cancerosas por un patólogo.

A nivel de diagnóstico de imagen se pueden realizar procedimientos como el uso del enema de bario con doble contraste, donde el paciente se bebe una solución de bario y se le bombea aire dentro del recto. El bario y el aire ayudan a que el colon y el recto se destaquen en las imágenes cuando se le somete a rayos X y también será posible visualizar los pólipos. La RM

del abdomen y pelvis permitirá determina la profundidad de la invasión tumoral y también permitirá identificar metástasis linfáticas locorreionales. La ecografía endorrectal también permitirá obtener imágenes donde se mostrará la profundidad con la que ha crecido el tumor en el recto o si el cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos o a otros tejidos cercanos. Lamentablemente estos métodos identifican lesiones grandes y no tienen la posibilidad de tomar biopsias para el diagnóstico histológico.

Estadaje

Si los resultados de la biopsia muestran que el paciente presenta CCR, será necesario conocer el estadio del paciente para determinar el mejor tratamiento. El CCR se clasifica de acorde con el grado de infiltración tumoral en la pared del intestino grueso, indicado por el parámetro “T”, el compromiso de los ganglios linfáticos por el parámetro “N” y la presencia de metástasis a distancia por el parámetro “M” (Tabla 6 y Figura 15) [121].

Categoría T (Tumor primario)
T0: No hay evidencia de tumor primario.
TX: No se puede valorar la infiltración del tumor.
TIS: Carcinoma in situ: intrepitelial o invasión de la lamina.
T1: Tumor invade la capa submucosa.
T2: Tumor invade la capa muscular propia.
T3: Tumor invade la subserosa.
T4a: Infiltración de la serosa T4b: El tumor invade otros órganos o estructuras.
Categoría N (Ganglios linfáticos regionales)
N0: No hay ganglios linfáticos regionales afectados
NX: No se puede valorar el nº de ganglios afectados.
N1a: Metástasis en 1 ganglio linfáticos regionales N1b: Metástasis en 2-3 ganglios linfáticos regionales N1c: Tumores satélites en la subserosa, No hay ganglios linfáticos regionales afectados
N2a: Metástasis en 4-6 ganglios linfáticos regionales N2b: Metástasis en más de 7 ganglios linfáticos regionales.
Categoría M (Metástasis a distancia)
M0: No metástasis a distancia.
MX: No se puede valorar la existencia de metástasis en órganos.
M1a: Metástasis a distancia de 1 órgano o nódulos linfáticos M1b: Metástasis a distancia de más de 1 órgano o nódulos linfáticos

Tabla 6. Sistema de clasificación TNM en el CCR.

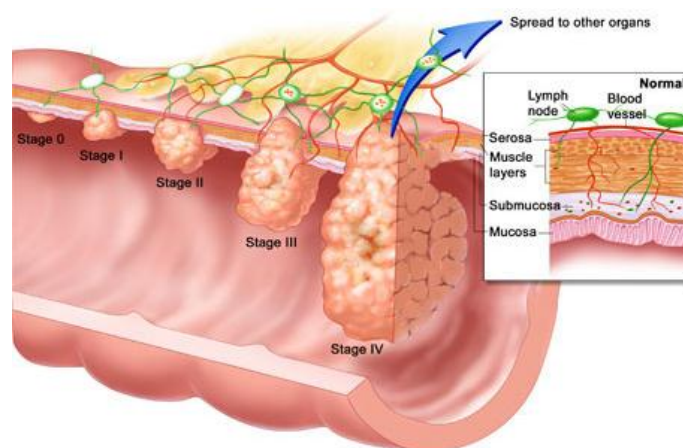


Figura 15. Progresión del CCR en los diferentes estadios [120]. (National Cancer Institute[®] 2005 Terese Winslow, U.S. Govt)

En la actualidad, el sistema de clasificación TNM es uno de los sistemas más usados para la estadificación del CCR. Este sistema es aceptado y mantenido por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) y la *International Union Against Cancer* (UICC). La combinación de estos tres parámetros del sistema TNM proporciona la base para tomar decisiones terapéuticas (Tabla 7) [121].

Estadio	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1/T2	N0	M0
II A	T3	N0	M0
II B	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0
III A	T1–T2	N1	M0
	T1	N2a	M0
III B	T3–T4a	N1	M0
	T2–T3	N2a	M0
	T1–T2	N2b	M0
III C	T4a	N2a	M0
	T3–T4a	N2b	M0
	T4b	N1–N2	M0
IV A	Cualquier T	Cualquier N	M1a
IV B	Cualquier T	Cualquier N	M1b

Tabla 7. Estadiaje del cáncer colorrectal según la AJCC y UICC.

Pronóstico

El pronóstico de los pacientes con CCR se correlaciona con el estadio evolutivo del tumor en el momento del diagnóstico. Las tasas de supervivencia se basan con frecuencia en los resultados previos de un gran número de personas que tuvieron la enfermedad; sin embargo, no pueden predecir lo que sucederá en el caso particular de una persona. Resulta importante conocer el tipo y la etapa del cáncer de una persona para estimar su pronóstico (Figura 16).

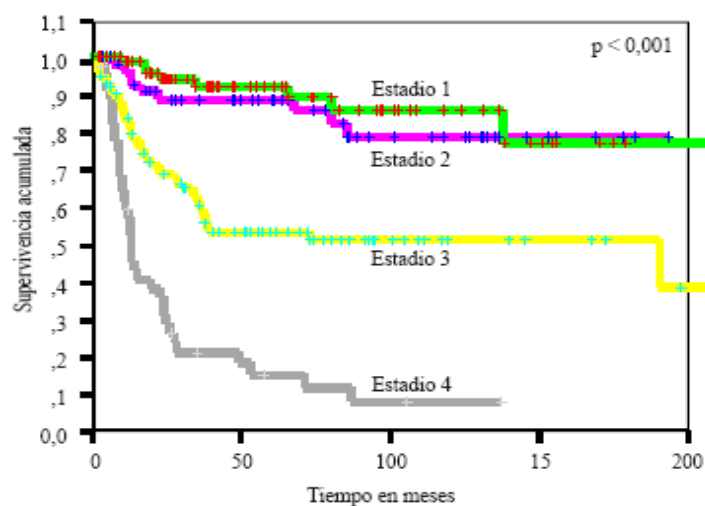


Figura 16. Comparación de la supervivencia actual en función del estadio tumoral [122].

Muchos otros factores también pueden afectar el pronóstico de una persona, tal como el grado del cáncer, los cambios genéticos en las células cancerosas, el tratamiento recibido y la respuesta al tratamiento.

Los porcentajes presentados provienen de la séptima edición del manual de estadificación de la *AJCC* publicado en 2010 (Tabla 8). Estas cifras se basan en un estudio del centro de datos del *National Cancer Institute's SEER*, que incluyó a más de 28.000 personas diagnosticadas con cáncer de colon y 10.000 pacientes con cáncer de recto entre 1998 y 2000 [123].

Estadio	T	N	M	Supervivencia a 5 años
0	Tis	N0	M0	95-100%
I	T1/T2	N0	M0	80-90%
II	T3/T4	N0	M0	50-75%
III	T1-4	N1-2	M0	25-45%
IV	T1-4	N0-2	M1	< 5%

Tabla 8. Supervivencia a 5 años en CCR dependiendo del estadio del cáncer [123].

Cuando el tratamiento se hace a una edad temprana, muchos pacientes sobreviven al menos 5 años después del diagnóstico (esto se denomina supervivencia a 5 años). En muchos casos, el cáncer de colon es una enfermedad curable cuando se detecta a tiempo. Si el cáncer de colon no reaparece al cabo de 5 años, se considera curado. Los cánceres en estadios I, II y III son considerados potencialmente curables. En cambio, el cáncer en estadio IV en la mayoría de los casos no se considera curable, aunque hay excepciones.

Tratamiento en cáncer colorrectal

La cirugía es el tratamiento más común contra el CCR. La extirpación quirúrgica puede ser curativa. La cirugía debe extirpar el tumor con amplios márgenes y al menos doce ganglios linfáticos deben quedar disponibles para la evaluación patológica. En los estadios iniciales se realizan principalmente una polipectomía, extirpación del pólipo localizado o escisión local a través de un colonoscopio. Si el tumor es demasiado grande para poder extirparlo mediante escisión local, es posible que ocasionalmente sea necesario realizar una resección del colon, que se conoce como colectomía.

Pacientes con estadio I no reciben ningún tratamiento adicional a la cirugía, debido al bajo porcentaje que presentan a la recaída y el beneficio de la neoadyuvancia es muy reducido. Pacientes con estadio III si que se benefician de este tipo de tratamiento neoadyuvante, mientras que en los pacientes con estadio II su beneficio no es del todo claro [124].

A partir del estadio II el cáncer ha crecido a través de la pared del colon (Figura 15). En este estadio aun no ha comprometido a los ganglios linfáticos, pero se puede recomendar un tratamiento adyuvante. Este tratamiento se administra después de la extirpación del tumor primario, para así conseguir reducir al máximo la posibilidad de recaída. El tratamiento adyuvante se recomienda sobretodo en pacientes con estadio II y III que presentan alto riesgo a la recaída y no presentan contraindicaciones post cirugía. Las principales opciones de quimioterapia incluyen 5-Fluorouracilo (5-FU) o capecitabina que pueden ser usados con comparable eficacia [125] aunque también se pueden usar otras combinaciones existentes.

El 5-FU ha sido el primer fármaco que ha presentado un beneficio en la supervivencia versus a la cirugía sola en el tratamiento del CCR. Diversos ensayos demostraron que 5-FU asociado a los inmunomoduladores leucovorin (LV) o levamisol conseguía un aumento en la supervivencia libre de enfermedad (SLE) y en la supervivencia global, de esta forma se consolidó este tratamiento como estándar para la realización de ensayos clínicos posteriores en el marco de la adyuvancia del CCR. Regímenes que contienen 5-FU reducen la recaída un 17% e incrementa

la SG en un 13-15% [126]. Para mejorar el tratamiento se han realizado diferentes ensayos donde al añadir el oxaliplatino al 5-FU y la capecitabina, donde se ha observado un aumento de la SLE en pacientes con estadio III (Tabla 9) [127-129].

	Régimen		Estadio	SLE (ratio)	SG (ratio)
MOSAIC	FU/LV FOLFOX4	vs	II, III	Después de 5 años: Global: 67.4% vs 73.3% Estadio II: 79.9% vs 83.7% Estadio III: 58.9 & vs 66.4%	Después de 5 años: Global: 76.0% vs 78.5% Estadio II: 86.8% vs 86.9% Estadio III: 68.7% vs 72.9%
Pacientes (N)	2246				
XELOXA	FU/LV XELOX	vs	III	Después de 55 meses: 62.5% vs 68.7%	Después de 57 meses: 74.2% vs 77.6%
Pacientes (N)	1886				
NSABP C-07	FU/LV vs FLOX		II, III	Después de 5 años: Global: 64.2% vs 69.4% Estadio II: 80.1% vs 82.1% Estadio III: 57.8% vs 64.4%	Después de 5 años: Global: 78.4% vs 80.2% Estadio II: 89.6% vs 89.7% Estadio III: 73.8% vs 76.5%
Pacientes (N)	2409				

Tabla 9. Ensayos donde se evalúa el efecto de oxaliplatino en terapias adyuvantes en CCR.

La quimioterapia sola, o en combinación con la radiación, se administra antes o después de la cirugía en aquellos pacientes que se encuentren en estadios III o IV. El tratamiento del CCR con diseminación metastásica se basa en la quimioterapia. Diversos estudios demuestran que la administración intravenosa de 5-FU aumenta significativamente la supervivencia de los pacientes con enfermedad diseminada. Además, su administración precoz enlentece la

progresión de la enfermedad, prolonga la duración del período asintomático y en consecuencia mejora la calidad de vida.

El descubrimiento de nuevos fármacos citotóxicos y de anticuerpos monoclonales dirigidos contra dianas moleculares específicas, junto con la posibilidad de realizar tratamientos multidiana en los que se combinan varios fármacos a la vez ha conducido a una mejora en la supervivencia y en la calidad de vida de los pacientes. Son conocidos el Bevacizumab, un anticuerpo monoclonal que bloquea el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Ensayos clínicos han demostrado que la adición de este agente antiangiogénico a los regímenes estándares de quimioterapia basada en 5-FU mejora la SG, la SLE y la tasa de respuestas en comparación con la quimioterapia sola aunque presente alguna toxicidad controlable para el paciente [130]. El cetuximab es un anticuerpo monoclonal IgG1 que tiene su diana en el dominio extracelular del receptor de crecimiento epidérmico (EGFR), se ha visto que presenta beneficio en aquellos pacientes con tumores con el oncogén *KRAS* no mutado [131]. Panitumumab es un anticuerpo monoclonal IgG2 totalmente humano y también tiene como diana el EGFR. Se ha utilizado y aporta beneficio en pacientes con el gen *KRAS* mutado y no mutado. Se combina con otros tratamientos y se ha demostrado beneficios en la SLE [132].

1.4 Generalidades de los microRNAs

1.4.1 Historia y características

Los microRNAs (miRNAs) son una familia de RNAs pequeños no codificantes, con una longitud entre 19 y 25 nucleótidos (nt), que inicialmente se describieron como moléculas que inhiben la traducción por la unión a la región UTR3' (región no traducible) de su gen diana y de este modo bloquea su traducción a proteína. Se estima que los miRNAs regulan aproximadamente el 30% de las proteínas codificantes del genoma humano [133]. En la mayoría de organismos hay un número limitado de miRNAs si lo comparas con el número de RNA mensajero (mRNA) y proteínas. El genoma humano codifica para 2578 miRNAs maduros (miRBase versión 20), mientras que el número estimado de mRNAs es de unos 30.000. A pesar de esto, un miRNA puede regular cientos de mRNAs y como resultado puede tener diferentes efectos en la expresión génica [134]. Los miRNAs regulan diferentes procesos biológicos [133, 135, 136].

Ambros y Ruvkun, en 1993, observaron que en el nematodo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) determinados genes controlaban el patrón de desarrollo temporal en todos los estadios larvarios [137, 138]. Uno de estos genes descritos fue *lin-4*, descubierto por el aislamiento de una mutación nula que causaba fallo en el desarrollo temporal [139]. Este gen participa en el control del desarrollo post-embriionario de *C. elegans* y es el responsable de la transición del estadio larvario L1 a L2 durante el desarrollo. Ambros y colaboradores concluyeron que *lin-4* no codificaba para proteína, pero encontraron como producto dos pequeños RNAs de 22 y 61 nt de longitud [137], este último con estructura en forma de *stem-loop* y vieron que estos transcritos presentaban secuencias complementarias a la región UTR3' del mRNA de *lin-14*. Ruvkun y colaboradores indicaron que *lin-4* podría regular de manera negativa a *lin-14* [140]. Ambos grupos definieron que los dos transcritos que hallaron se correspondían al precursor de miRNA (pre-miRNA) y al miRNA maduro [137]. En ese momento no se hallaron homólogos de *lin-4* en otras especies y se creyó que se trataba de un mecanismo de regulación exclusivo de los nemátodos.

En el 2000 se descubrió el segundo miRNA, *let-7*, también descubierto en *C. elegans*. *Let-7* controla el desarrollo del paso de larva a forma adulta, por la represión de *HBL-1*. La secuencia de *let-7* se conserva en diferentes especies, desde moscas a humanos [141]. Esto facilitó el estudio de los miRNAs en otros organismos. *Let-7* fue detectado en vertebrados, hemicordados, moluscos, anélidos y artrópodos pero no en plantas e organismos unicelulares

[142]. En humanos, fue detectado en la mayoría de tejidos, tales como en el cerebro, corazón, riñón, hígado, pulmón, tráquea, colon, intestino delgado, bazo, estómago y timo [141].

El primer trabajo que sugirió el papel de los miRNAs en cáncer fue publicado en 2002 [143]. mir-15 y miR-16 fueron localizados en el cromosoma 13q14, una región frecuentemente delecionada en la leucemia linfática crónica (LLC). Calin y colaboradores descubrieron que ambos genes estaban delecionados o infra regulados en más del 60% de las LLC, indicando que estos genes se comportaban como tumores supresores en esta enfermedad. El mismo grupo posteriormente identificó un porcentaje significativo de miRNAs localizados en regiones frágiles y en regiones alteradas en cáncer, incluyendo regiones de amplificación o pérdida de heterocigosidad o puntos de rotura. Esto sugería, que los miRNAs eran una nueva clase de genes con una función relevante en el proceso de tumorigénesis [144]. Microarrays de miRNAs y más recientemente el uso de la secuenciación de última generación ha permitido el conocimiento entero del miRNAome (el conjunto completo de los microRNAs en un organismo). Además, otros métodos como la citometría mediante bolas magnéticas, la PCR a tiempo real y los arrays basados en enzimas *kleow* han sido usados para analizar la expresión de los miRNAs en tumores y otras enfermedades. Hasta el día de hoy, la expresión de miRNAs se ha descrito en casi todos los tipos de cáncer [145].

Sus secuencias se pueden encontrar en diferentes bases de datos (Tabla 10).

Nombre	Dirección electrónica	Referencia
miRNA map	http://mirnamap.mbc.nctu.edu.tw/	[146]
miRBase	http://mirbase.org/	[147]
microRNA	http://www.microrna.org/microrna/home.do	[148]
coGemiR	http://www.cogemir.tigem.it/	[149]
miRGEN	http://www.diana.pcbi.upenn.edu/miRGen.html	[150]
deepBase	http://www.deepbase.sysu.edu.cn	[151]

Tabla 10. Fuentes para la búsqueda de miRNAs [152].

La base más conocida y usada actualmente es miRBase database. MiRBase es una base que reúne información de distinta naturaleza acerca de los miRNAs de distintas especies. Además actúa como registro oficial, disponible online para todo el mundo. Actualmente, miRBase database recoge 1872 precursores de miRNAs dentro de la nomenclatura “*hsa*” que engloba a la especie *Homo sapiens*. El último registro de miRBase publicado (versión 20) contiene 24.521 entradas correspondientes a precursores de miRNAs, que dan lugar a 30.424 miRNA maduros

en 206 especies [153]. El número de secuencias registradas en miRBase ha ido aumentando con los años en paralelo a las publicaciones sobre miRNAs registradas en el PubMed (Figura 17).

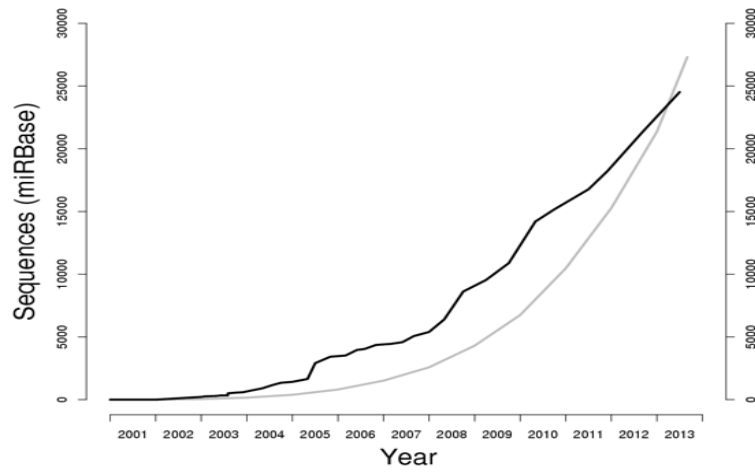


Figura 17. Crecimiento de las secuencias de miRBase database (en negro) y las publicaciones de miRNAs en el PubMed (en gris), (<http://www.mirbase.org/blog/>).

F-G. Sitios con producción de apareamiento en 3'. Para *3'-supplementary sites* (**F**), el apareamiento Watson-Crick se centra en la posición 13-16 (6-8 nt), creando en este lugar un sitio de apareamiento suplementario, pero estos sitios son muy atípicos. Para *3'-compensatory sites* (**G**), el apareamiento de Watson-Crick se encuentra en la posición 13-16 que puede compensar con una *seed* y de ese modo crear un sitio funcional, pero su porcentaje es muy bajo [155].

Existen diferentes herramientas y software bioinformáticos que sirven para la predicción de dianas de miRNAs (Tabla 11) [152]. Estos programas de predicción evalúan el grado de complementariedad con el mRNA diana y la energía libre predicha del complejo mRNA-miRNA, otros programas toman en cuenta la estructura secundaria del mRNA y los cambios que se producen después de la formación del complejo mRNA-miRNA. Esto será útil para estudios funcionales de miRNAs [156, 157].

Nombre	Dirección electrónica	Referencia
Targetscan	http://targetscan.org	[158]
Pictar	http://pictar.org	[159]
RNA22	http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html	[160]
Tarbase	http://diaa.cslab.ece.ntua.gr/tarbase	[161]
PITA	http://www.weizmann.ac.il/pubs/mir07_data.html	[162]
microRNA	http://www.microrna-org/microrna/home.do	[148]
Diana-microT	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT/	[163]
miRecords	http://mirecords.biolead.org/	[164]
Starbase	http://starbase.sysu.edu.cn/	[165]

Tabla 11. Herramientas computacionales para la predicción de dianas de miRNAs [152].

1.4.3 Biogénesis

Los miRNAs se transcriben por la RNA polimerasa II dando lugar a una molécula conocida como miRNA primario (pri-miRNA), que contienen una estructura de caperuza en el extremo 5' y una cola de poli-adeninas (poly-A) en el extremo 3', que forma una estructura que recibe el nombre de "hairpin stem-loop". Los genes que codifican para los miRNA están localizados principalmente en regiones exónicas e intrónicas [166, 167].

Los pri-miRNAs que se encuentran en el núcleo serán reconocidos y procesados por la endonucleasa RNAsaIII denominada *Drosha*, junto con la proteína *DGCR8*. *Drosha* corta las cadenas obteniendo una molécula de unos 60-110 nt [166, 168], llamada miRNA precursor (pre-miRNA). El pre-miRNA será exportado del núcleo al citoplasma para finalizar su proceso de maduración mediante la Exportina-5 (*XPO5*), dependiente de RAN-GTP [169]. Algunos estudios han demostrado que cuando se inhibe la *XPO5* mediante los RNA de interferencia (RNAi) se disminuye la presencia de miRNAs maduros; sin embargo, no vemos acumulación de pre-miRNA en el núcleo. Esto sugiere que los pre-miRNAs podrían ser moléculas inestables y su interacción con *XPO5* podría estabilizarlos [169].

En el citoplasma el pre-miRNA es cortado por la enzima RNAsaIII conocida como Dicer-1, juntamente con la proteína *TRBP* y *PACT*, produciendo un dúplex imperfecto de doble cadena [169, 170]. Mediante la RNA helicasa A, este dúplex es desenrollado y se separan en dos cadenas. Una de las cadenas será incorporada a un complejo constituido por una familia de proteínas conocido como *RNA-induced silencing complex* (RISC) mientras que la otra cadena puede ser degradada [171]. El complejo RISC cuando actúa sobre los miRNAs se conoce como miRISC y en humanos, está formado por diferentes proteínas *Dicer*, *TRBP*, *AGO2* y *PACT* (Figura 18). El miRNA maduro guía al complejo catalítico miRISC hacia su mRNA diana para unirse a la región UTR3' del mensajero y en la mayoría de los casos bloquear su traducción. También se ha descrito que pueden unirse a las secuencias *Open Reading Frame* (ORF) y a la región UTR5' [172, 173], entre otras funciones.

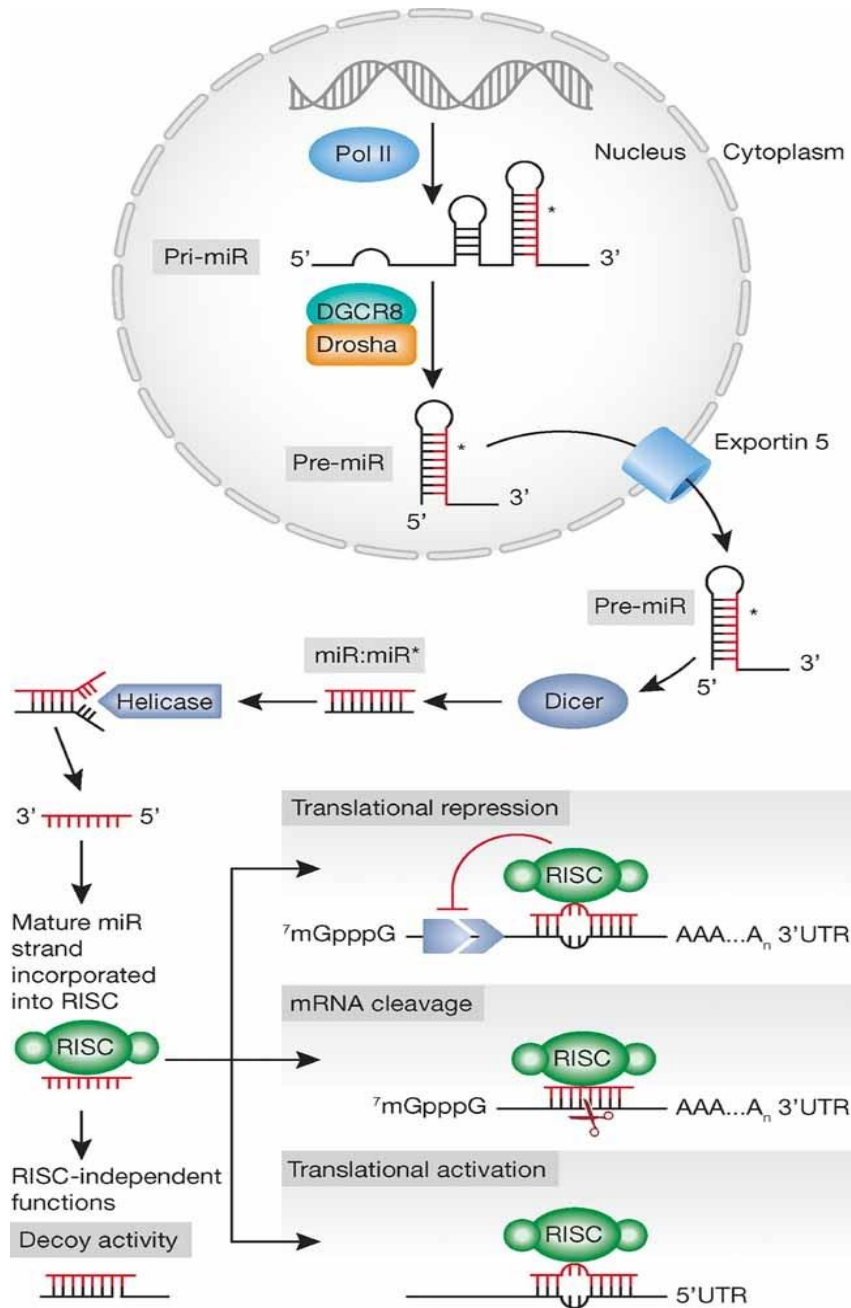


Figura 18. Biogénesis y mecanismo de acción de los miRNAs [152].

1.4.4 Mecanismos de acción

El mecanismo de acción de los miRNAs principalmente se relaciona con su efecto en la regulación negativa de la expresión proteica, ya sea por la degradación del mRNA diana o mediante la inhibición de su traducción de forma temporal. El uso de un mecanismo u otro depende del grado de complementariedad del miRNA con su mRNA diana. Si la complementariedad es total el miRNA llevará a cabo la degradación del mRNA. Mientras que una complementariedad parcial o reducida, inhibirá la traducción [135]. El resultado final de estos dos mecanismos será una reducción de los niveles totales de proteína [155].

Una de las cuestiones existentes es el grado de complementariedad necesario para el silenciamiento génico y cuantos complejos miRISC son necesarios para inhibir la traducción. Por los trabajos existentes sobre los siRNAs, se creía que serian necesarios unos 11pb para un elevado reconocimiento del mRNA diana y la unión al miRISC. Sin embargo, Doench y Sharp en su trabajo presentaron que la habilidad de los miRNAs para suprimir la traducción dependía de la unión entre los primeros 8 nt del extremo 5' del miRNA y del mRNA diana [174]. Observaron que los miRNAs podían inhibir muchos mRNAs dianas que tenían secuencias complementarias entre las posiciones 2 y 7 del extremo UTR5' del miRNA, región que se conoce como “*seed-sequence*” (secuencia semilla) y la región UTR3' del mRNA diana [155].

Debido a que la complementariedad de un gen diana con su miRNA es de unos pocos nucleótidos, podemos encontrar diferentes tipos de secuencias diana según las estructuras secundarias que se formen como resultado de esta complementariedad parcial. Existen tres tipos de región diana, los *5' canonical sites*, *5' dominant seed sites* y *3' compensatory sites* (Figura 19). Los *5' canonical sites* tienen una complementariedad casi del 100% tanto con el extremo 5' como con el 3' del miRNA y se caracterizan por la aparición de un bulto en el centro, denominado *bulge*, donde se produce la pérdida de la complementariedad. Los *5' dominant seed sites* presentan una complementariedad perfecta con el extremo 5' del miRNA, que corresponde con la región donde se encuentra la *seed-sequence*, pero presentan muy poca complementariedad con la región 3'. Los *3' compensatory sites* presentan una complementariedad muy baja en la región 5', donde se encuentra la “*seed-sequence*”, pero esto se ve compensado por una complementariedad casi perfecta en la región 3'.

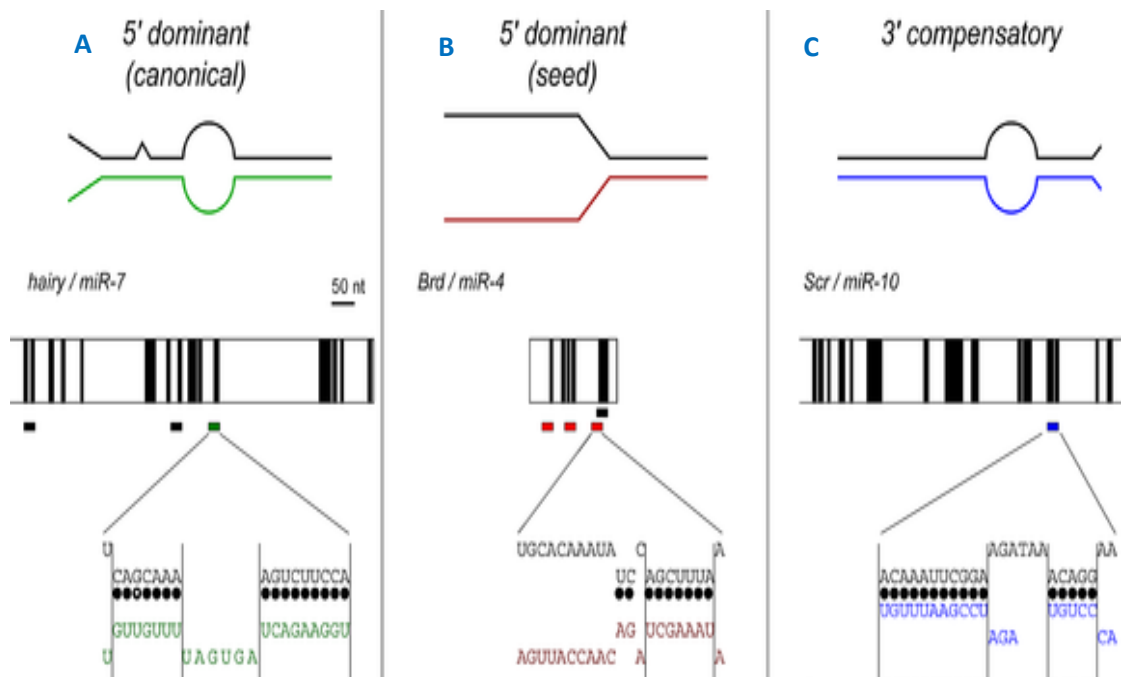


Figura 19. Ejemplos de posibles estructuras secundarias que se forman según las diferentes regiones diana que podemos encontrar: **A.** 5' canonical sites **B.** 5' dominant seed sites **C.** 3' compensatory sites [175].

Se ha observado que la acción de más de un complejo RISC dirigido por la unión al miRNA maduro con la secuencia del mRNA hace que la inhibición sea más eficiente [174]. Este hecho explica la presencia en el gen diana de múltiples zonas complementarias a un mismo miRNA o a distintos. En el caso de que la unión miRNA-mRNA produzca la degradación del mRNA, el corte se produce precisamente entre los nucleótidos que rodean al residuo 10-11 del miRNA [176]. Después de la degradación del mRNA, el miRNA permanece intacto y puede guiar al complejo RISC hacia la degradación de otros mRNAs. En general en este mecanismo de acción, la complementariedad se puede dar tanto en regiones codificantes como en regiones UTR3'. Sin embargo, cuando el miRNA actúa inhibiendo la traducción, la complementariedad en la mayoría de los casos se da con la región UTR3' del mRNA.

Además de la represión de la traducción de mRNAs por parte de los miRNAs, también se han descrito otras funciones como la de activar la traducción de miRNAs específicos [177, 178]. Vasudevan y colaboradores fueron los primeros en demostrar claramente que, en algunos casos, los miRNAs pueden funcionar como activadores de la traducción, indicando que durante las fases G1/G0 del ciclo celular los miRNAs pueden mediar la activación [178].

Existen excepciones en las que el miRNA se une a la región UTR5' del mensajero; en estos casos el miRNA tiene función activadora [179, 180].

En 2008, Place y colaboradores proporcionaron nuevas pruebas de que los miRNAs pueden inducir la expresión de genes y fueron los primeros en mostrar que los miRNAs pueden dirigirse a los promotores de genes mediante la unión al DNA [181]. Esto se efectuará mediante la formación de la heterocromatina en la región promotora o regulando mecanismos epigenéticos de silenciamiento del DNA [182, 183].

Estudios recientes muestran que además de ser reguladores, tanto positivos como negativos, de la traducción y de la expresión, los miRNAs pueden unirse a proteínas, concretamente a proteínas de unión a RNA y evitar que estas se unan a sus RNA diana. Esta función de los miRNAs se conoce con el nombre de "*Decoy activity*" y es independiente de RISC [173]. Un ejemplo de este mecanismo fue descrito en el 2010 por Perrotti y colaboradores, donde la proteína hnRNP E2 interactúa con el mRNA del factor de transcripción CEBPA lo que promueve que este mRNA no se traduzca. Demostraron que miR-328 interfería en la unión del mRNA con la proteína y por consiguiente se traducía el mRNA de CEBPA [184].

1.4.5 MicroRNAs en cáncer

Como se ha descrito en la introducción de este capítulo, la primera evidencia de la participación de los miRNAs en cáncer fue publicado en el 2002 por Calin y colaboradores [144]. En 2005 fue publicado el primer artículo referente a la función biológica de los miRNAs donde se observó que los miRNAs pueden actuar como oncogenes o genes supresores de tumor y está involucrados en diferentes vías desreguladas en cáncer (Figura 20) [185].

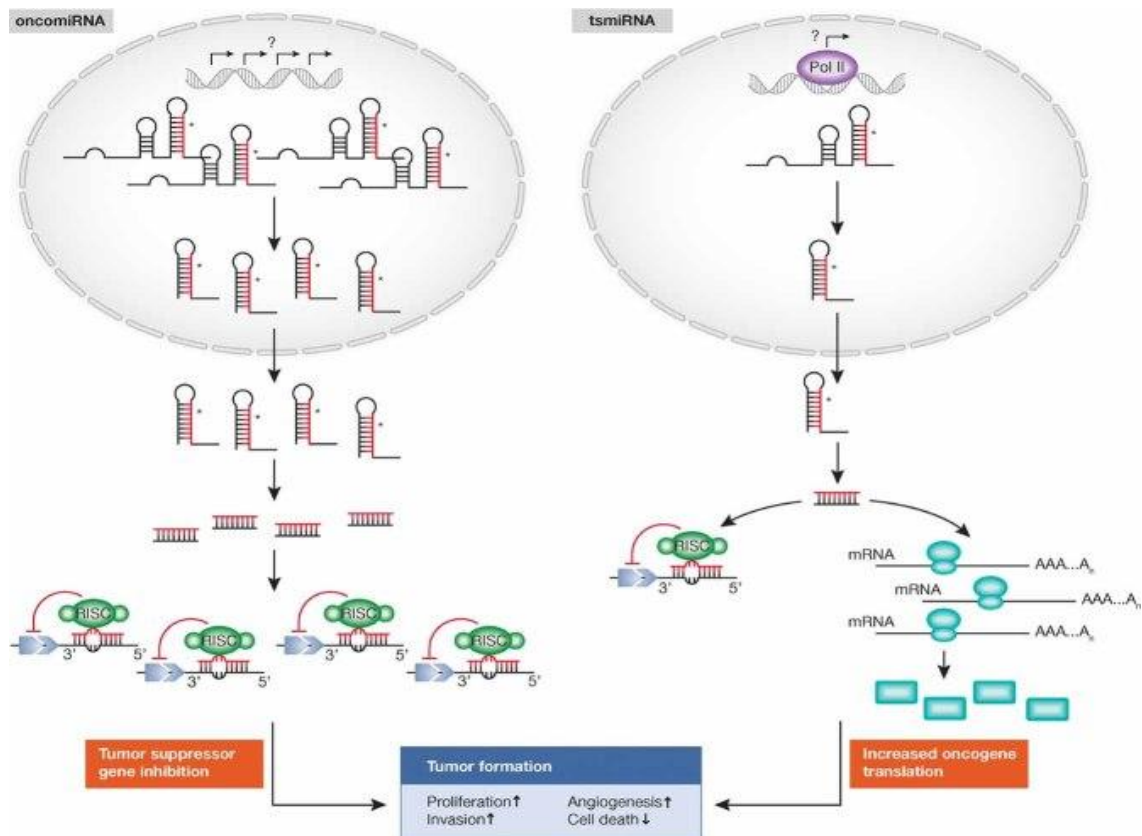


Figura 20. Los miRNAs pueden actuar como oncogenes (oncomirs) o genes supresores de tumores [152].

Los miRNAs, que su expresión está incrementada en tumores se les consideran oncogenes, también denominados oncomirs, que promueven el desarrollo del tumor por la inhibición negativa de genes supresores tumorales y genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis. En la oncogénesis, la expresión de algunos miRNAs se ha disminuido en algunas células cancerosas. Este tipo de miRNAs son los considerados genes supresores de tumores y son responsables de prever el desarrollo del tumor de manera negativa inhibiendo oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación celular o apoptosis.

En los genes que codifican para miRNAs podemos destacar alteraciones genómicas que pueden provocar la pérdida de la función del miRNA o la sobreexpresión de este. Alteraciones que pueden provocar la pérdida de la función son las mutaciones, deleciones, metilación en la zona promotora del gen o alteraciones en la biogénesis del miRNA. El aumento de los niveles de miRNA puede ser debido a amplificaciones, translocaciones, mutaciones, polimorfismos y cambios epigenéticos (Figura 21) [173]. En 2006, Saito y colaboradores fueron los primeros en demostrar que la expresión de los miRNAs podría ser controlada por mecanismos epigenéticos, la metilación del DNA y la modificación de histonas [186].

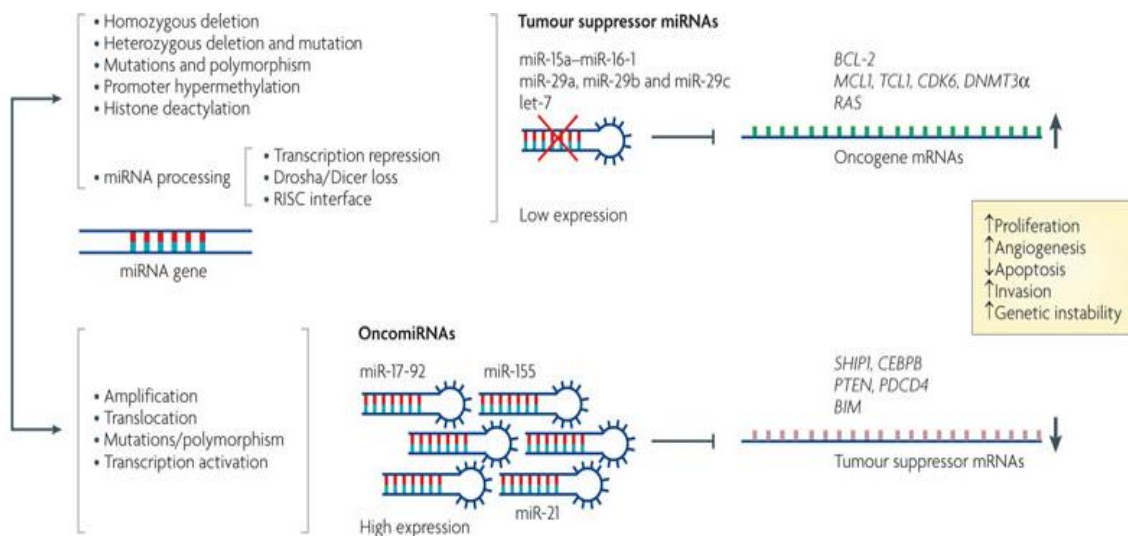


Figura 21. Regulación de los miRNAs como oncogenes o genes supresores de tumores [173].

Diferentes estudios muestran que los perfiles de expresión de los miRNAs proporcionan información importante acerca del estado de diferenciación y el linaje celular en diferentes tipos de tumores. Estos perfiles de expresión de miRNAs permiten la clasificación del tejido de origen de tumores pobremente diferenciados con mayor exactitud de la que permite el análisis de expresión de mRNAs de las mismas muestras. Lu y colaboradores demostraron que la expresión global de miRNAs permitía distinguir el origen del desarrollo del tumor, agrupando en clúster aquellas neoplasias que derivaban del tejido endodermo embrionario, también determinaron el estado diferencial de la célula, independientemente que la muestra de estudio fuese tumoral o normal [187]. Con base a esta información, podría decirse que la historia del desarrollo de un tumor está reflejada en su patrón de expresión de miRNAs particular.

En pacientes con cáncer, la metástasis a distancia es una de las primeras causas de muerte. El proceso metastásico envuelve diferentes pasos, en primer lugar la motilidad celular, invasión

del estroma adyacente, intravasación, diseminación sistemática, extravasación dentro del parénquima de tejidos distantes y finalmente la proliferación y generación de un segundo tumor. En este proceso los miRNAs tienen un doble rol ya que pueden promover o inhibir la metástasis [188]. Uno de los primeros trabajos que hablan sobre la función de los miRNAs como activador de las metástasis fue publicado por Ma y colaboradores, donde determinaron que la sobreexpresión del miR-10b en cáncer de mama no metastásico, provocaba el inicio de la invasión y metástasis [189]. Por lo contrario, también se ha visto que los miRNAs pueden prevenir metástasis. Tavazoie y colaboradores publicaron un estudio de miRNAs que actuaban como supresores metastásicos. Determinó que el miR-126 y miR-335 se perdían en la mayoría de los tumores iniciales de mama de pacientes recaídos y la pérdida de la expresión de estos miRNAs se asociaba con una baja supervivencia libre de metástasis [190].

microRNAs supresores de tumor

Las primeras evidencia que muestran que los miRNAs pueden actuar como supresores de tumores vino de los artículos publicados por Calin y colaboradores, donde observaron que pacientes con LLC en más de un 60% presentan deleciones o desregulaciones en dos clúster de genes de miRNA: miR-15a y miR-16-1 [143]. Su papel como supresores de tumor quedó evidenciado por Cimmino y colaboradores al ver que niveles bajos o inexistentes de miR-15a y miR-16-1 se asociaban a la sobreexpresión del gen *BCL-2* [191], ya que esta se unen a su región UTR3'.

Otro ejemplo es la familia de let-7 (let-7a-1, a-2, a-3, b, c, d, e, f-1, f-2, g y miR-98) que se encuentra infraexpresada en muchos tumores debido a que el gen que codifica para esta familia esta localizado en regiones frágiles del genoma asociadas a diferentes tumores [144]. Algunos de estos miRNAs se encuentran infraexpresados en patologías humanas y pueden tener función como genes supresores tumorales. Se ha observado que uno de sus dianas son los genes de *RAS* y *C-MYC* [192, 193]. Let-7 también se ha visto que induce apoptosis y bloqueo del ciclo celular cuando se sobreexpresa en líneas celulares de cáncer de pulmón, colon y de linfoma de Burkitt, entre otros [194].

La familia miR-29 (miR-29a, miR-29b-1, b-2 y miR-29c) también presentan función como genes supresores de tumores. Estos miRNAs se encuentran infraexpresados en cáncer de pulmón, LLC, cáncer de mama, hepatocarcinoma, entre otros [195-197].

La familia miR-34 (miR-34a, miR-34b y miR-34c) se puede encontrar infraexpresada, debido a que su transcripción está directamente inducida por el supresor tumoral *TP53* [198]. El gen *TP53* se encuentra infraexpresado o mutado en muchos tumores. En un trabajo realizado por nuestro grupo se identificó miR-34a como marcador pronóstico de recaída en cáncer de pulmón de célula no pequeña [64].

Oncomirs

El miR-155 fue el primer miRNA propuesto como oncogén. miR-155 está codificado por el gen *BIC* y se encuentra de 10 a 60 veces más expresado en linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, LLC, leucemia mieloide aguda, tumores pancreáticos, cáncer de pulmón y mama [195, 199]. Este miRNA tiene una función esencial en la diferenciación de las células T helper, células reguladoras del sistema inmunitario. También participa en otros procesos celulares como la producción de interferón en las células natural killers, movilidad en las células de linfoma, diferenciación y función de las células dendríticas, diferenciación del músculo esquelético, o en el control del TGF- β , vías de señalización Jak-Stat y FoxO3a que modulan la migración e invasión de las células en cáncer de mama [200-202].

Otro de los primeros miRNAs identificados como oncomirs fue el clúster miR-17-92 que contiene seis miRNAs: miR-17-3p, 5p, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92-a1. Estos se localizan en la región 13q31.3, y se encuentran frecuentemente amplificados y sobreexpresados en diferentes neoplasias [203] y se ha descrito que pueden modular la formación de tumores [204]. Estos miRNAs activan la proliferación, inhiben la apoptosis e inducen la angiogénesis en el tumor.

El miR-21 se encuentra sobreexpresado en diferentes tipos de cáncer, pulmón, mama, páncreas, esófago, cérvix, cerebro y colon. Modula la tumorigénesis, regulando genes como *BCL2*, bloqueando la apoptosis y se especula su validez como diana terapéutica [205, 206]. Otros genes supresores de tumor tales como *PTEN* o *PDCD4* son también regulados por miR-21 en diferentes tipos de cáncer. Meng y colaboradores, mostraron que la inhibición de miR-21 en células de cáncer de hígado disminuyen la proliferación celular, migración e invasión [207]. Los efectos de miR-21 en migración e invasión han sido validado en múltiples sistemas y se ha visto que tiene un papel importante en la metástasis [208]. miR-21 puede ser diana inhibidora de metaloproteasas como Reck y Timp3, resultando en el incremento de la actividad de estas enzimas proteolíticas que participan en el proceso de metástasis.

miRNA	Expresión en pacientes	Función	Targets
miR-15 miR-16	Baja en LLC y otras neoplasias hematopoyéticas, cáncer de pulmón, próstata, páncreas y adenomas de pituitaria	ST	BCL-2, MCL1, WNT3A
Let-7	Baja en cáncer de pulmón, colon, mama, ovario, estómago y neoplasias hematopoyéticas.	ST	KRAS, NRAS, CDK6, CDC25A, HMGA2, MYC
miR-29	Baja en LMA, LLC, linfoma, cáncer de pulmón, mama, hígado, entre otros.	ST	MCL1, CDK6, TCL1, DNMT1, DNMT3 α , DNMT3 β
miR-34	Baja en cáncer de colon, pulmón, mama, riñón, páncreas, vejiga, neuroblastoma y linfoma de Burkitt.	ST	CDK4, CDK6, CCNE2, CCND1, MET, MYC, CREB, E2F3, BCL-2
miR-155	Elevada en LLC de riesgo elevado, LMA, cáncer de colon, pulmón, mama y linfomas.	OG	SHIP1, CEBPB, CUTL1, PCALM
miR-17-92	Elevada en cáncer de pulmón, mama, colon, estómago, mieloma múltiple, meduloblastoma y LMA t(11q23)	OG	BIM, PTEN, CDKN1A, E2F1, BIM
miR-21	Elevada en cáncer de páncreas, mama, pulmón, próstata y estomago, LLC, LMA, mieloma y glioblastoma.	OG	PDCD4, PTEN, TPM1

Tabla 12. Algunos ejemplos de miRNAs involucrados en el proceso de tumorigénesis. ST: supresor tumoral; OG: oncogén [173].

1.4.6 Familia miR-200

La familia miR-200 esta compuesta por cinco miembros: miR-200a, 200b, 200c, 141 y 429 que están localizados en dos *clusters* dependiendo de su localización cromosómica. En un clúster se encuentran el miR-200a, miR-200b y miR-429 que se localizan en la región cromosómica 1p36 y en el otro clúster hallamos el miR-200c y miR-141 localizados en la región cromosómica 12p13 (Figura 22).



Figura 22. Localización cromosómica de la familia miR-200.

Debido a que presentan diferencias en su *seed-sequence*, también se pueden clasificar en dos grupos dependiendo de su secuencia: miR-200bc/429 (color rojo) y 200a/141 (color azul). Los dos grupos se distinguen por un cambio de un nucleótido (U y C) (Figura 23).



Figura 23. Alineamiento de la *seed-sequence* de los miembros de la familia miR-200 [209].

Además del cambio del nucleótido, los dos grupos presentan diferencias respecto a la predicción de dianas, que podría explicar por qué cada uno de los grupos puede actuar de una manera diferente (Figura 24)[210, 211].

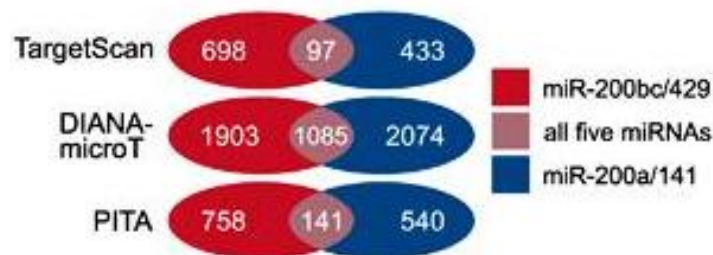


Figura 24. Número de dianas predichas de los dos grupos de la familia miR-200, determinado por tres algoritmos diferentes de predicción de dianas de miRNAs [209].

En diferentes trabajos publicados se indica que la familia miR-200 es un poderoso regulador del proceso de la transición epitelio-mesénquima (TEM), de la adhesión celular tumoral, migración, invasión, metástasis y de diferentes vías de señalización, tales como el TGF- β , Notch, Wnt, *TP53*, etc.

La regulación de la familia miR-200

Se han descrito diferentes factores de transcripción y modificaciones epigenéticas que actúan como elementos clave en la regulación de la familia miR-200 (Figura 25). Mizuguchi y colaboradores demostraron que la regulación de miR-200 por medio de ZEB1 podía ser modulada por la participación de factores de transcripción como P300 y PCAF, ya que observaron que la activación de la transcripción de miR-200c/141 ocurría cuando P300 y PCAF interactuaban con ZEB1 y la disrupción de la interacción de P300 y PCAF suprimían la actividad transcripcional [212]. Otros factores que también se han visto involucrados en la expresión de miR-200 son la prolina, ácido glutámico y la proteína rica en leucina 1 (PELP1). Kim y colaboradores demostraron que el efecto inhibitorio de *TP53* en la TEM esta asociado a la inducción de la transcripción de la familia miR-200 al unirse en su región promotora e inducir así la represión de los ZEBs responsables de la regulación de la TEM como se describirá más adelante [213].

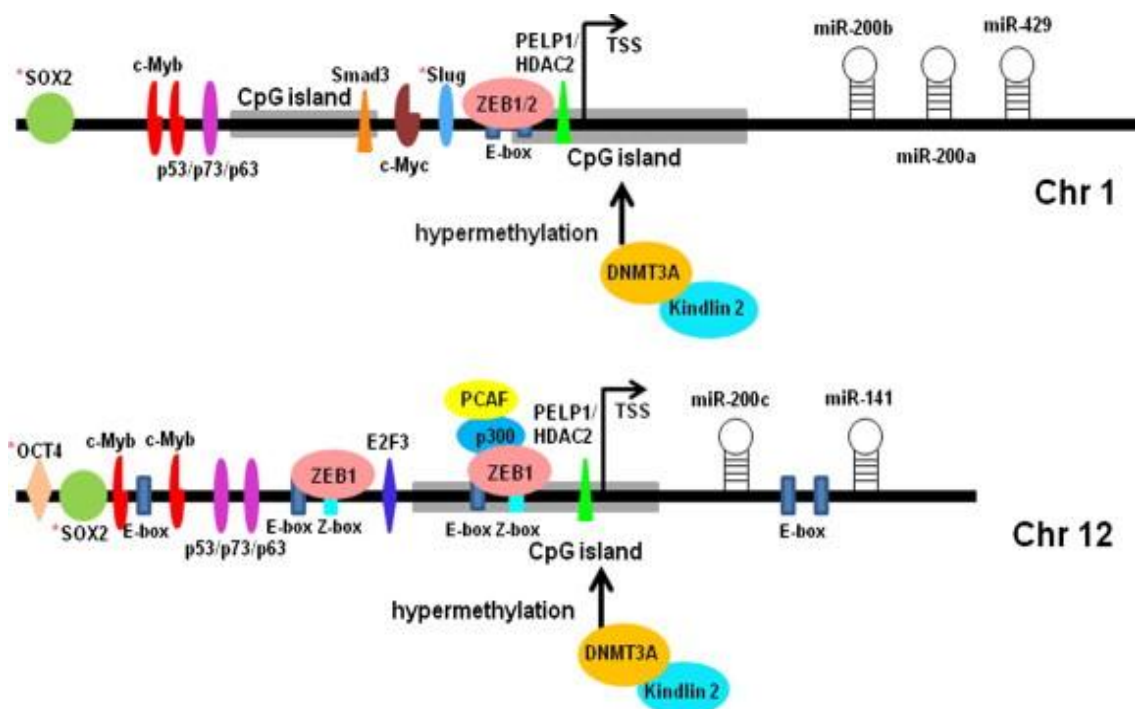


Figura 25. Regulación de la expresión de la familia miR-200 mediante diferentes factores de transcripción y modificaciones epigenéticas [214].

Otros factores, actualmente descritos por su importancia en el mantenimiento de la pluripotencia de las células madres, también juegan un papel importante en la expresión de la familia miR-200, incluyendo SOX2, C-MYC y OCT-4.

Por otro lado, modificaciones epigenéticas también participan en el control de la expresión de la familia miR-200 en células normales y células cancerosas [215]. Se ha descrito que en ambos *clusters* hay regiones ricas de CpGs que son las áreas principalmente susceptibles a la metilación. Recientemente, la proteína de adhesión Kindlin 2 se ha encontrado que forma un complejo con la DNA citosina-5-metiltransferasa 3 alfa (DNMT3A) que induce la hipermetilación del promotor, infraexpresando los miembros de la familia miR-200 [216]. También la modificación de histonas puede regular la expresión de la familia miR-200 (Figura 25).

La familia miR-200 y la TEM

La TEM es un conjunto de eventos celulares que permite la conversión de células epiteliales en células mesenquimales. Es un proceso biológico que permite a las células epiteliales someterse a múltiples cambios bioquímicos y así convertirse en células que presentan una mayor capacidad migratoria, invasividad y elevada resistencia a apoptosis. Este evento sucede durante el desarrollo de los vertebrados y se mantiene latente en la etapa adulta de los organismos, pero puede ser reactivada en diferentes enfermedades y en la progresión tumoral. Las células epiteliales se encuentran unidas entre sí por uniones adherentes, formadas por la participación de proteínas como la E-cadherina, cateninas y anillos de actina. Las uniones adherentes están asociadas a complejos de polaridad apico-basal. Durante la TEM, se reprime la transcripción de los genes que codifican para los componentes de las uniones adherentes y esto implica la pérdida de la polaridad apico-basal de la célula facilitando la posibilidad de migración celular.

ZEB1 y ZEB2, miembros de la familia *zinc-finger E-box binding homeobox*, han sido identificados como los reguladores más importantes de la TEM [217]. El mecanismo por el que ZEB1 y ZEB2 facilitan la TEM es debido a la capacidad de estos para inhibir las adhesiones célula-célula. Lo realizan mediante la represión del receptor de E-cadherina e implicará una ganancia de la expresión de marcadores mesenquimales (Figura 26) [218, 219].

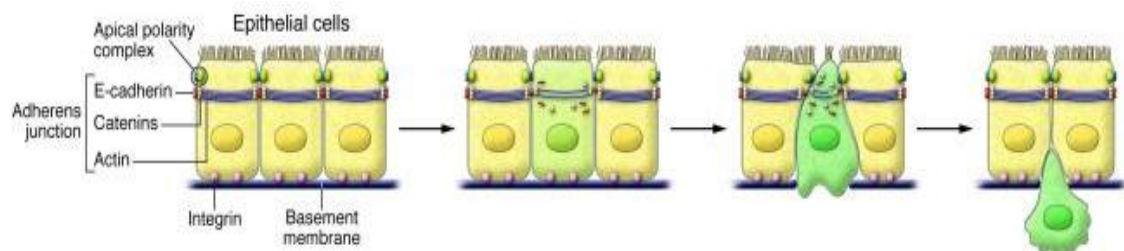


Figura 26. Pérdida de las moléculas de adhesión que implican la pérdida de la polaridad apico-basal que caracterizan la TEM [219].

Las principales evidencias descritas de la regulación de la TEM por parte de la familia miR-200 se han publicado en trabajos relacionados con cáncer, donde las células epiteliales tumorales con alta expresión de la familia miR-200 reprime la expresión de los ZEBs; mientras que en las células mesenquimatosas tumorales, la baja expresión de miR-200 permite la inducción de los ZEBs y la subsecuente represión de la E-cadherina [220-222].

El TGF- β es responsable de controlar la proliferación celular y la diferenciación. Es un importante inductor de la TEM en las células epiteliales durante la progresión del cáncer y el desarrollo embrionario (Figura 27) [223, 224]. Tras la estimulación por TGF- β , los factores de transcripción ZEB son sobreexpresados e implican la represión de los miembros de la familia miR-200 y la consiguiente represión de E-cadherina y genes responsables de la polaridad [225].

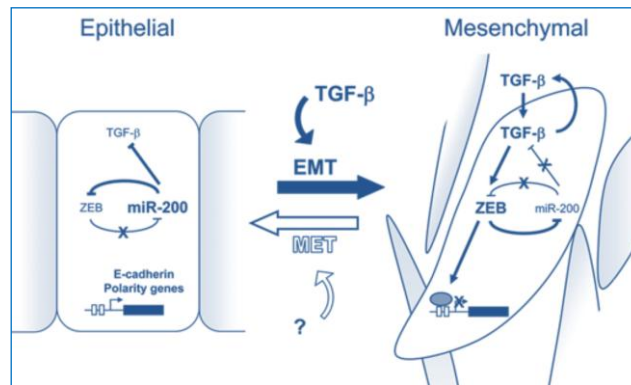


Figura 27. Modelo propuesto de regulación del TEM por el TGF- β [225].

La anormal activación de la vía Notch se ha visto que se asocia con diferentes tipos de cáncer y coopera con otras vías que facilitan la inducción de la TEM [226]. El ligando JAG1 y los coactivadores como MAML2 y MAML3 son dianas de los miembros de la familia miR-200. Se ha descrito que el incremento de la vía de Notch implica el incremento de la expresión de ZEB1. El subyacente mecanismo regulado por el ligando JAG2 puede regular el factor de transcripción GATA3, que permitirá la supresión de los miembros de la familia miR-200 (Figura 28) [227].

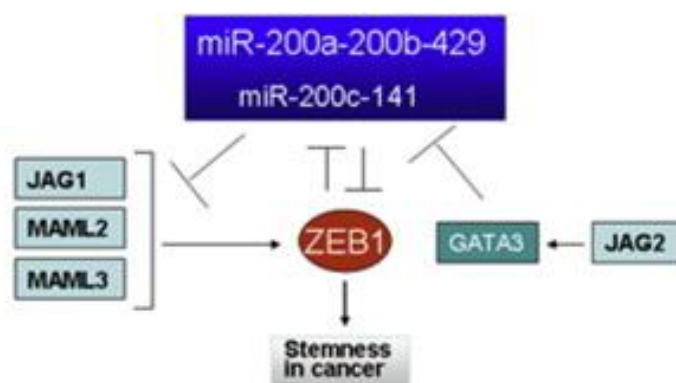


Figura 28. Esquema representativo de la influencia de la vía Notch en la TEM [227].

La vía de señalización de Wnt representa otro ejemplo de vía que participa en la inducción de la TEM y se encuentra asociada con ZEB/miR-200. Se ha descrito que ZEB1 regula los efectos de las vías de Wnt junto la expresión de otras proteínas implicadas en la invasión celular, como

MT1-MMP y LANC2 [228]. La relación de la vía Wnt con ZEB2 aún esta por determinar, pero se cree que puede inhibir otros elementos que impliquen inhibición de vías secundarias (Figura 29) [229].

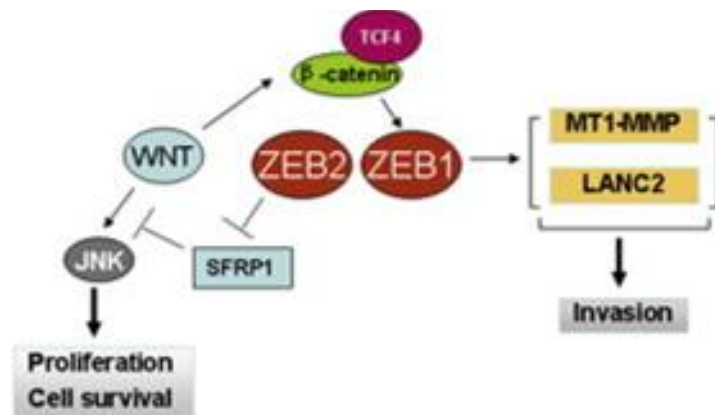


Figura 29. Esquema representativo de la influencia de la vía de Wnt en la TEM [227].

La familia miR-200 y cáncer

Como se puede apreciar en los dos tipos de cáncer anteriormente explicados, la biología del tumor no es estática y se ve afectado por un gran número de factores. Un ejemplo de la dinámica de las células tumorales es el mecanismo mencionado en el apartado anterior: la TEM. La expresión de los miembros de la familia miR-200 se encontró que se asociaba fuertemente con el fenotipo epitelial que presentaban las células tumorales y explica en gran medida la correlación con el pronóstico de los pacientes [220-222].

Recientemente, la desregulación de los miembros de la familia miR-200 se ha descrito en diferentes tipos de cáncer humano (Tabla 13). En estudios con muestra de pacientes se ha observado una gran correlación entre la expresión de la familia miR-200 y la progresión tumoral. Además, se ha demostrado que niveles bajos de la expresión de los miembros de la familia miR-200 pueden correlacionarse con una peor supervivencia y servir como marcador pronóstico en algunos pacientes con cáncer. También se ha visto que en algunos tipos de cáncer los niveles altos pueden estar asociados al mal pronóstico de los pacientes, un mecanismo no asociado a la TEM, que aun no ha sido bien caracterizado.

Miembros de la familia miR-200 involucrados	Su expresión	Tipo de cáncer	Referencia
miR-200a/b/c/141	↑	Cáncer de vejiga	[230]
miR-200a/b/c/141/429	↑	Cáncer de mama	[231, 232]
miR-200a/b/c/141	↓	Cáncer colorrectal	[233, 234]
miR-200a/b/c/141	↑	Cáncer de pulmón	[235, 236]
miR-200a/b/c/141	↓	Cáncer gástrico	[237, 238]
miR-200a/b/c/141/429	↓	Cáncer ovárico	[239-241]
miR-200a/b/c	↑	Cáncer pancreático	[242, 243]
miR-200a/b/c/141/429	↓	Cáncer prostático	[244]

Tabla 13. Desregulación de miR-200 en diferentes tipos de cáncer humano [214].

Los estudios en líneas celulares nos han permitido comprender mejor el efecto que esta familia tiene sobre la biología de las células tumorales. En un estudio de más de 60 líneas celulares, se demostró que la expresión de la familia miR-200 se correlacionaba con un fenotipo epitelial [220], responsable de la supresión de la TEM en varios modelos de cáncer, incluyendo cáncer de vejiga, colorrectal [245, 246] y de pulmón [247, 248]. En líneas celulares

de cáncer de mama, la familia miR-200 se descubrió que actuaba directamente infraexpresando los represores transcripcionales ZEB1 y ZEB2, donde se observó la restauración de un fenotipo epitelial, que se caracteriza por un aumento en la expresión de E-cadherina y la disminución de la migración e invasión [220-222].

La familia miR-200 y el proceso de metástasis

La producción de metástasis es muy compleja y en gran parte desconocida, pero se están empezando a descifrar algunos mecanismos que la promueven, facilitan y consiguen que se desarrolle. Uno de estos mecanismos es la anteriormente mencionada TEM. Como se observa en la Figura 30 algunas células tumorales adquieren características mesenquimales a través de la TEM, lo que les permite una mayor habilidad para escapar del tumor primario, invadir los tejidos de alrededor y eventualmente colonizar sitios más lejanos vía sangre o vía linfática y generar metástasis. Las células metastásicas pueden después revertir el proceso conocido como transición mesénquima-epitelio (TME) y de esta manera readquirir características similares de las células del tumor primario [249]. Tal y como se indica en el punto anterior, la familia mir-200 juega un papel importante en la regulación de este mecanismo aunque no está del todo establecido.

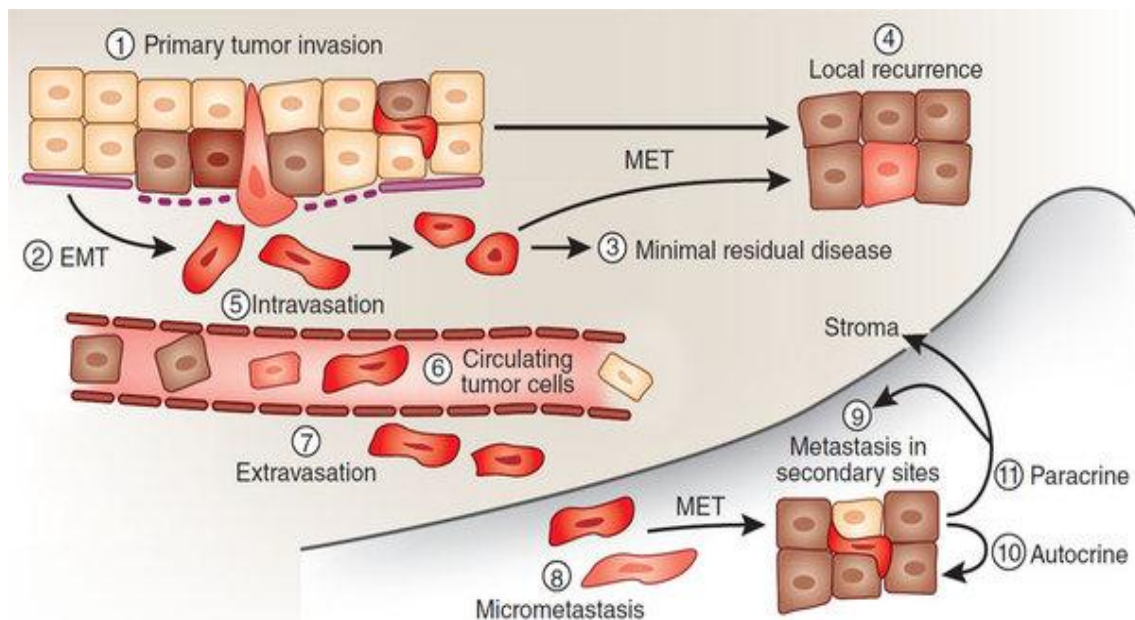


Figura 30. El papel de la TEM en la progresión del tumor [250].

Uno de los trabajos publicados demostró que la familia miR-200 estaba infraexpresada en tumor primario versus metastásico en cáncer de mama, colon, pulmón y vejiga [251]; otro grupo corroboró este hecho al observar que la expresión de miR-200 se encontraba

sobreexpresada en el grupo de metástasis en cáncer de mama [252]. Por lo contrario, otro grupo de investigadores observó que los niveles bajos de miR-200b se encontraban en el grupo de pacientes metastásicos de cáncer de mama. En los estudios con modelos de ratón ginogénicos, observaron que al aumentar la expresión de miembros de esta familia incrementaban las metástasis en un panel de líneas celulares 4T1 y 4TO7. Los autores soportan que el mayor número de metástasis es debido a la capacidad de la familia miR-200 de inducir la TME durante el proceso metastásico [253].

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. Hipótesis y Objetivos

2.1 Hipótesis

La mayor parte de los tumores sólidos son de origen epitelial. Las células epiteliales malignas mantienen su morfología polarizada al principio, pero más tarde la pierden al experimentar un proceso de dediferenciación, conocido como la TEM, hacia células mesenquimales. La TEM está implicada en la interrupción de la integridad del epitelio normal y consecuente ganancia de marcadores mesenquimales, acompañado de la adquisición progresiva de fenotipo invasivo y metastásico. Las células mesenquimales dejan de estar unidas pudiendo viajar a distancia por el torrente circulatorio, por tanto participar en procesos de metástasis. La TEM es un proceso reversible ya que la célula mesenquimal maligna podrá transformarse de nuevo en epitelial, proceso conocido como transición mesénquima-epitelio y llegar a establecerse en otro lugar y colonizar a distancia.

En todo este proceso intervienen diferentes moléculas incluyendo, la familia de miRNAs miR-200. Esta familia participa en el proceso mediante la regulación traduccional de ZEB1 y ZEB2, de forma que el efecto final es la regulación de los niveles de la molécula de adhesión E-cadherina.

Debido a que esta familia de miRNAs se ha visto desregulada en diferentes tumores epiteliales, su clara participación en el proceso de invasión y metástasis, hemos considerado que podrían jugar un papel clave como marcador pronóstico en el CPCNP y CCR.

Con estas premisas nos planteamos los siguientes objetivos:

2.2 Objetivos

Basándonos en la presente hipótesis se plantearon los siguientes objetivos.

2.2.1 Objetivo general

Identificar la relevancia clínica y biológica de esta familia de miRNAs en el CPCNP y en el CCR.

2.2.2 Objetivos específicos

1. Analizar los niveles de expresión de los distintos miembros de la familia miR-200 en muestras tumorales y normales de pacientes afectados de CPCNP y CCR.
2. Determinar si los niveles de expresión de los miRNAs de la familia miR-200 se correlacionan con las características clínicas y biológicas de los pacientes.
3. Analizar si los niveles de expresión de los miRNAs de la familia miR-200 se correlacionan con la recaída y la supervivencia.
4. Evaluar los mecanismos de acción de esta familia de miRNAs en los dos tipos de tumores estudiados.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y Métodos

3.1 Pacientes

En el primer trabajo realizado en pacientes con CPCNP, se han analizado de manera retrospectiva 155 pacientes diagnosticados entre marzo del 1996 y diciembre del 2009 en el Hospital Clínic Provincial de Barcelona. Las características más relevantes se encuentran detalladas en la Tabla 14.

Características de los pacientes de CPCNP	N=155 (%)
Sexo	
Hombre	135 (87)
Mujer	20 (13)
Edad, Mediana (Rango)	65 (35-38)
≤65	74 (47,8)
>65	81 (52,2)
Estadio funcional (escala ECOG)	
0	21 (13,6)
1	132 (85,2)
2	2 (1,2)
Estadio	
I	94 (60,6)
II	34 (22)
III	27 (17,4)
Histología	
Adenocarcinoma	73 (47,1)
Carcinoma escamoso	70 (45,1)
Otros	12 (7,8)
Tabaquismo	
Fumador	61 (39,3)
Ex fumador	77 (49,7)
No fumador	9 (5,8)
No conocido	8 (5,2)

Tipo de cirugía	
Lobectomía/Bilobectomía	121 (78,1)
Neumonectomía	25 (16,1)
Resección atípica	9 (5,8)
Quimioterapia adyuvante	
Si	20 (12,9)
No	135 (87,1)
Recaída	
Si	70 (45,2)
No	85 (54,8)

Tabla 14. Características clínicas de los pacientes.

En el segundo trabajo realizado en pacientes con CCR, se han analizado de manera retrospectiva 127 pacientes diagnosticados entre agosto del 2003 y agosto del 2007 en el Hospital Municipal de Badalona. Las características más relevantes se encuentran detalladas en la Tabla 15.

Características de los pacientes de CCR	N=127 (%)
Sexo	
Hombre	69 (54,3)
Mujer	58 (45,7)
Edad, Mediana	
≤65	49 (38,6)
>65	78 (61,4)
Estadio funcional (escala ECOG)	
0	11(8,7)
1	80 (63)
2	36 (28,3)
Estadio	
I	18 (14,2)
II	64 (50,4)
III	45 (35,4)
Localización del tumor	
Colon	86 (67,7)

Recto	41 (32,3)
Tratamiento adyuvante	
Fluoropirimidinas	56 (44,1)
XELOX	24 (18,9)
No	47 (37)
Recaída	
Si	18 (14,2)
No	109 (85,8)
Niveles de CEA	
≤ 5	78 (61,4)
> 5	29 (22,8)
No determinado	20 (15,8)
Niveles de CA19.9	
≤ 37	103 (81,1)
> 37	16 (12,6)
No determinado	8 (6,3)
Pre-existencia de pólipos	
Ausencia	97 (76,4)
Presencia	30 (23,6)
Secreción mucínica	
Ausencia	113 (89)
Presencia	14 (11)
Invasión perilinfática	
Ausencia	117 (92,1)
Presencia	10 (7,9)
Invasión perivascular	
Ausencia	118 (92,9)
Presencia	9 (7,1)
Invasión perineural	
Ausencia	119 (93,7)
Presencia	8 (6,3)

Tabla 15. Características clínicas de los pacientes.

3.2 Líneas celulares

Se ha trabajado con cuatro tipos de líneas celulares, tres de cáncer de pulmón y una de cáncer colorrectal.

Las líneas celulares de cáncer de pulmón utilizadas han sido las siguientes: H23, A-549 y HCC-44. La línea celular H23 (ATCC® CRL-5800™) corresponde a una línea celular de CPCNP de grupo histológico ADC. Como características principales, presentan mutación en el gen *KRAS* y una mutación en el codón 246 (ATC>ATG, isoleucina > metionina) del gen *TP53*. Son L-dopa descarboxilasa negativas y son positivas para citoqueratinas 5, 8 y 18 y vimentina, pero son negativas para neurofilamentos. La línea celular A-549 (DMSZ® ACC 107) se inició a través de cultivo de explantes de tejido pulmonar carcinomatoso de un varón de raza blanca de 58 años de edad y es descrita como carcinoma pulmonar. En muchos trabajos se describe como adenocarcinoma, pero no está definida como tal en los datos que facilita la casa comercial. Como características a destacar, presentan mutación en el gen *KRAS* pero no en el gen *TP53*. Es positiva para citoqueratinas 7, 8, 17, 18 y 19, EpCAM negativo, neurofilamentos negativo y vimentina positiva. La línea celular HCC-44 (DMSZ® ACC 534) corresponde a una línea celular de CPCNP de grupo histológico ADC. Como características principales presenta mutación en el gen *KRAS* y en *TP53*. Es positiva para citoqueratinas 7, 8, 17, 18 y 19, EpCAM positiva, neurofilamentos negativo y vimentina positiva.

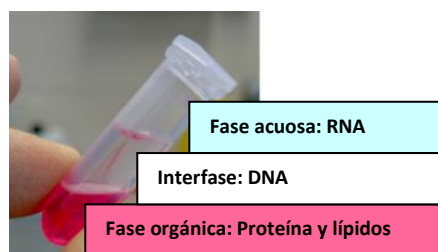
La línea celular de cáncer colorrectal utilizada ha sido la LOVO (ATCC® CCL-229™), corresponde a una línea celular de colorrectal tipo adenocarcinoma. La línea celular se inició a partir de un paciente varón de raza blanca de 56 años de edad con un diagnóstico histológicamente comprobado de adenocarcinoma de colon. Como características principales, son positivas para la expresión de *C-MYC*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *MYB*, *SIS* y *FOS*. Se expresan proteínas de la matriz nuclear específica de tumor como CC-3 y CC-4.

Todas las líneas, excepto la A-549, han sido cultivadas en RPMI 1640 con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomycin) (Life Technologies S.A) y mantenidas en el incubador en condiciones de 37°C, 5% CO₂ y 95% de humedad. La línea celular A-549 ha sido cultivada en DMEM con suero fetal bovino al 10% y antibiótico (penicilina y estreptomycin) (Life Technologies S.A) y mantenida en las mismas condiciones anteriormente definidas.

3.3 Extracción de RNA

La extracción de RNA de las muestras de tejido tumoral y tejido normal de los pacientes se realizó mediante Trizol[®] Total RNA Isolation Reagent (Life Technologies S.A):

- i. Por cada 50-100 mg de tejido se añade 1ml de Trizol[®].
- ii. Homogenización: Triturar el tejido congelado con el bisturí en una placa de petri, homogenizar el tejido con el Trizol[®] y recogerlo en un eppendorf. Vortear rápidamente.
- iii. Separación de fases: Incubar 5 min a temperatura ambiente para permitir la completa disociación de los complejos núcleo-proteicos. Agregar 0,2 ml de Cloroformo a cada tubo (0,2 ml de Cloroformo por 1 ml de Trizol[®]). Tapar correctamente los tubos. Agitar vigorosamente con la mano durante 15 segundos e incubar durante 2-15 min a temperatura ambiente. Centrifugar a 12.000 g durante 15 min a 2-8°C. Después de la centrifugación, se obtienen diferentes fases. Encontramos una fase inferior rosa, una interfase y una fase superior incolora acuosa. Es en la fase incolora donde se encuentra el RNA.



- iv. Precipitación del RNA: Aislamos la fase superior incolora acuosa y lo transferimos a un eppendorf nuevo. Añadimos 0,5 ml de isopropanol a cada tubo (0,5 ml de isopropanol por ml de Trizol[®]). Incubar a -20 °C *overnight*. Centrifugar a 12.000 g durante 10 min a 4 °C.
- v. Lavado del RNA: Descartamos el sobrenadante. Lavamos el pellet de RNA con 1 ml de Etanol al 75 % (adicionar al menos 1 ml de etanol por ml de Trizol[®] usado). Mezclar con vortex y centrifugar a 7.500 g durante 5 min a 4 °C.
- vi. Redisolución del RNA: Descartamos el sobrenadante y dejamos secar el *pellet* al aire. Resuspendemos con la ayuda de una pipeta el *pellet* de RNA en agua *millipore* (de 60-70µl dependiendo del tamaño del *pellet*) y lo dejamos incubar unos 10 min a 60°C.

3.4 Cuantificación de microRNAs

El estudio del análisis de la expresión de los miRNAs se realizó mediante el uso de ensayos de microRNA TaqMan® (Life Technologies S.A). El cDNA se obtuvo mediante el kit *TaqMan® microRNA Reverse Transcription kit* (Life Technologies S.A). Las reacciones se incubaron en el termociclador AB 9500 utilizando 10ng de RNA total extraído anteriormente, 50nM de los primers RT comerciales en stem-loop (de miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429), 1X RT buffer, 0,25mM de dNTPs, 3,333U/μl de transcriptasa reversa MultiScribe y 0,25U/μl de RNasa inhibitor.

A continuación se realizó una PCR a tiempo real con el equipo 7500 Real Sequence Detection. La reacción incluyó 0,7 μl de producto de cDNA, 1X TaqMan Universal PCR master mix y 1μl de primer comercial y sonda del kit *TaqMan microRNA Assay* protocol. Se utilizó el miRNA RNU6B como control endógeno en el CCR y el miRNA-191 en el estudio de las muestras de CPCNP. La cuantificación relativa fue calculada usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.5 Transfección

Las líneas celulares de pulmón se transfectaron con 100nM de pre-miR-200c, pre-miR-141 y pre-miR-Control negativo (Life Technologies S.A); la línea celular LOVO fue transfectada con 100nM de anti-miR-200a, anti-miR-200c, anti-miR-429, anti-miR-Control negativo, pre-miR-429 o pre-miR-Control negativo usando la Lipofectamine® 2000 (Life Technologies S.A), siguiendo el protocolo siguiente:

- i. Se cultivaron las células en medio sin antibiótico (RPMI, 10% FBS) en placa de 6 o 12 pocillos, dependiendo del experimento a realizar y se dejaron toda la noche el incubador. Las células fueron creciendo hasta conseguir un 50-70% de confluencia en el momento de la transfección.
- ii. Para cada experimento se prepararon los reactivos siguientes:
 - Diluimos los pre-miRNA en Opti-MEM (Life Technologies S.A).
 - Mezclamos la Lipofectamine® 2000 con el Opti-MEM e incubamos la mezcla durante 5 minutos a temperatura ambiente.
 - Tras la incubación, se mezclaron los dos componentes e incubaron no más de 30 minutos a temperatura ambiente y fuera de la luz.

- iii. A continuación añadimos la mezcla a los pocillos que contienen las células e incubamos a 37°C y 5% de CO₂.
- iv. A las 4-6 horas de la transfección, cambiamos el medio por uno con antibiótico para evitar contaminaciones.

3.6 Tratamiento con fármacos

A las 24 horas de la transfección, la línea H23, A-549 y HCC-44 se trataron con 400µM de Desferrioxamine® (DFX) (Sigma-Aldrich) responsable de inducir condiciones de hipoxia.

Las líneas LOVO, fueron tratadas a las 24 horas de la transfección con 10µM de 5-FU (Sigma-Aldrich) y con 10µM de NH₄OH (Sigma-Aldrich) como control negativo.

3.7 Análisis de los niveles de VEGF

Para los análisis de los niveles de VEGF, 24h después de la transfección realizada con el pre-miR-141, se recogieron los sobrenadantes de las células que se habían cultivado en placas de 6 pocillos (70.000 células/pocillo). Posteriormente se evaluó la cantidad de VEGF mediante el kit *VEGF Human Elisa kit* (ab100662, Abcam).

3.8 Análisis de migración

La migración celular se determinó por el método de “scratch”. Se sembraron las líneas celulares en placas de 12 pocillos (500.000 células/pocillo) y se dejaron crecer hasta llegar a un 50-70% de confluencia. Posteriormente se transfectaron con los pre-miRNAs o anti-miRNAs correspondiente y a las 24 horas post transfección se realizó un raspado a la monocapa formada en línea recta, con una punta de pipeta estéril de 100µl. La distancia de migración (µm) se midió a las 0, 12, 24, 48 y 72 horas usando el cell Sense Entry 1.7 software (Olympus).

3.9 Western blot

La proteína fue aislada utilizando el kit *Qiagen Qproteome Mammalian Protein prep* (Qiagen). Cincuenta microgramos de proteínas se cargaron en geles de electroforesis de SDS-policrilamida al 10% Tris-HCl y transferidas posteriormente a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad). La membrana se incubó con anticuerpos contra KLF6 sc-7158 (Santa Cruz Biotechnology) y alfa-tubulina (Sigma-Aldrich) que utilizamos como control de carga. Para el revelado de las membranas, se utilizó el kit *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* (Pierce Biotechnology) y fue leída en el *Chemidoc System* (Bio-Rad). Las bandas se cuantificaron

mediante el programa *Quantity One v.4.2.6* y la cuantificación relativa se calculó en referencia a la alfa-tubulina.

3.10 Análisis de los niveles de mRNA

El análisis de los niveles de mRNA se realizó a partir del RNA total extraído anteriormente explicado, el cDNA se obtuvo utilizando el kit *High Capacity DNA Reverse Transcription Kit* (Life Technologies S.A). La cuantificación del mRNA de la E-cadherina se realizó usando el kit *TaqMan Gene Expression assay* (Life Technologies S.A) y se usó el GAPDH como control endógeno. La cuantificación relativa fue calculada usando la formula $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

3.11 Inmunohistoquímica

Se realizaron una serie de cortes transversos de 3 a 5µm de espesor de diferentes muestras parafinadas y se montaron en portaobjetos (Dako). Para la inmunohistoquímica, se utilizó la inmunotinción manual usando un anticuerpo Monoclonal de ratón anti-Human CD34 clon II Ready-to-Use (Dako) y un anticuerpo Monoclonal de ratón anti-Human E-cadherina clon NCH-38 Ready-to-Use (Dako). La recuperación de antígenos se realizó a través del método *HIER* (Heat Induced Epitope Retrieval) a una temperatura de 95°C y pH de 6, utilizando el sistema *PT-Link* (Dako). La tinción inmunohistoquímica se realizó manualmente siguiendo el protocolo del kit *Advance HRP* (Dako). Para finalizar algunas de las secciones se tiñeron con hematoxilina.

3.12 Cuantificación de la formación de nuevos vasos

La cuantificación se realizó mediante el conteo de los vasos sanguíneos marcados con CD34, de las imágenes obtenidas a 200 aumentos de 4 áreas diferentes de muestras tumorales de pacientes que presentaban niveles altos o bajos de miR-141.

3.13 Análisis estadístico

Se utilizó la prueba t-Student pareado para comparar los niveles de expresión de miRNAs entre el tejido tumoral y el tejido normal. Se utilizó la prueba t-Student para comparar las diferencias entre dos grupos. Se utilizó el paquete Maxstat de R para determinar el punto de corte óptimo de las variables de estudio para los análisis de supervivencia.

La SG se calculó desde la fecha de cirugía hasta la fecha de la muerte o última fecha de seguimiento. Las curvas de Kaplan-Meier para SG se compararon mediante una prueba de log-

rank. Todos los factores del análisis univariado con un valor de $p < 0,1$ fueron incluidos en el análisis multivariado con modelo de regresión de Cox con el fin de identificar aquellas variables con valor pronóstico independiente.

Todos los análisis estadísticos se realizaron con SPSS Statistics v18 (SPSS) y R v2.8.1. Se consideraron significativos aquellos resultados con $p\text{-value} \leq 0,05$.

RESULTADOS

4. Resultados

1. Estudio de miR-141 y miR-200c como marcadores de supervivencia global en estadios tempranos de pacientes del grupo histológico adenocarcinoma con CPCNP.

Expresión de la familia miR-200 y características clínicas

Evaluamos los niveles de expresión de todos los miembros de la familia miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429) en tejido tumoral y normal en una serie de 155 pacientes de CPCNP. Todos los miembros de la familia, excepto el miR-141, estaban infraexpresados en el tejido tumoral respecto al correspondiente tejido normal (miR-200a, $P=0,043$; miR-200b, $P<0,001$; miR-429, $P=0,003$; miR-200c, $P<0,001$; Figura 31).

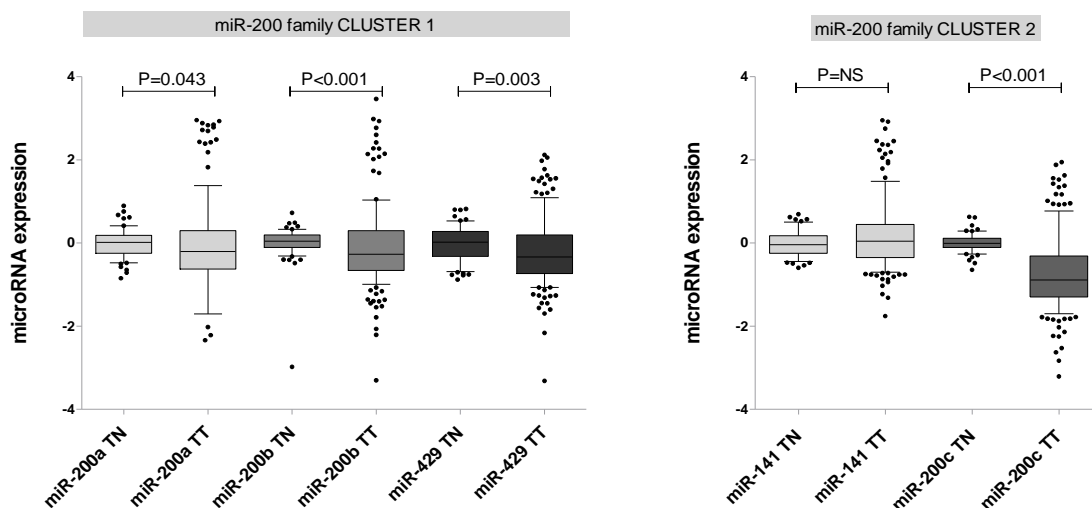


Figura 31. Expresión de la familia miR-200 en tejido tumoral y tejido normal en 155 pacientes de CPCNP. Se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las diferencias se calcularon mediante la prueba t-Student pareado.

Seguidamente analizamos las correlaciones entre esta familia de miRNAs y las características clínicas y biológicas de la serie de pacientes. Observamos que aquellos pacientes con estadio 1 y 2 presentaban niveles altos de miR-429 ($P=0,039$) en comparación con pacientes con estadio 0. Cuando tuvimos en cuenta el tabaco como variable de estudio, obtuvimos que los pacientes fumadores presentaban niveles bajos de miR-200a ($P=0,027$) y miR-429 ($P=0,032$) respecto a los pacientes que nunca habían fumado o eran exfumadores.

Niveles altos de miR-200c y miR-141 como marcadores de mal pronóstico

Los puntos de corte fueron determinados con el paquete MaxStat del programa R y clasificamos los pacientes con nivel alto o bajo de expresión en los cinco miembros de la familia miR-200. De los 155 pacientes de CPCNP, encontramos que los pacientes con niveles altos de miR-200c se asociaban a una peor supervivencia global ($P=0,024$; Figura 32), mientras que los pacientes con nivel alto de miR-141 mostraron una tendencia ($P=0,163$; Figure 33).

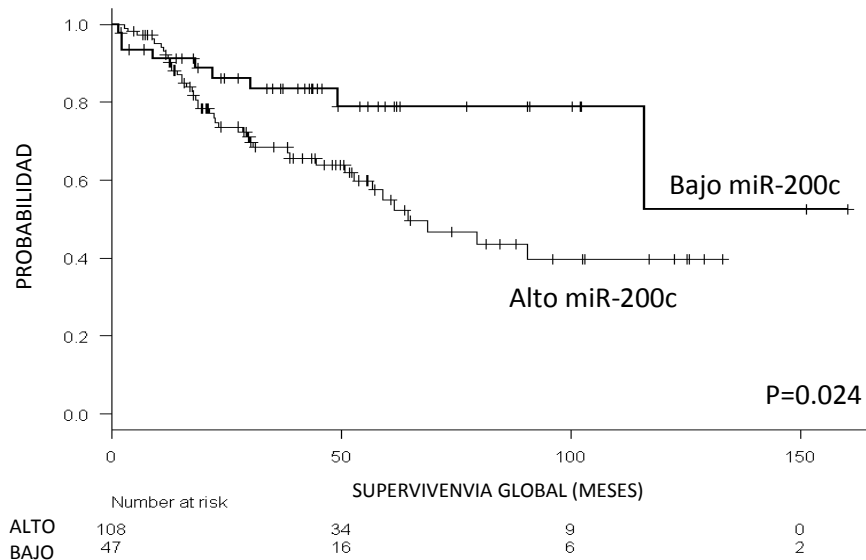


Figura 32. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200c en toda la población de estudio.

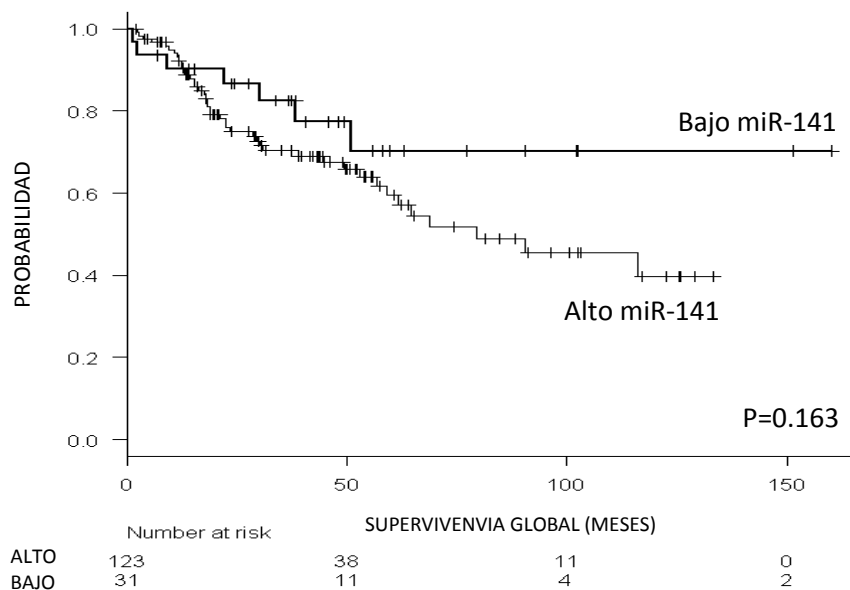


Figura 33. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-141 en toda la población de estudio.

En el subgrupo de 94 pacientes de estadio 1, se observó que los pacientes con niveles altos de miR-200c ($P=0,019$; Figura 34) y miR-141 ($P=0,030$; Figura 35) se asociaban a una peor supervivencia global. En los otros miembros de la familia este resultado no se obtuvo.

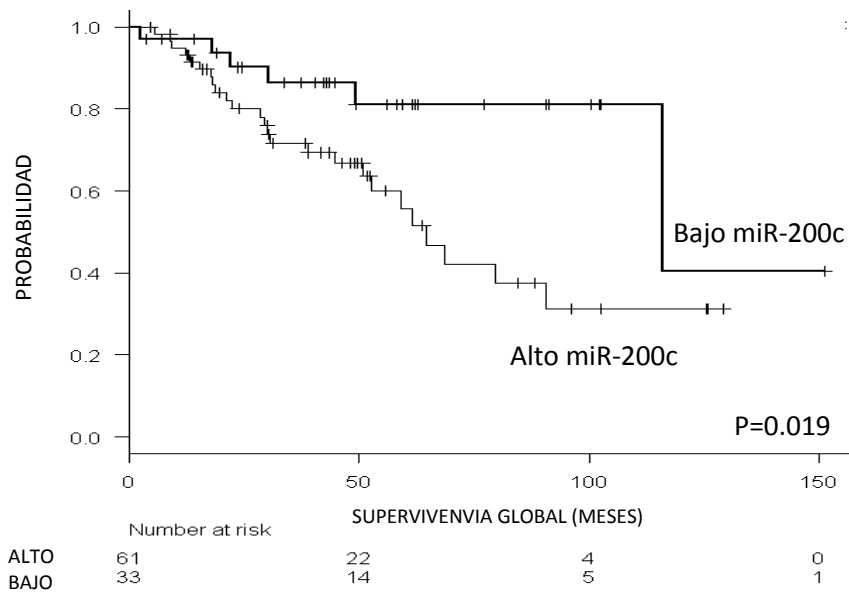


Figura 34. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200c en los pacientes con estadio 1.

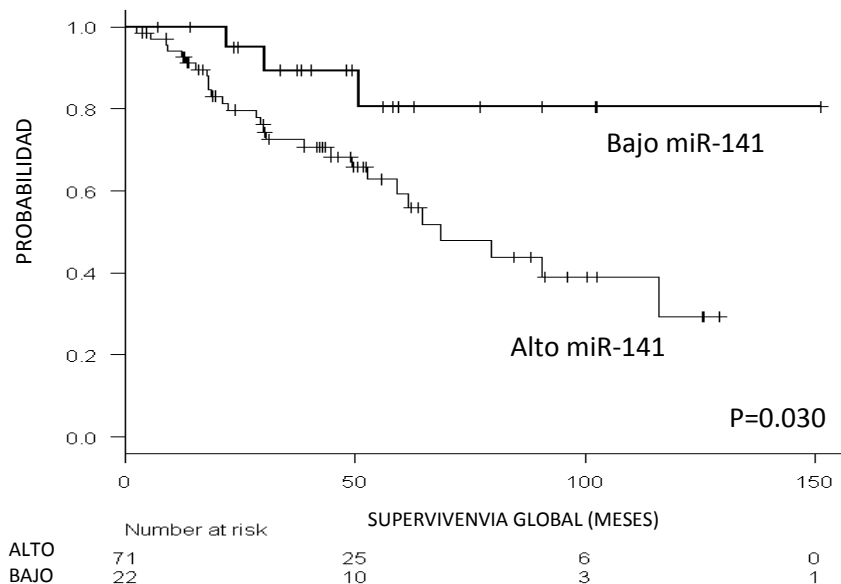


Figura 35. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-141 en los pacientes con estadio 1.

miR-141 y miR-200c en el grupo histológico adenocarcinoma

Analizamos la expresión de estos miRNAs dependiendo del grupo histológico. En el grupo histológico escamoso no se observaron diferencias significativas cuando evaluamos los niveles de miR-200c ($P=0,974$) y miR-141 ($P=0,774$) (Figuras 36 y 37).

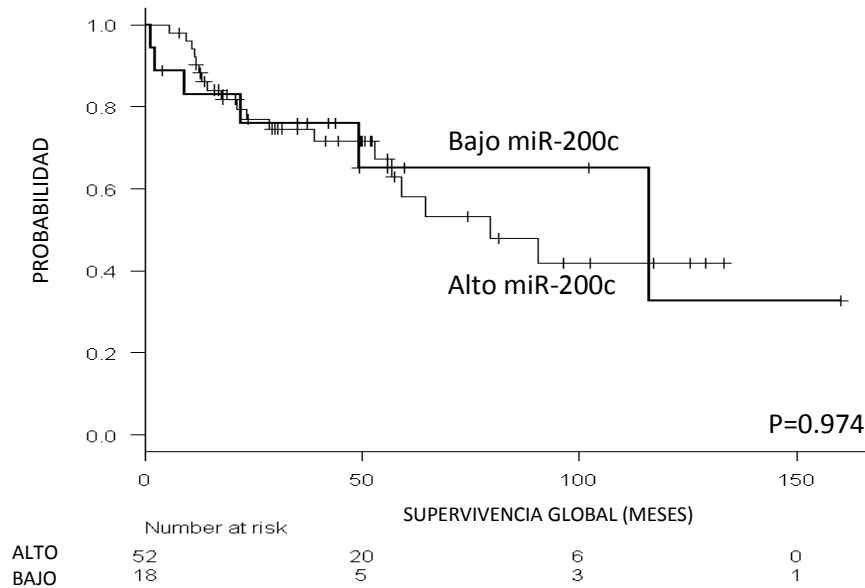


Figura 36. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200c en los pacientes con grupo histológico escamoso.

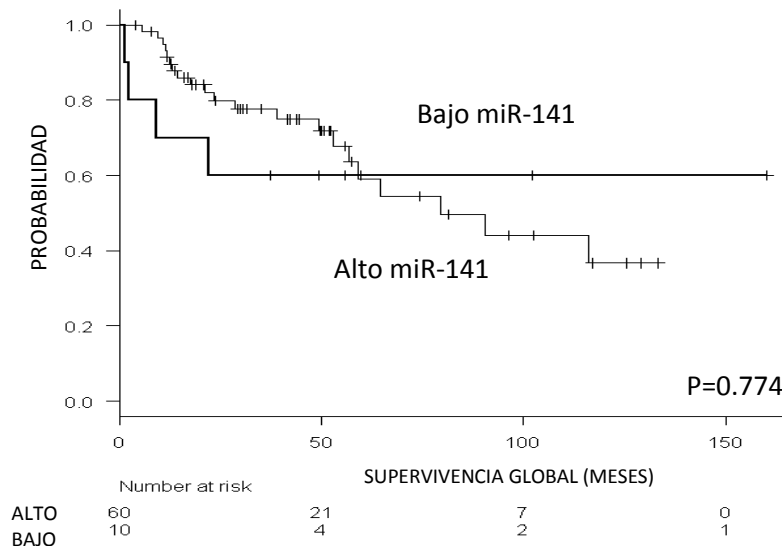


Figura 37. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-141 en los pacientes con grupo histológico escamoso.

Diferencias significativas se observaron en el grupo de adenocarcinoma (N=73), encontramos que aquellos pacientes con niveles altos de miR-200c ($P < 0,001$) y miR-141 ($P = 0,009$) se asociaban a una peor supervivencia global. El tiempo medio de la supervivencia global de los pacientes con niveles altos de miR-200c fue de 61,2 meses (95% IC=42,9-79,5), mientras que aquellos pacientes que presentaban niveles bajos fue de 145,5 meses (95% IC=134,4-156,6) (Figura 38).

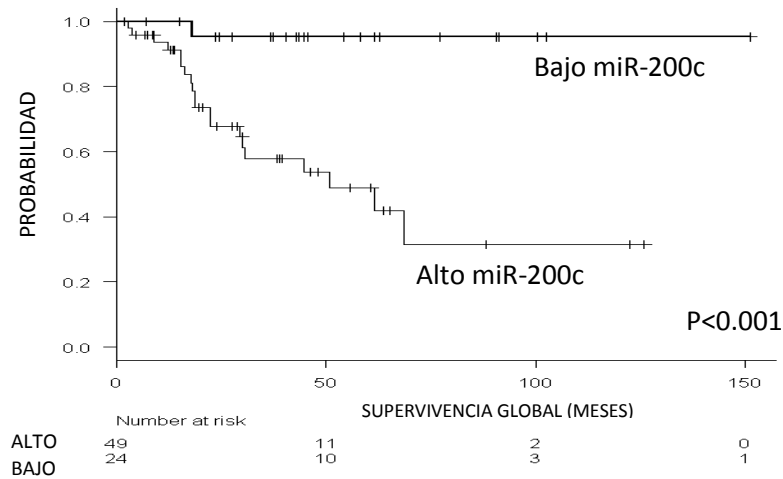


Figura 38. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200c en los pacientes con grupo histológico adenocarcinoma.

El tiempo medio de la supervivencia global de los pacientes con niveles altos de miR-141 fue de 71,1 meses (95% IC=44,9-81,6), mientras aquellos pacientes que presentaban niveles bajos fue de 136,9 meses (95% IC=110,9-1162,9) (Figura 39).

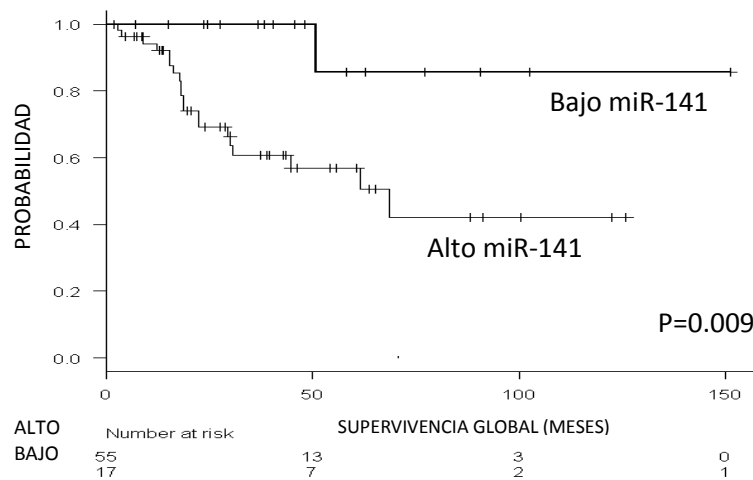


Figura 39. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-141 en los pacientes con grupo histológico adenocarcinoma.

Finalmente analizamos la combinación del efecto de miR-200c y miR-141 generando un *score* de riesgo basándonos en la expresión de los niveles de ambos micros. Los pacientes se clasificaron en tres grupos: alto, medio o bajo. Los pacientes con nivel alto de ambos miRNAs fueron clasificados en el grupo de riesgo alto, los de niveles bajos se clasificaron como pacientes de riesgo bajo y los que presentaban otras combinaciones fueron clasificados como grupo de riesgo medio (Figura 40).

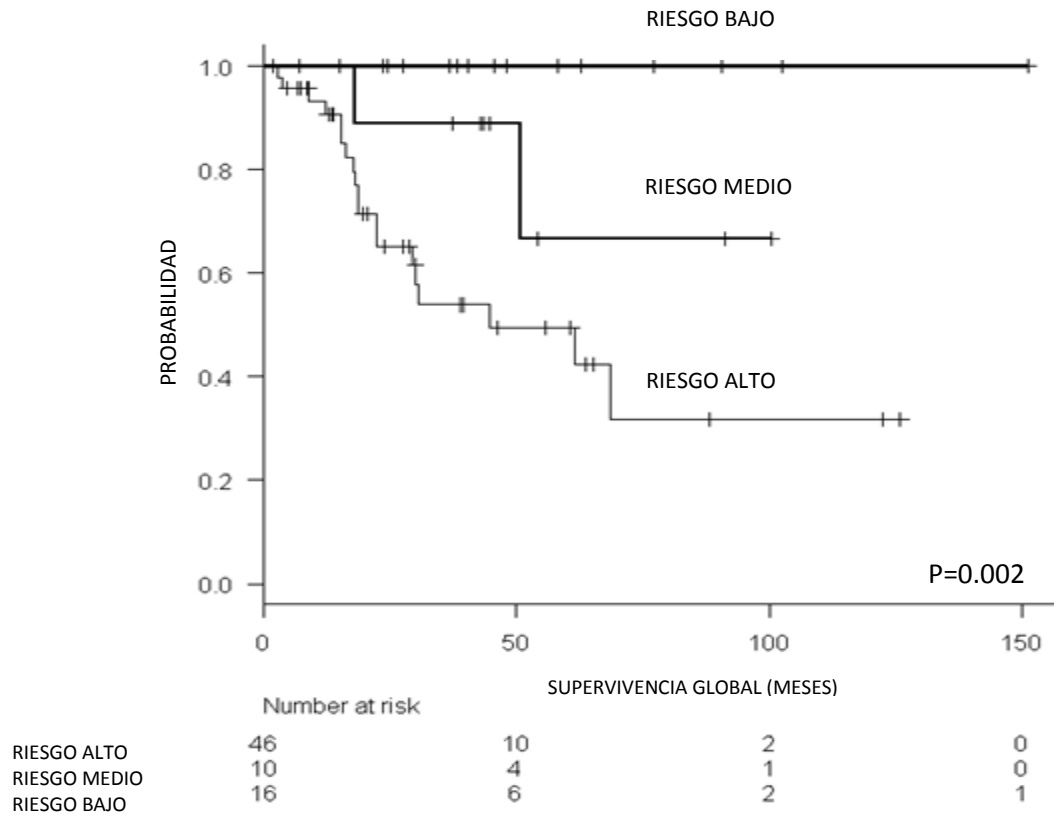


Figura 40. Supervivencia global de acuerdo a la clasificación de los pacientes en riesgo alto, riesgo medio y riesgo bajo en base al *score* de riesgo generado por la combinación de los niveles de expresión de miR-200c y miR-141.

miR-200c presenta mayor efecto que miR-141 en la migración celular y en los niveles de E-cadherina

La migración celular fue analizada *in vitro* mediante el método *scratch* después de transfectar las líneas celulares de pulmón, H23, A-549 y HCC-44 con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y pre-miRNA Control negativo. En la línea celular H23, observamos que las células transfectadas con el pre-miR-200c reducían la migración celular en comparación al control ($P=0,005$). Este resultado no se observó al analizar las células transfectadas con el pre-miR-141 (Figura 41). En la línea de pulmón A-549, observamos los mismos resultados cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-200c, donde se reducía la migración celular en comparación al control ($P=0,0085$). En el caso de analizar las células transfectadas con el pre-miR-141 también observamos que participaban en la reducción de la migración ($P=0,043$) (Figura 42). En la línea HCC-44, volvimos a observar que en las células transfectadas con el pre-miR-200c se reducía la migración celular en comparación al control de manera significativa ($P=0,013$). Al analizar las células transfectadas con el pre-miR-141 no observamos que participaban significativamente (Figura 43).

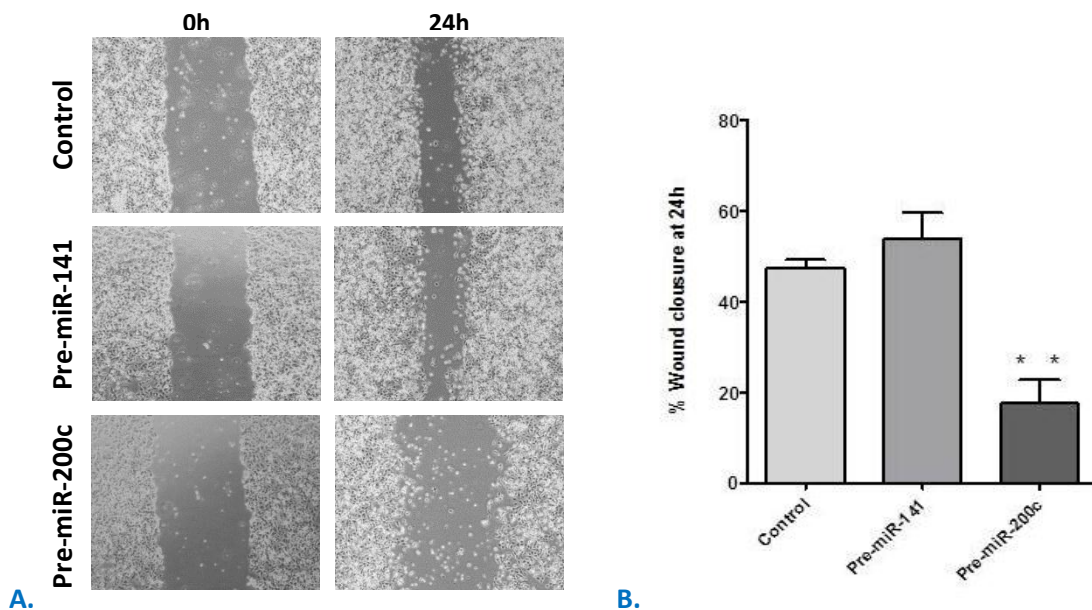


Figura 41. Efectos del miR-141 y miR-200c en la migración celular en la línea celular H23. **A.** Imagen representativa de tres experimentos independientes de un *scratch* a tiempo 0 y 24 horas después de transfectar con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y el pre-miR-Control. **B.** Porcentaje de migración observado después de transfectar tres ensayos independiente a las 24 horas.

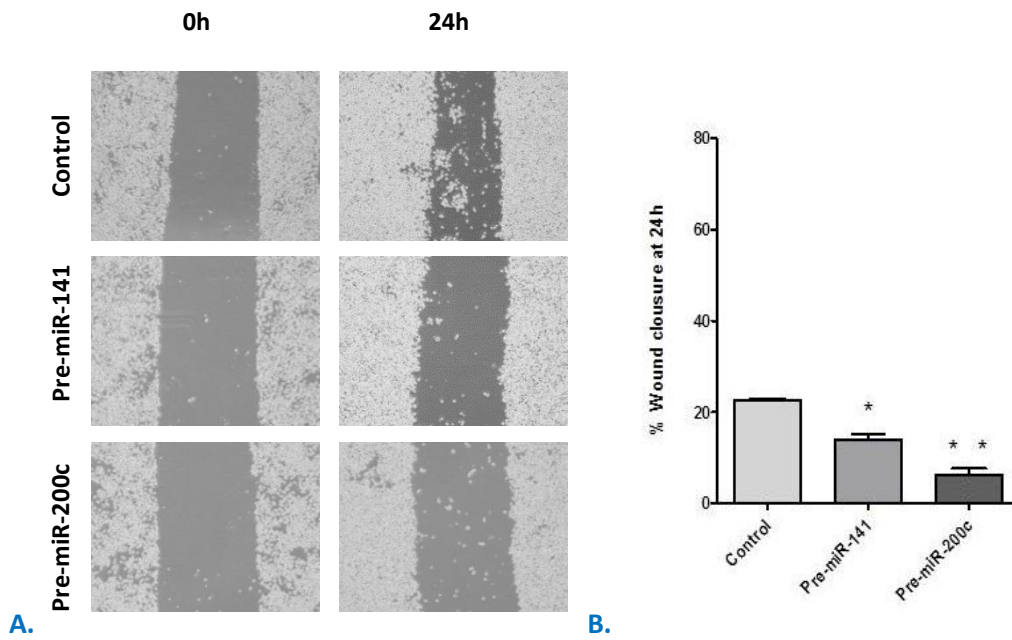


Figura 42. Efectos del miR-141 y miR-200c en la migración celular en la línea A-549. **A.** Imagen representativa de tres experimentos independientes de un *scratch* a tiempo 0 y 24 horas después d transfectar con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y el pre-miR-Control. **B.** Porcentaje de migración observado después de transfectar tres ensayos independiente a las 24 horas.

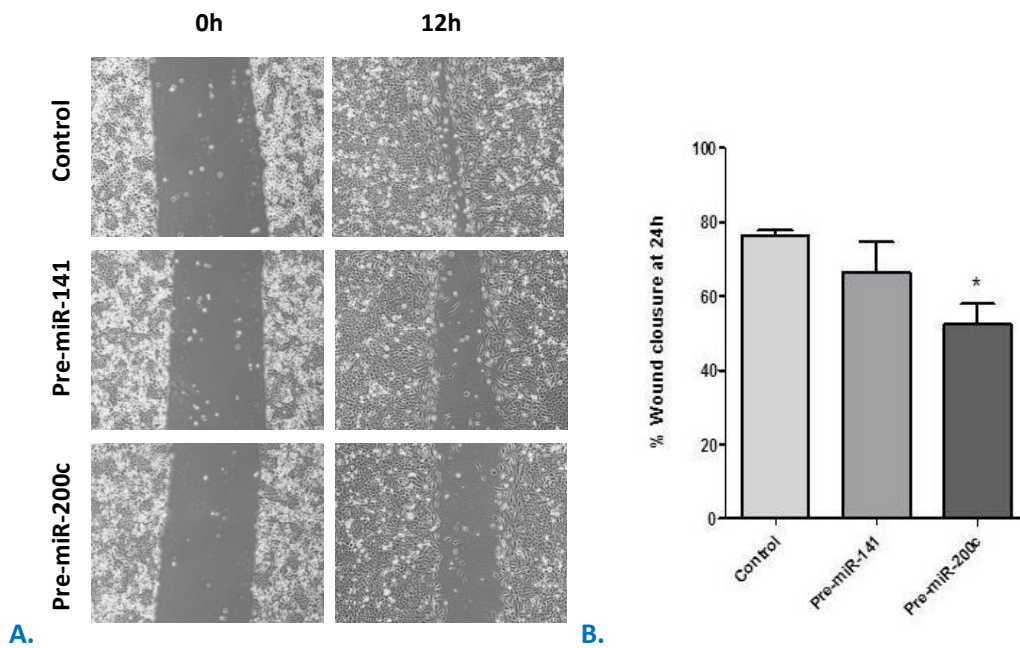


Figura 43. Efectos del miR-141 y miR-200c en la migración celular en la línea HCC-44. **A.** Imagen representativa de tres experimentos independientes de un *scratch* a tiempo 0 y 12 horas después d transfectar con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y el pre-miR-Control. **B.** Porcentaje de migración observado después de transfectar tres ensayos independiente a las 24 horas.

Después de la transfección con los pre-miRNAs, los niveles de E-cadherina fueron analizados por IHQ y el incremento de nivel de la E-cadherina fue observado en las células H23, A-549 y HCC-44, transfectadas con el pre-miR-200c comparado con el pre-miR-Control negativo y con el pre-miR-141 (Figura 44).

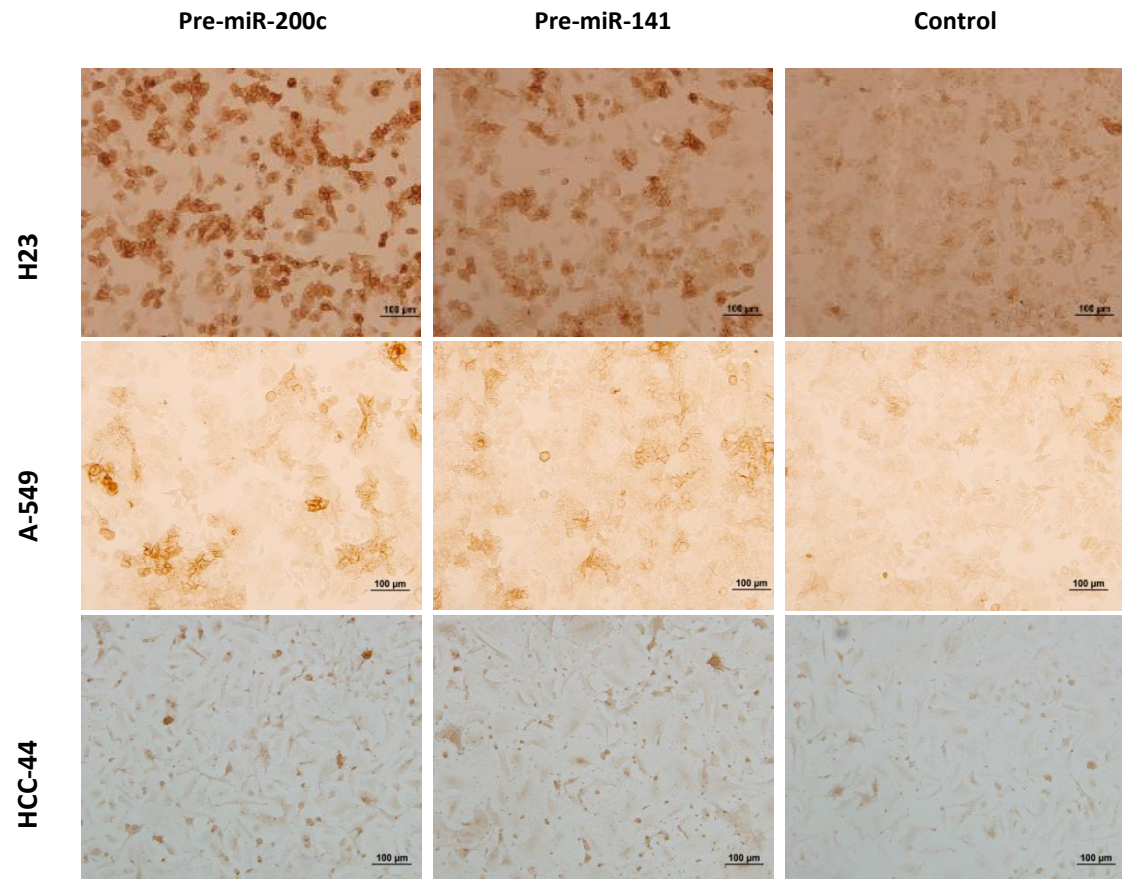


Figura 44. Niveles de E-cadherina analizados por IHQ en la línea celular transfectadas con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y pre-miR-Control.

miR-141 regula la angiogénesis de manera negativa por vía del KLF6, permitiendo el incremento de los niveles de VEGFA y se relaciona con un alto nivel de densidad de vasos sanguíneos

Identificamos que KLF6 podría ser una diana putativa de miR-141 pero no de miR-200c con el uso del TargetScan 6.2. Analizamos la cantidad de proteína de KLF6 mediante Western Blot, de las tres líneas celulares de CP transfectadas con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y pre-miRNA Control. Donde obtuvimos que el nivel de proteínas de KLF6 se reducía significativamente en las líneas transfectadas con el pre-miR-141 en comparación con los niveles de pre-miRNA Control. En el caso del miR-200c no encontramos diferencias significativas (Figura 45).

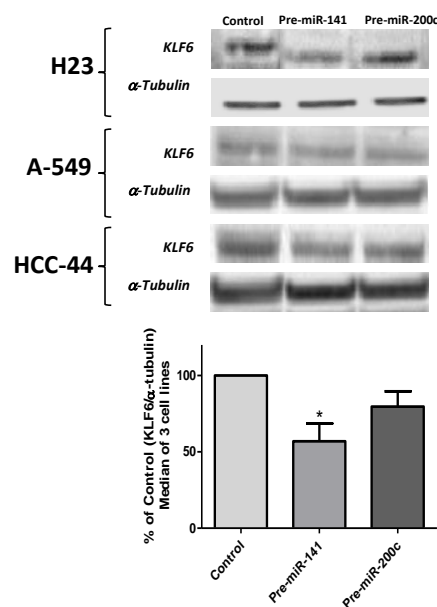


Figura 45. Niveles de proteína de KLF6 y alfa-tubulina mediante Western Blot de la línea H23 transfectadas con pre-miR-200c, pre-miR-141 y pre-miR Control.

Se conoce que KLF6 regula la expresión y la secreción de VEGFA, un factor crítico en la angiogénesis. Examinamos el efecto del incremento de la expresión de miR-141 en el los niveles de VEGFA. En primer lugar sobreexpresamos ambos miRNAs en las células H23, A-549 y HCC-44 mediante el uso de pre-miRNAs previamente mencionados. En segundo lugar, transcurrido 24 horas tras la transfección, las células fueron tratadas con el DFX, un fármaco que produce hipoxia. Después de 24 horas de tratamiento bajo condiciones de hipoxia, analizamos los niveles de VEGFA en el sobrenadante de las células mediante un kit de ELISA donde observamos que la sobreexpresión de miR-141 produjo un incremento del nivel de VEGFA en las tres líneas celulares de pulmón, H23 (P=0,04), A-549 (P=0,03) y HCC-44 (P=0,02)

mientras que el miR-200c no indujo diferencias significativas en la línea celular H23 y A-549, pero si que observamos un incremento significativo del VEGFA en la línea celular HCC-44 (P=0,04) (Figura 46).

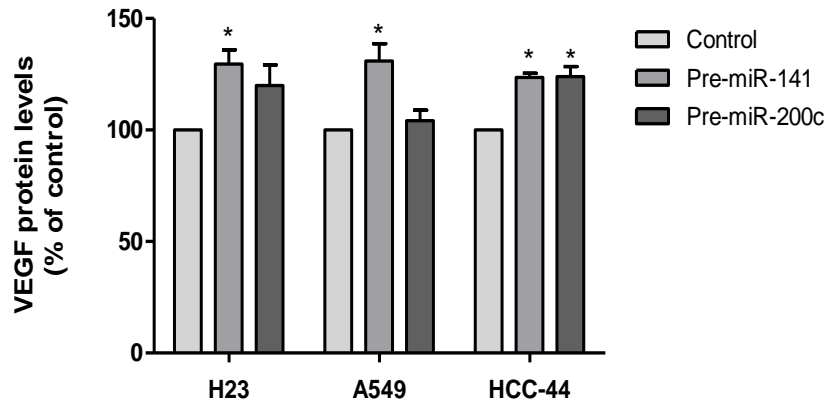


Figura 46. Niveles de proteína VEGFA en el sobrenadante de cultivo de la línea H23, A-549 y HCC-44 transfectada con el pre-miR-200c, pre-miR-141 y pre-miR-Control y tratadas posteriormente con DFX.

Finalmente analizamos la relación entre los niveles de miR-141 y la densidad de vasos sanguíneos en el tejido tumoral. Realizamos el conteo de números de vasos sanguíneos con el marcador CD34 (marcador de endotelio) por inmunohistoquímica. Se evaluaron 29 pacientes que presentaban nivel alto o bajo de miR-141. Obtuvimos que los pacientes con nivel alto de miR-141, presentaban un 22% más de vasos sanguíneos que los tumores con niveles bajos (P<0,001, Figura 47).

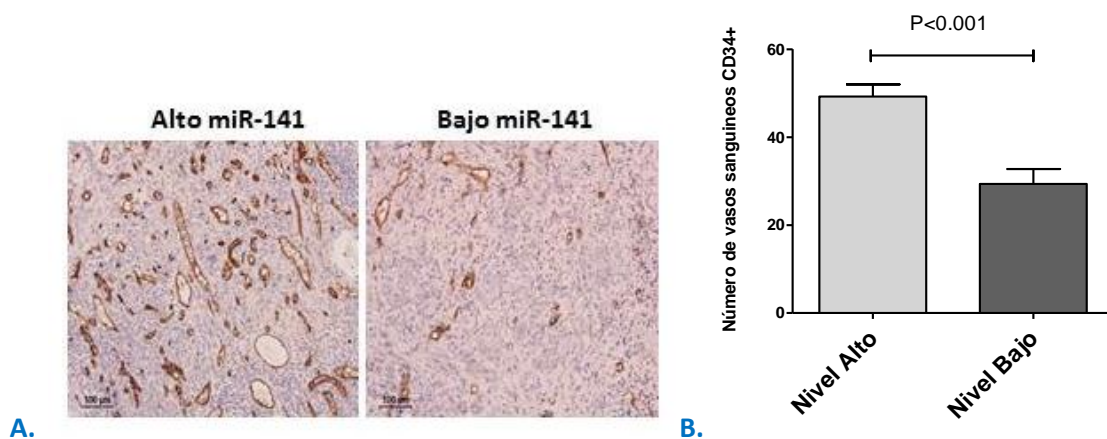


Figura 47. Número de vasos sanguíneos en tejido tumoral y su asociación con el miR-141.

A. Inmunohistoquímica de dos casos representativo de nivel alto o bajo de miR-141. **B.** Media de número de vasos sanguíneos evaluados en cuatro campos a 200x en pacientes con niveles alto o bajo de miR-141.

Análisis multivariado

En el análisis multivariado de la supervivencia global de toda la cohorte de pacientes, incluimos todos los factores clínicos y biológicos que presentaban una $P \leq 0,1$ y el score de riesgo fue basado en la expresión de miR-141 y miR-200c. El score de riesgo de miR-141/miR-200c (riesgo alto versus otros) fue identificado como marcador de pronóstico independiente en la SG (SG, 2,787; 95% IC=1,087-7,148; $P=0,033$) junto con estadio > 1 y edad > 65 años (Tabla 16).

En el análisis multivariado de los pacientes con grupo histológico adenocarcinoma, el score de riesgo de miR-141/200c también se identificó como factor pronóstico independiente para la SG (SG, 10,649; 95% IC=2,433-46,608; $P=0,002$) junto con los mayores de 65 años (Tabla 16).

Serie completa		
OS	OR (95% IC)	P
Sexo masculino	2,773 (0,949-8,100)	0,062
Estadio > 1	2,58 (1,178-5,494)	0,017
Edad > 65	2,629 (1,374-5,029)	0,003
Riesgo alto miR-141/miR-200c	2,787 (1,087-7,148)	0,033
Adenocarcinoma		
OS	OR (95% IC)	P
Edad > 65	3,693 (1,420-9,601)	0,007
Riesgo alto miR-141/miR-200c	10,649 (2,433-46,608)	0,002

Tabla 16. Análisis multivariado mediante regresión de COX de toda la cohorte (N = 155) y del subgrupo de pacientes con adenocarcinoma (N = 73).

2. Resultados en el estudio de la familia miR-200 en el tratamiento con fluoropimidinas en pacientes quirúrgicos de CCR.

Expresión de la familia miR-200 y características clínicas

Evaluamos los niveles de expresión de todos los miembros de la familia miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429) en tejido tumoral y normal en una serie de 127 pacientes de CCR. Encontramos que la expresión fue más alta en las muestras tumorales respecto a las muestras normales (miR-200a, $P < 0,001$; miR-200b, $P < 0,001$; miR-429, $P < 0,001$; miR-200c, $P < 0,001$ y miR-141, $P = 0,036$; Figura 48).

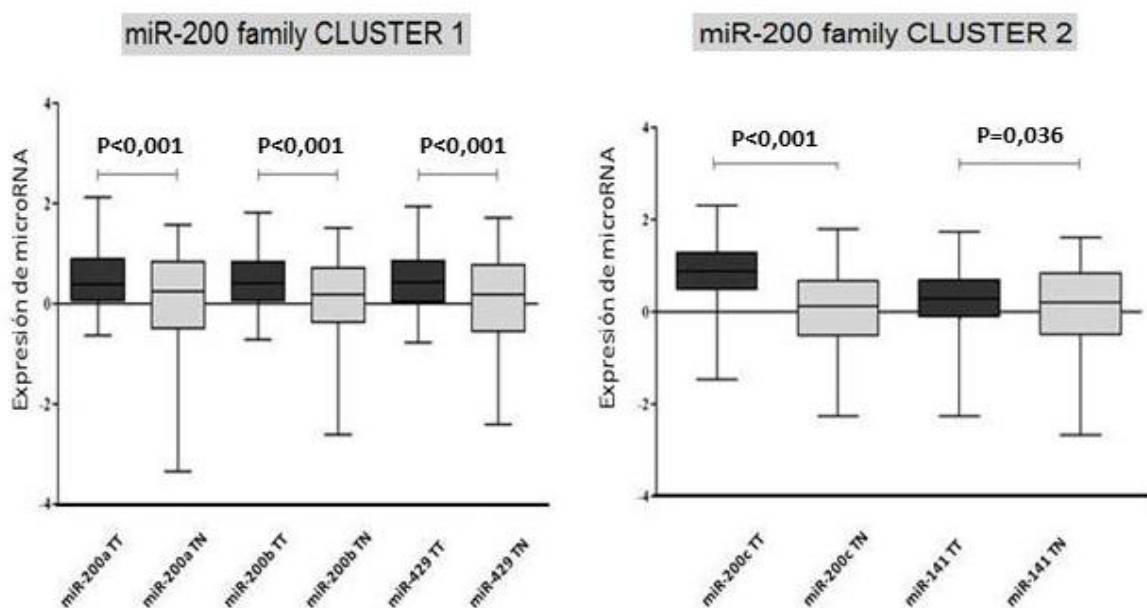


Figura 48. Expresión de la familia miR-200 en tejido tumoral y tejido normal en 127 pacientes de CCR. Se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las diferencias se calcularon mediante la prueba t-Student pareado.

Seguidamente trabajamos con los diferentes estadios (1, 2 y 3) de toda la cohorte, observamos que los pacientes con estadio 1 presentaban niveles más bajos que aquellos pacientes que tenían estadio 2 y 3 (miR-200a, $P = 0,003$; miR-200b, $P = 0,003$; miR-429, $P = 0,042$; miR-200c, $P = 0,009$; miR-141, $P = 0,076$; Figura 49). La expresión de los cinco miembros de la familia miR-200 correlacionaron positivamente con los niveles de expresión de E-cadherina ($P < 0,001$).

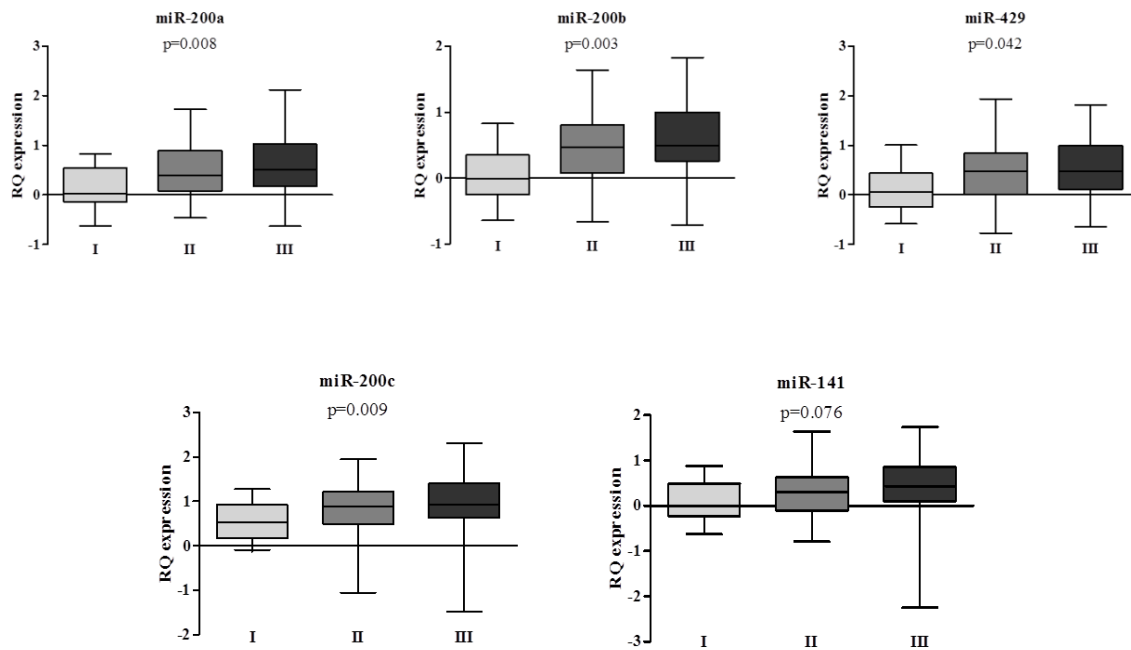


Figura 49. Expresión de la familia miR-200 dependiendo del estadio en una serie de 127 pacientes de CCR. Se calculó por el método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Las diferencias se calcularon por una prueba Anova.

Los miembros de la familia miR-200 como marcadores de pronóstico

Los puntos de corte fueron determinados con el paquete MaxStat del programa R y clasificamos los pacientes con nivel alto o bajo de expresión de los cinco miembros de la familia miR-200. Encontramos que los pacientes con niveles altos de miR-200a, miR-200c y miR-429 se asociaban a una mejor supervivencia global. El tiempo medio de supervivencia global fue de 95,4 meses en aquellos pacientes que presentaban niveles altos de miR-200a en comparación a 87 meses que mostraron los pacientes con niveles bajos de miR-200a ($P=0,027$). En el caso del miR-200c, encontramos una supervivencia global de 97,8 meses en aquellos que presentaban niveles altos en comparación a 87 meses en aquellos que presentaban niveles bajos ($P=0,042$). En el miR-429, la media de supervivencia global en niveles altos fue de 96,4 meses en comparación a 71,2 meses ($P=0,001$) (Figura 50).

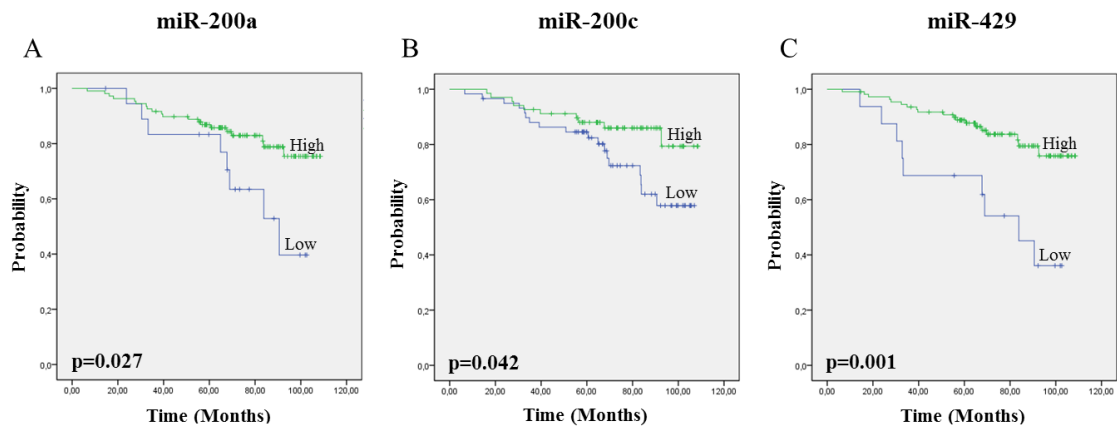


Figura 50. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200a (A), miR-200c (B) y miR-429 (C) en toda la población de estudio.

Para la supervivencia libre de enfermedad, solo encontramos que los pacientes con niveles altos de miR-429 presentaban un diferencia significativa ($P < 0,001$) cosa que en los otros dos miembros de la familia miR-200 anteriormente comentados no se observó (miR-200a, $P = 0,087$; miR-200c, $P = 0,073$; Figura 51).

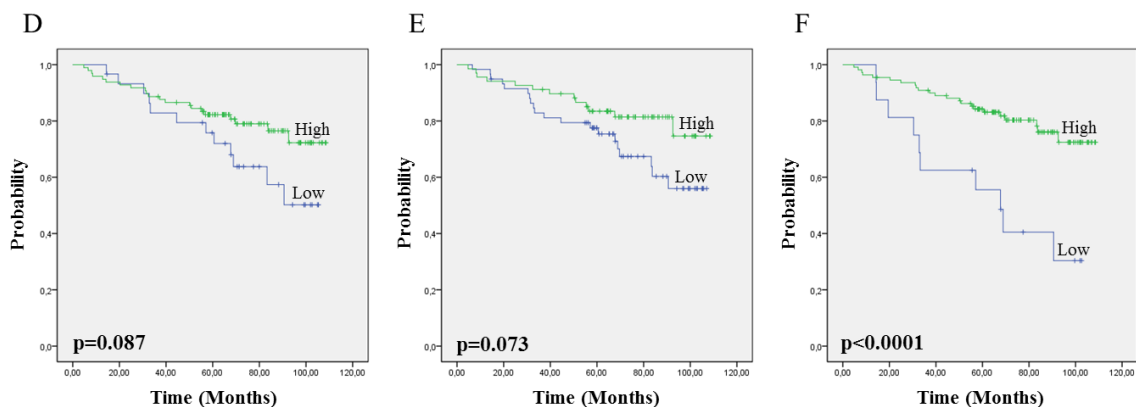


Figura 51. Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200a (D), miR-200c (E) y miR-429 (F) en toda la población de estudio.

A continuación los pacientes fueron clasificados dependiendo del tratamiento que habían, de la cohorte total, 56 pacientes fueron tratados con fluoropirimidas. Al trabajar con este grupo de pacientes mantuvimos las diferencias significativas de los miembros anteriormente mostrados, miR-200a ($P = 0,01$), miR-200c ($P = 0,011$) y miR-429 ($P < 0,001$), además de encontrar también diferencias significativas en el miR-141 ($P = 0,023$). Observamos que los pacientes que presentaban niveles altos de estos miRNAs se asociaban a una mejor supervivencia global (Figura 52).

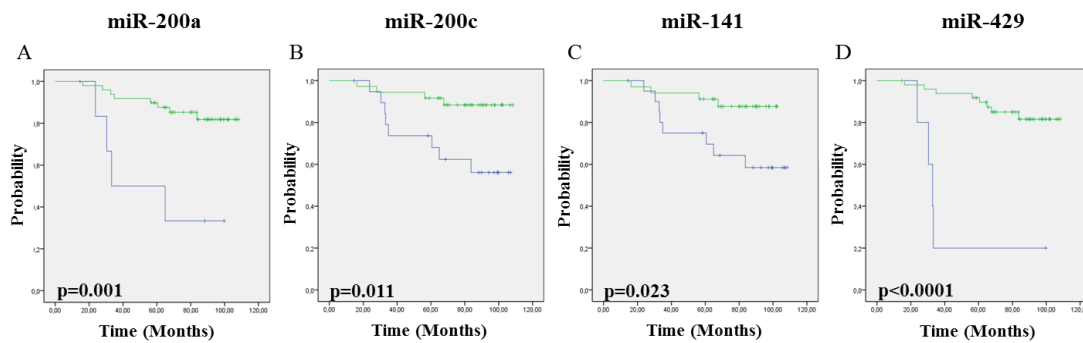


Figura 52. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200a (A), miR-200c (B), miR-141 (C) y miR-429 (D) en el grupo de pacientes tratados con fluoropirimidinas. Color verde: niveles altos y color azul: niveles bajos de miRNA.

Para la supervivencia libre de enfermedad, encontramos diferencias significativa en los miembros anteriormente mostrados, miR-200a ($P=0,022$), miR-200c ($P=0,019$) y miR-429 ($P<0,001$), además de encontrar también diferencias significativas en el miR-141 ($P=0,040$) (Figura 53).

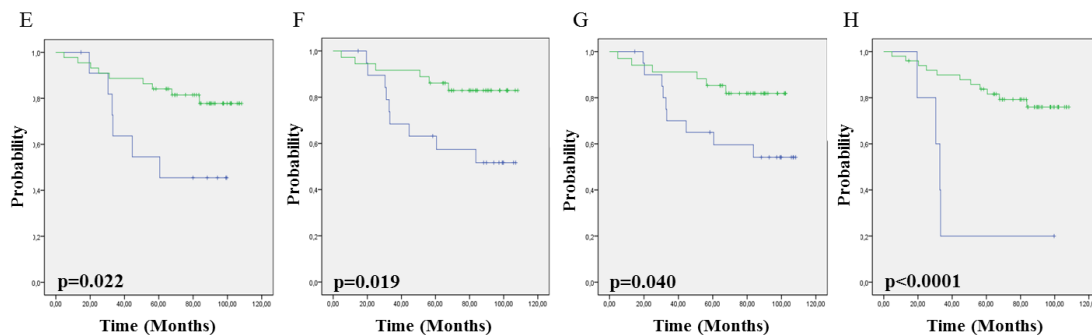


Figura 53. Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200a (E), miR-200c (F), miR-141 (G) y miR-429 (H) en el grupo de pacientes tratados con fluoropirimidinas. Color verde: niveles altos y color azul: niveles bajos de miRNA.

A pesar de estos resultados, en el subgrupo de pacientes tratados con XELOX o en aquellos pacientes que no recibían tratamiento adyuvante no se observó correlación entre supervivencia y niveles de expresión de estos miRNAs.

Finalmente, los niveles altos de miR-200a, miR-200c, miR-141 y miR-429 también fueron asociados con supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad en el subgrupo de 32 pacientes con estadio 2 tratados con fluoropirimidinas.

En este subgrupo encontramos que la media de supervivencia global fue de 100,9 meses en los pacientes que presentaban niveles altos de miR-200a en comparación a 54,4 meses observados en aquellos pacientes con nivel bajo ($P=0.003$). En el caso del miR-429 la media de supervivencia global fue de 103,5 meses en los pacientes con nivel alto en comparación a 49,1 meses observado en los pacientes con nivel bajo ($P<0,001$). La media de supervivencia global de miR-200c ($P=0,001$) y miR-141 ($P=0,001$) no pudo ser calculada porque todos los casos fueron censurados (Figure 54).

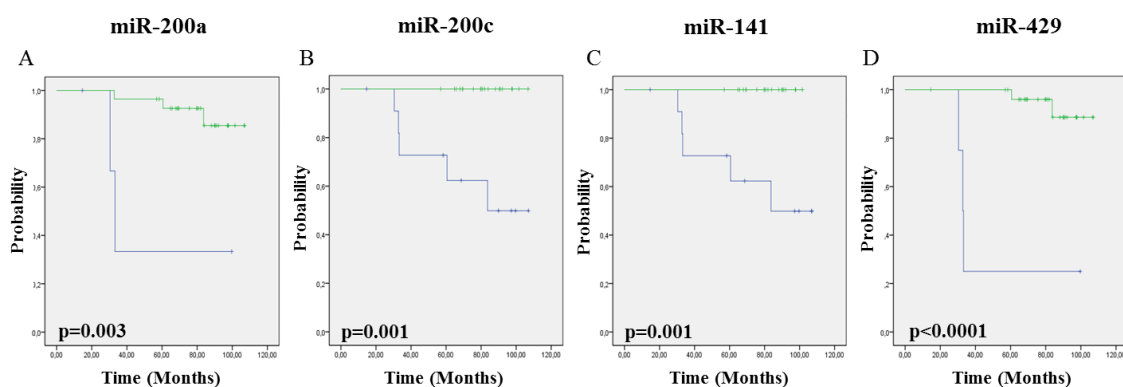


Figura 54. Supervivencia global de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200a (A), miR-200c (B), miR-141 (C) y miR-429 (D) en el grupo de pacientes con estadio 2 y tratados con fluoropirimidinas. Color verde: niveles altos y color azul: niveles bajos de miRNA.

La media de supervivencia libre de enfermedad fue de 102,3 meses en los pacientes que presentaban niveles altos de miR-200a en comparación a 59,4 meses observados en aquellos pacientes con nivel bajo ($P<0,001$). En el caso del miR-429 la media de supervivencia libre de enfermedad fue de 100,7 meses en los pacientes con nivel alto en comparación a 49,1 meses observado en los pacientes con nivel bajo ($P<0,001$). La media de supervivencia libre de enfermedad de miR-200c ($P=0,001$) y miR-141 ($P<0,001$) no pudo ser calculada porque todos los casos fueron censurados (Figura 55).

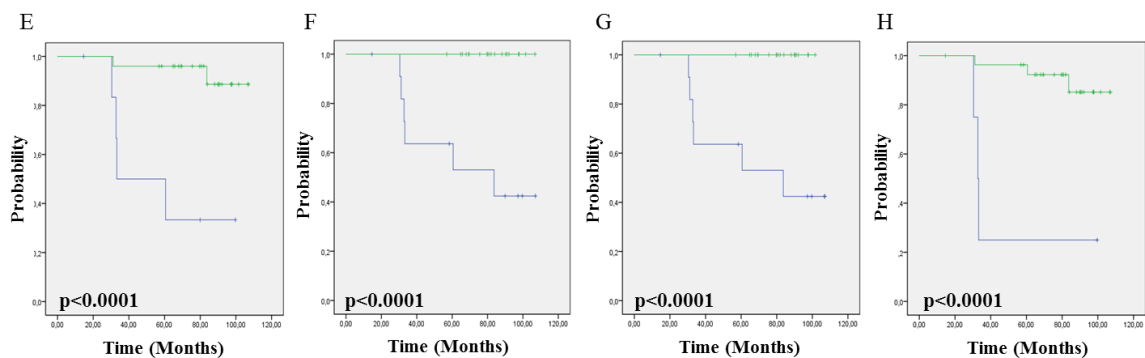
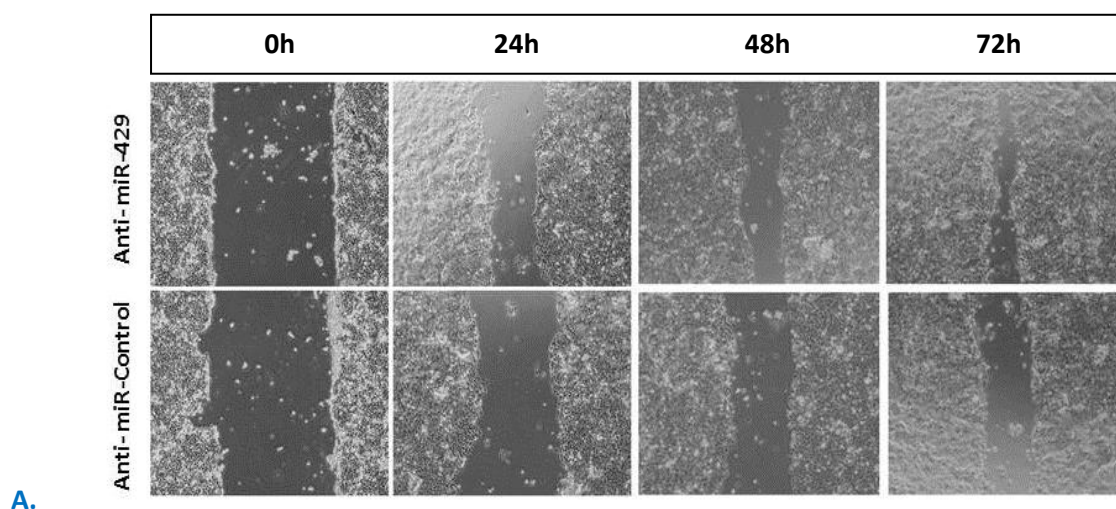
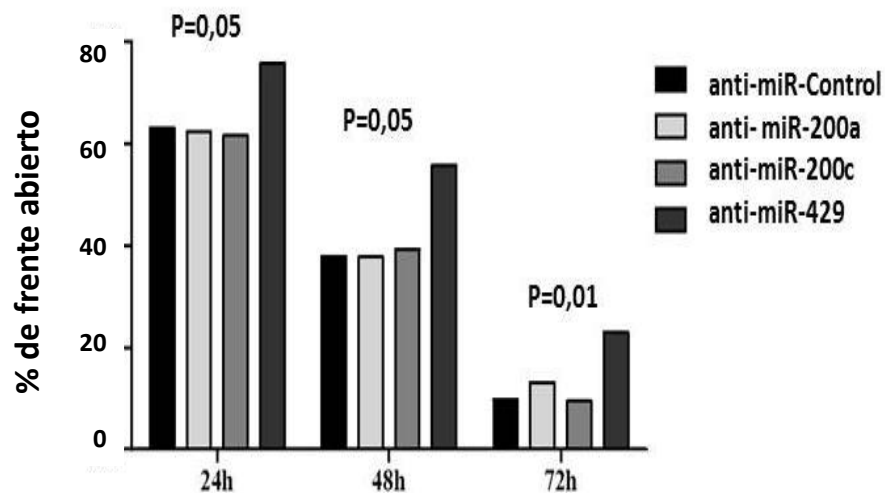


Figura 55. Supervivencia libre de enfermedad de acuerdo a los niveles de expresión de miR-200a (E), miR-200c (F), miR-141 (G) y miR-429 (H) en el grupo de pacientes con estadio 2 y tratados con fluoropirimidinas. Color verde: niveles altos y color azul: niveles bajos de miRNA.

La infraexpresión de miR-429 promueve la invasión celular

La invasión celular fue evaluada en la línea celular LOVO mediante el método *scratch*. La línea celular fue transfectada con el anti-miR-200a, anti-miR-200b, anti-miR-429 y anti-miR-Control. Después de 72h post-transfección, las células que había sido transfectadas con el anti-miR-429 mostraron un alta invasión celular en comparación al efecto producido por el anti-miR-Control (P=0,01) (Figura 56). En el caso de anti-miR-200a y anti-miR-200c no encontramos diferencias significativas en la invasión celular.





B.

Figura 56. Efectos del miR-429 en la invasión celular. A. Imagen representativa de dos experimentos independientes de un *scratch* a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas después de transfectar con el anti-miR-429 y anti-miR-Control. B. Porcentaje de frente abierto observado después de transfectar tres ensayos independientes a las 24, 48 y 72 horas.

La sobreexpresión de miR-429 combinado con el tratamiento de 5-FU inhibe la invasión celular

La expresión de los niveles de miR-429 aumentó considerablemente 24h después de transfectar las células con el pre-miR-429 en comparación con los niveles obtenidos cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-Control (Figura 57).

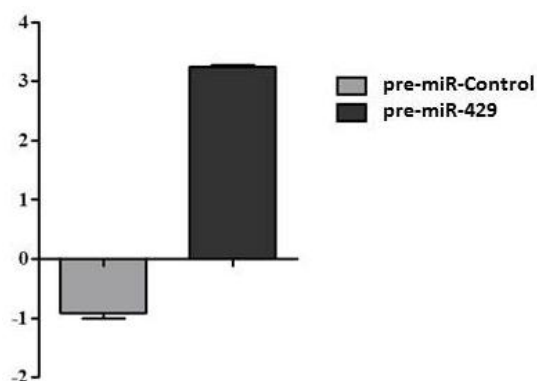


Figura 57. Niveles de miR-429 evaluado después de 24h de transfectar la línea celular LOVO con el pre-miR-429 y pre-miR-Control.

Cuando las células fueron transfectadas con el pre-miR-429 y el pre-miR-Control se observó que las células transfectadas con el pre-miR-429 mostraron una menor invasión en el método *scratch* que al utilizar el anti-miR-429, pero no se describieron diferencias significativas cuando se compararon con las células transfectadas con el pre-miR-Control ($P=0,06$) (Figura 58).

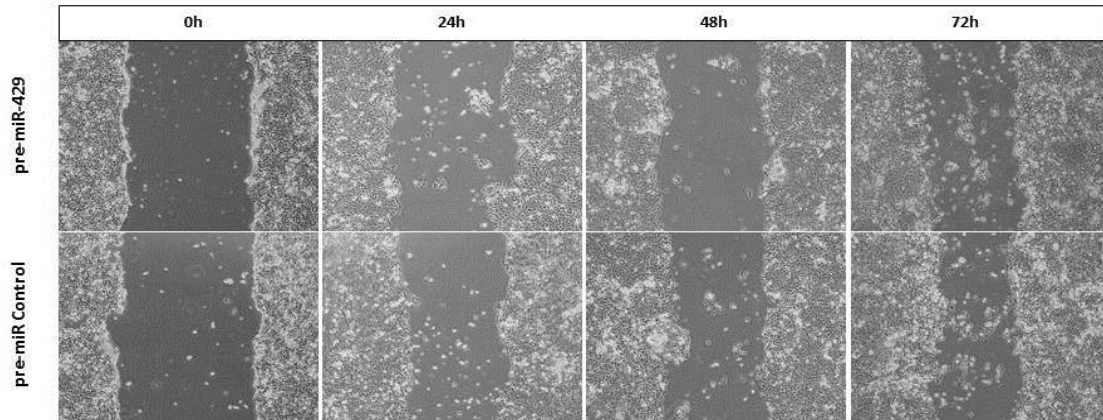


Figura 58. Efectos del pre-miR-429 en la invasión celular. Imagen representativa de dos experimentos independientes de un *scratch* a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas después de transfectar con el pre-miR-429 y pre-miR-Control.

Además observamos que las células transfectadas con el pre-miR-429 combinado con el tratamiento 5-FU mostraron menos invasión en el método *scratch* que las líneas celulares transfectadas con el pre-miR-Control combinado con tratamiento de NH_4OH ($P=0,001$) (Figura 59).

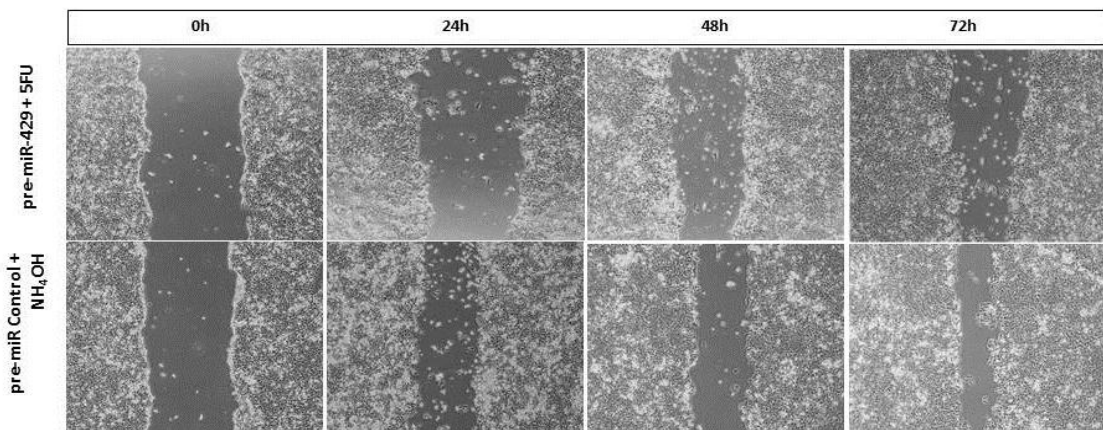


Figura 59. Efectos del pre-miR-429 en la invasión celular. Imagen representativa de dos experimentos independientes de un *scratch* a tiempo 0, 24, 48 y 72 horas después de transfectar con el pre-miR-429 + 5-FU y pre-miR-Control + NH_4OH .

Análisis multivariado

En el análisis multivariado de COX para la supervivencia global y la supervivencia libre de enfermedad incluimos todos los factores clínicos y biológicos que presentaban una $P \leq 0,1$ (Tabla 17).

Serie Completa		
OS	OR (95% IC)	P
Niveles de CEA > 5	2.286 (1,264-9,805)	0,016
Invasión Perilinfática	5.595 (1,165-22.487)	0,031
Pólipos pre-existente	5.117 (1.402-8.938)	0,007
Niveles bajos de miR-429	3.540 (12.355-19.040)	<0,001
SLE	OR (95% IC)	P
Niveles de CEA > 5	3.050 (1,257-7.400)	0,014
Invasión Perilinfática	4.758 (1,530-14.799)	0,007
Invasión Perineural	4.313 (1.057-17.597)	0,042
Pólipos pre-existente	2.744 (1.178-6.390)	0,019
Niveles bajos de miR-429	5.884 (2.283-15.166)	<0,001
Pacientes tratados con fluoropirimidinas		
OS	OR (95% IC)	P
Pólipos pre-existente	4.891 (1.340-17.851)	0,016
Niveles bajos de miR-429	17.675 (3.849-81.161)	<0,001
SLE	OR (95% IC)	P
Niveles de CEA > 5	3.050 (1,257-7.400)	0,014
Edad > 67 años	3.326 (1.007-10.993)	0,049
ECOG PS 2	5.792 (1.948-17.218)	0,002
Pacientes de estadio 2 tratados con fluoropirimidinas		
OS	OR (95% IC)	P
Niveles bajos de miR-429	0,005 (2.708-300.254)	0,005

Tabla 17. Análisis multivariado de la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad mediante regresión de COX de toda la cohorte (N=127), del grupo de pacientes tratados con fluoropirimidinas (N=56) y del grupo de pacientes de estadio 2 tratados con fluoropirimidinas (N=32).

DISCUSIÓN

5. Discusión

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA que participan en la regulación génica. Un único miRNA puede modular los niveles de múltiples proteínas dependiendo de la complementariedad con los diferentes RNAs mensajeros y sus efectos son dependientes de la expresión de la proteína en cada tipo celular [155]. Los miembros de la familia miR-200 se encuentran localizados en dos cromosomas diferentes: miR-200a, miR-200b y miR-429 en el cromosoma 1 y miR-141 y miR-200c se localizan en el cromosoma 12, estos dos *clusters* comparten el mismo origen de transcripción y son regulados transcripcionalmente por *OCT4* [254]. Hemos de tener en cuenta que los miembros de la familia miR-200 dependiendo de su *seed-sequence* también se clasifican en dos grupos diferentes: por un lado encontramos el miR200b/c y miR-429 y por otro lado el miR-200a y el miR-141, que difieren en un único nucleótido de la *seed-sequence* (U por C). Aunque estos miembros son transcripcionalmente regulados por una misma vía, ellos difieren en sus dianas.

La familia miR-200 fue descubierta por su implicación en los procesos de la TEM y la TME. La sobreexpresión de los miembros de la familia miR-200 inhibe la expresión de ZEB1/ZEB2 dejando libre el promotor de la síntesis de E-cadherina, que favorece el incremento de las adhesiones intercelulares y diferenciación celular [220, 221]. Durante el desarrollo del tumor, las células epiteliales normales adquieren características mesenquimales a través del TEM. La infraexpresión de los miembros de la familia miR-200 facilita la metástasis en algunos tumores [224]. La inducción de la TME por la sobreexpresión de los miembros de la familia miR-200 se ha visto que es importante en el último paso del proceso metastásico. Mientras la TEM permite la migración de las células del tumor primario, la TME permite la colonización y metástasis en diversos órganos [255, 256]. Así, tanto la infraexpresión como la sobreexpresión de los miembros de la familia miR-200 han sido relacionadas con peor pronóstico dependiendo del tipo tumoral.

La infraregulación de la familia miR-200 ha sido asociada con mal pronóstico en cáncer ovárico [240], cáncer renal [257] y cáncer colorrectal [233]. Por otra parte, experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* han mostrado que niveles altos de miR-200c reducen la invasión y la metástasis [258]. Por lo contrario, también se ha descrito que la sobreexpresión de los miembros de la familia miR-200 permiten incrementar la metástasis en los modelos de cáncer de mama [253] donde la sobreexpresión se ha asociado con mal pronóstico [252].

Discusión del papel de la familia miR-200 en pacientes de CPCNP

En el estudio de la familia miR-200 en CPCNP encontramos que niveles altos de miR-141 y miR-200c se asocian con una peor supervivencia global. Con el fin de investigar si la regulación de la TEM por miR-141 y miR-200c es histológicamente dependiente, se examinó el valor pronóstico en dos de los mayores grupos histológicos dentro del CPCNP. Nuestros hallazgos demuestran que en el grupo histológico adenocarcinoma los pacientes que presentaban niveles altos de miR-141 y miR-200c se asocian con una peor supervivencia global. En línea con nuestros resultados, la sobreexpresión de miR-200c como marcador de mal pronóstico fue previamente reportado en un trabajo de 70 muestras de CPCNP que incluían ambos grupos histológicos [236], pero no se mostraron los resultados de pronóstico seleccionando, solo el grupo histológico adenocarcinoma. En oposición a nuestros resultados, un trabajo reciente publicado sobre la familia miR-200, donde se ha trabajado con datos extraídos de una base online TCGA database, reporta que niveles bajos de miR-200b*, miR-200a y miR-429 se relacionan con una peor supervivencia global en un grupo de pacientes con CPCNP donde incluyeron pacientes metastásicos [259].

A partir de estos primeros hallazgos hemos analizado el papel de miR-141 y miR-200c en el proceso de TEM y TME en tres líneas celulares de CPCNP, la H23, la A-549 y la HCC-44. Con los experimentos realizados observamos que el miR-200c reducía la migración de las tres líneas celulares de manera significativa una vez la transfectamos con el pre-miRNA correspondiente en comparación con un pre-miRNA Control. La sobreexpresión de miR-200c también aumento los niveles de proteína de E-cadherina. Con estos resultados pudimos determinar que el miR-200c intervenía en la TME y aunque el miR-141 es un miembro de la familia miR-200, este miRNA en nuestro estudio no lo encontramos relacionado en la TEM/TME. Recientes estudios en cáncer de mama han mostrado también que la sobreexpresión de miR-200c conduce a la metástasis [253], por tanto esto podría reforzar nuestros hallazgos.

Mediante la herramienta bioinformática TargetScan, encontramos que el mRNA de KLF6 podría ser una diana putativa de miR-141. La sobreexpresión de miR-141 en las líneas celulares H23, A-549 y HCC-44 promovió una reducción de los niveles proteicos de *KLF6*. Además, se observó un incremento de la secreción de VEGFA en el sobrenadante del cultivo de las líneas celulares. En base a estos resultados, decidimos evaluar el número de vasos sanguíneos en el tejido tumoral de pacientes con niveles altos o bajos de miR-141 por inmunohistoquímica, donde observamos que aquellos tumores con mayor expresión de este miRNA presentaban un

número significativamente superior de vasos. Por tanto nuestros hallazgos nos indican que el miR-141 interviene en procesos de angiogénesis por su regulación de *KLF6*, secretando así más VEGFA y produciendo más vasos sanguíneos, generando unas condiciones favorables para el crecimiento tumoral e invasión. En un estudio con fibroblastos asociados a cáncer (FACs) aislados de pulmones de ratones con adenocarcinoma que presentan niveles altos de los miembros de la familia miR-200, se observó que estos secretaban abundante VEGF ayudando así a una mayor invasión *in vitro* [258]. Cuando analizamos la expresión de los niveles de miR-141 en las muestras de tejido tumoral y normal, no observamos diferencias significativas en los niveles de expresión, permitiéndonos especular que el papel pronóstico de miR-141 podría estar relacionado con la expresión de este en los FACs y no en las células tumorales. Concluyendo que la sobreexpresión de miR-141 conduciría a la sobreproducción de VEGFA y el incremento de la neoangiogénesis, lo cual se ha relacionado anteriormente con peor pronóstico en CPCNP [260].

Discusión del papel de la familia miR-200 en pacientes de CCR

En el estudio de la familia miR-200 en CCR hemos encontrado que los miembros de la familia miR-200 se encuentran sobreexpresados en el tejido tumoral cuando lo comparamos con el tejido normal. Estos resultados son similares a los previamente publicados en otros trabajos en cáncer de vejiga [261] y en cáncer de endometrio [262].

Cuando evaluamos la supervivencia global y supervivencia libre de enfermedad, observamos que los pacientes con niveles altos de miR-200a, miR-200c y miR-429 presentaban mejor pronóstico, estos hallazgos nos hicieron relacionar estos miRNAs directamente con su participación en el proceso TEM/TME. También observamos que los pacientes de estadio I tenían niveles mas bajos de miR-200 que aquellos pacientes con estadios II y III, indicando que mientras las células en estadios I aun predominan con características más mesenquimatosas, en cambio en el estadio II y III, las células tumorales pueden volver a recuperar sus características más epiteliales.

Si bien, el mecanismo de acción de estos RNAs no esta del todo descrito, estudios previos *in vitro* demuestran que no solo regulan la síntesis de E-cadherina, sino que también están involucrados en la regulación de diversos genes, como el WNT/ β -catenina o ZEB1 [263]. Estos resultados nos podrían indicar que esta familia de miRNAs podría regular el crecimiento celular y la diferenciación, pudiendo actuar como supresores tumorales.

Las fluoropirimidinas, son los fármacos que más se usan como tratamiento adyuvante en los pacientes con estadio II y III en cáncer colorrectal. De forma relevante hemos observado que la correlación entre los niveles de expresión y supervivencia se sigue manteniendo en aquellos pacientes tratados con fluoropirimidinas. Cuando se analizó lo mismo con el subgrupo de pacientes de estadio II tratados con fluoropirimidinas, miR-200a y miR-429 seguían manteniendo su significancia y sentido pronóstico, lo que podría indicar que estos miembros de la familia miR-200 podrían ser marcadores para pacientes susceptibles de ser tratados con fluoropirimidinas. Cuando se trabajó con el subgrupo de pacientes que habían recibido XELOL como tratamiento adyuvante no se encontró correlación entre la expresión de los niveles de miRNA y supervivencia.

Es interesante destacar, que en el análisis multivariado, solo se identificó como factor pronóstico el miR-429, sugiriendo que este podría tener una relación con la supervivencia de los pacientes con cáncer colorrectal tratados con fluoropirimidinas. Realizamos un estudio *in vitro* con la línea celular LOVO, observamos que la disminución de miR-429 aumentaba las propiedades invasivas de las células LOVO, mientras que disminuía esta capacidad la sobreexpresión de este miRNA. El tratamiento 5-FU es uno de los tratamientos más estándar, este contribuye en la disrupción de la síntesis de RNA y la síntesis de timidina, permitiendo una degradación de la proliferación celular [264]. *In vitro*, este efecto apoptótico del 5-FU, combinado con niveles elevados de miR-429 mostró un potente inhibidor de la invasión celular, suponiendo la base para una medicina más personalizada en el tratamiento de pacientes con cáncer colorrectal.

Discusión conjunta: análisis de la implicación de la familia miR-200 en dos modelos tumorales diferentes

El objetivo principal de este estudio fue analizar el papel de la familia miR-200 en dos modelos tumorales diferentes. Para ello escogimos dos tipos de cáncer de origen endodérmico como el colorrectal y cáncer de pulmón. Los dos modelos se caracterizan por el crecimiento incontrolado de las células anormales desde un inicio. En los trabajos realizados hemos encontrado resultados controvertidos al analizar el pronóstico de la expresión de la familia miR-200 en los dos tipos de cáncer. Estos resultados indican que diferentes mecanismos pueden estar involucrados en el efecto de esta familia de miRNAs.

En el estudio de la serie de CCR, los hallazgos encontrados nos determinan que los miembros de la familia miR-200 están implicados en el proceso TEM, donde los niveles altos se relacionaron con mejor pronóstico, ya que estos niveles altos permitían inhibir ZEB1 y ZEB2, así dejaban al promotor de la E-Cadherina que siguiera produciendo proteína y se encargara de el incremento de las adhesiones intercelulares y diferenciación celular. En el estudio de la serie de CPCNP, encontramos que uno de los miembros se relaciona con el proceso de la TME, pero el otro miembro de estudio, nos muestra que esta implicado en la angiogénesis, generando unas condiciones favorables para la progresión tumoral e invasión.

En conclusión vemos que dos tumores de origen endodérmico, como el cáncer colorrectal y el cáncer de pulmón, que presentan un mecanismo carcinogénico inicial parecido, el mecanismo de determinados RNAs pueden ser diferentes. El estudio de esta familia así como de sus moléculas dianas nos puede llevar a una mejor comprensión de los modelos tumorales, y probablemente la búsqueda de terapias contra esta familia de miRNAs y utilizar estos miRNAs como arma terapéutica contra el cáncer.

CONCLUSIONES

6. Conclusiones

1. En el CPCNP los niveles de los miembros de la familia miR-200, excepto el miR-141, disminuyen en el tejido tumoral en comparación con su tejido normal.
2. Los niveles altos de miR-200c discriminan un grupo de pacientes de CPCNP con menor supervivencia global.
3. En los pacientes de CPCNP con estadio I, que no reciben tratamiento adyuvante después de cirugía, niveles altos de miR-141 y miR-200c identifican un grupo con menor supervivencia global.
4. El estudio según grupo histológico, muestra que el papel pronóstico de miR-141 y miR-200c es exclusivo en los adenocarcinomas con CPCNP.
5. El análisis de la supervivencia global en el estudio conjunto de miR-200c y miR-141 en los pacientes de CPCNP permite identificar tres grupos de pacientes: con riesgo bajo de recaída (con niveles bajos de ambos miRNAs), con riesgo medio de recaída (cuando los niveles de un microRNA u otro son altos) y pacientes con riesgo alto de recaída (con niveles altos de ambos miRNAs).
6. En líneas celulares de CPCNP, miR-200c regula la migración celular y miR-141 regula la angiogénesis.
7. En el CCR los niveles de todos los miembros de la familia miR-200, aumentan en el tejido tumoral en comparación a su tejido normal.
8. Los niveles de miR-200a/b y miR-429 correlacionan de forma positiva con los estadios tumorales en los pacientes con CCR.
9. Los pacientes de CCR con niveles bajos de expresión de miR-200a/c/ y miR-429, presentan una menor supervivencia libre de enfermedad y una menor supervivencia global que los pacientes con altos niveles de expresión.

10. El subgrupo de pacientes de CCR tratados con fluoropirimidinas y que expresan niveles bajos de miR-200a/c/, miR-429 y miR-141 presentan una menor supervivencia libre de enfermedad y una menor supervivencia global que los pacientes con altos niveles de expresión.

11. El subgrupo de pacientes de CCR con estadio II tratados con fluoropirimidinas y con bajos niveles de expresión de miR-200a/c/141 y miR-429 presentan una menor supervivencia libre de enfermedad y una menor supervivencia global que los pacientes con altos niveles de expresión. Estos pacientes podrían ser susceptibles de recibir un tratamiento alternativo.

12. En líneas celulares de CCR los niveles bajos de miR-429 promueven la invasión celular.

13. Los miembros de la familia miR-200 tienen comportamiento distinto según el tipo tumoral.

BIBLIOGRAFÍA

7. Bibliografía

1. Michael Schünke, E.S., Udo Schumacher, *Prometheus. Texto y Atlas de Anatomía*. 2009.
2. Siegel, R., et al., *Cancer statistics, 2014*. CA: a cancer journal for clinicians, 2014. 64(1): p. 9-29.
3. Howlader, N., A. Noone, and M. Krapcho, *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2010*. [Based on the November 2012 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2013.]. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2013.
4. Altekruse, S., et al., *SEER Cancer Statistics Review, 1975–2007*. National Cancer Institute. 2010. Accessed 07/20/2010. seer. cancer. gov/csr.
5. Egleston, B.L., et al. *Population-based trends in lung cancer incidence in women*. in *Seminars in oncology*. 2009: NIH Public Access.
6. Kligerman, S. and C. White, *Epidemiology of lung cancer in women: risk factors, survival, and screening*. American Journal of Roentgenology, 2011. 196(2): p. 287-295.
7. Fox, J., C. Richards, and R. Moolenaar, *Racial/Ethnic disparities and geographic differences in lung cancer incidence-38 states and the District of Columbia, 1998-2006*. Center for Disease Control and Prevention Morbidity and Mortality Weekly Report. Atlanta, GA: Center for Disease Control and Prevention, 2010: p. 1433-1470.
8. Reif, M.S., M.A. Socinski, and M.P. Rivera, *Evidence-based medicine in the treatment of non-small-cell lung cancer*. Clinics in chest medicine, 2000. 21(1): p. 107-120.
9. Lin, R.-K., et al., *The tobacco-specific carcinogen NNK induces DNA methyltransferase 1 accumulation and tumor suppressor gene hypermethylation in mice and lung cancer patients*. The Journal of clinical investigation, 2010. 120(2): p. 521.
10. Denissenko, M.F., et al., *Preferential formation of benzo [a] pyrene adducts at lung cancer mutational hotspots in P53*. Science, 1996. 274(5286): p. 430-432.
11. Smith, C., et al., *"IARC group 2A Carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke*. Food and Chemical Toxicology, 2000. 38(4): p. 371-383.
12. Smith, C., et al., *"IARC Group 2B carcinogens" reported in cigarette mainstream smoke*. Food and Chemical Toxicology, 2001. 39(2): p. 183-205.
13. Hoesein, F.A.M., et al., *Variants in the 15q24/25 locus associate with lung function decline in active smokers*. PLoS One, 2013. 8(1): p. e53219.
14. S.L, E.J.i.T., ed. *Cáncer de pulmón, panorámica de este problema sanitario*. 2006, Roche Farma S.A.: Madrid.
15. Vineis, P., et al., *Tobacco and cancer: recent epidemiological evidence*. Journal of the National Cancer Institute, 2004. 96(2): p. 99-106.
16. Etter, J.-F., L.T. Kozlowski, and T.V. Perneger, *What smokers believe about light and ultralight cigarettes*. Preventive medicine, 2003. 36(1): p. 92-98.
17. General, S., *The health benefits of smoking cessation*. Washington: Department of Health and Human Services, 1990.
18. Hrubec, Z. and J.K. McLaughlin, *Former cigarette smoking and mortality among US veterans: a 26-year follow-up, 1954–1980*. Changes in cigarette-related disease risks

- and their implication for prevention and control. Bethesda, MD: US Government Printing Office, 1997. 501.
19. Pawel, D. and J. Puskin, *The US Environmental Protection Agency's assessment of risks from indoor radon*. Health physics, 2004. 87(1): p. 68-74.
 20. Field, R.W., et al., *Residential Radon Gas Exposure and Lung Cancer The Iowa Radon Lung Cancer Study*. American Journal of Epidemiology, 2000. 151(11): p. 1091-1102.
 21. Spyrtos, D., et al., *Occupational exposure and lung cancer*. Journal of thoracic disease, 2013. 5(Suppl 4): p. S440.
 22. Hubaux, R., et al., *Arsenic, asbestos and radon: emerging players in lung tumorigenesis*. Environmental Health, 2012. 11(1): p. 89.
 23. Lee, T. and F. Gany, *Cooking Oil Fumes and Lung Cancer: A Review of the Literature in the Context of the US Population*. Journal of Immigrant and Minority Health, 2013: p. 1-7.
 24. Bailey-Wilson, J.E., et al., *A major lung cancer susceptibility locus maps to chromosome 6q23–25*. The American Journal of Human Genetics, 2004. 75(3): p. 460-474.
 25. Hung, R.J., et al., *A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25*. Nature, 2008. 452(7187): p. 633-637.
 26. Thorgeirsson, T.E., et al., *A variant associated with nicotine dependence, lung cancer and peripheral arterial disease*. Nature, 2008. 452(7187): p. 638-642.
 27. Wu, A.H., et al., *Personal and family history of lung disease as risk factors for adenocarcinoma of the lung*. Cancer research, 1988. 48(24 Part 1): p. 7279-7284.
 28. Samet, J.M., C.G. Humble, and D.R. Pathak, *Personal and family history of respiratory disease and lung cancer risk*. The American review of respiratory disease, 1986. 134(3): p. 466-470.
 29. Travis W.D., B.E., Muller-Hermelink H.K., Harris C.C. (Eds.), ed. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. . 2004, IARC Press: Lyon.
 30. van Meerbeeck, J.P., D.A. Fennell, and D.K. De Ruyscher, *Small-cell lung cancer*. The Lancet, 2011. 378(9804): p. 1741-1755.
 31. Kato, Y., et al., *Oat cell carcinoma of the lung: A review of 138 cases*. Cancer, 1969. 23(3): p. 517-524.
 32. Pelayo Alvarez, M., et al., *Chemotherapy versus best supportive care for extensive small cell lung cancer*. Cochrane Database Syst Rev, 2009. 4.
 33. Miller, A., W. Fox, and R. Tall, *Five-year follow-up of the Medical Research Council comparative trial of surgery and radiotherapy for the primary treatment of small-celled or oat-celled carcinoma of the bronchus: a report to the Medical Research Council Working Party on the evaluation of different methods of therapy in carcinoma of the bronchus*. The Lancet, 1969. 294(7619): p. 501-505.
 34. Shepherd, F.A., et al., *The International Association for the Study of Lung Cancer lung cancer staging project: proposals regarding the clinical staging of small cell lung cancer in the forthcoming (seventh) edition of the tumor, node, metastasis classification for lung cancer*. Journal of Thoracic Oncology, 2007. 2(12): p. 1067-1077.
 35. Spiro, S.G. and J.C. Porter, *Lung cancer—where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment*. American journal of respiratory and critical care medicine, 2002. 166(9): p. 1166-1196.

36. Khuder, S.A., *Effect of cigarette smoking on major histological types of lung cancer: a meta-analysis*. Lung cancer, 2001. 31(2): p. 139-148.
37. Travis, W.D. and L. Sobin, *Histological typing of lung and pleural tumours*. 1999: Springer Berlin.
38. Rossi, G., et al., *Review Article: A Reevaluation of the Clinical Significance of Histological Subtyping of Non—Small-Cell Lung Carcinoma: Diagnostic Algorithms in the Era of Personalized Treatments*. International journal of surgical pathology, 2009. 17(3): p. 206-218.
39. Loo, P.S., et al., *Subtyping of undifferentiated non-small cell carcinomas in bronchial biopsy specimens*. Journal of Thoracic Oncology, 2010. 5(4): p. 442-447.
40. Yatabe, Y., T. Mitsudomi, and T. Takahashi, *TTF-1 expression in pulmonary adenocarcinomas*. The American journal of surgical pathology, 2002. 26(6): p. 767-773.
41. Conde, E., et al., *The use of P63 immunohistochemistry for the identification of squamous cell carcinoma of the lung*. PLoS One, 2010. 5(8): p. e12209.
42. Campayo, M., et al., *A dual role for KRT81: a miR-SNP associated with recurrence in non-small-cell lung cancer and a novel marker of squamous cell lung carcinoma*. PLoS One, 2011. 6(7): p. e22509.
43. Sullivan, J.P., J.D. Minna, and J.W. Shay, *Evidence for self-renewing lung cancer stem cells and their implications in tumor initiation, progression, and targeted therapy*. Cancer and Metastasis Reviews, 2010. 29(1): p. 61-72.
44. Hanna, J.M. and M.W. Onaitis, *Cell of origin of lung cancer*. Journal of carcinogenesis, 2013. 12(1): p. 6.
45. Giangreco, A., K.R. Groot, and S.M. Janes, *Lung cancer and lung stem cells: strange bedfellows?* American journal of respiratory and critical care medicine, 2007. 175(6): p. 547-553.
46. Al-Hajj, M., et al., *Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. 100(7): p. 3983-3988.
47. Smalley, M. and A. Ashworth, *Stem cells and breast cancer: a field in transit*. Nature Reviews Cancer, 2003. 3(11): p. 832-844.
48. Giangreco, A., et al., *Stem cells are dispensable for lung homeostasis but restore airways after injury*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009. 106(23): p. 9286-9291.
49. Kim, C.F.B., et al., *Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer*. Cell, 2005. 121(6): p. 823-835.
50. Kajstura, J., et al., *Evidence for human lung stem cells*. New England Journal of Medicine, 2011. 364(19): p. 1795-1806.
51. Stripp, B.R. and S.D. Reynolds, *Maintenance and repair of the bronchiolar epithelium*. Proceedings of the American Thoracic Society, 2008. 5(3): p. 328.
52. Reynolds, S.D., et al., *Conditional Stabilization of β -Catenin Expands the Pool of Lung Stem Cells*. Stem Cells, 2008. 26(5): p. 1337-1346.
53. Taipale, J. and P.A. Beachy, *The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer*. Nature, 2001. 411(6835): p. 349-354.
54. Collins, B.J., W. Kleeberger, and D.W. Ball. *Notch in lung development and lung cancer*. in *Seminars in cancer biology*. 2004: Elsevier.

55. Sekido, Y., K.M. Fong, and J.D. Minna, *Molecular genetics of lung cancer*. Annual review of medicine, 2003. 54(1): p. 73-87.
56. Sekido, Y., K.M. Fong, and J.D. Minna, *Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer, 1998. 1378(1): p. F21-F59.
57. Ciardiello, F. and G. Tortora, *EGFR antagonists in cancer treatment*. New England Journal of Medicine, 2008. 358(11): p. 1160-1174.
58. Raben, D., B. Helfrich, and P.A. Bunn Jr, *Targeted therapies for non-small-cell lung cancer: biology, rationale, and preclinical results from a radiation oncology perspective*. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2004. 59(2): p. S27-S38.
59. Riely, G.J., J. Marks, and W. Pao, *KRAS mutations in non-small cell lung cancer*. Proceedings of the American Thoracic Society, 2009. 6(2): p. 201-205.
60. Subramanian, J. and R. Govindan, *Molecular genetics of lung cancer in people who have never smoked*. The lancet oncology, 2008. 9(7): p. 676-682.
61. Shimizu, E., et al., *RB protein status and clinical correlation from 171 cell lines representing lung cancer, extrapulmonary small cell carcinoma, and mesothelioma*. Oncogene, 1994. 9(9): p. 2441-2448.
62. Belinsky, S.A., et al., *Promoter hypermethylation of multiple genes in sputum precedes lung cancer incidence in a high-risk cohort*. Cancer research, 2006. 66(6): p. 3338-3344.
63. Daniel, V.C., C.D. Peacock, and D.N. Watkins, *Developmental signalling pathways in lung cancer*. Respiriology, 2006. 11(3): p. 234-240.
64. Gallardo, E., et al., *miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer*. Carcinogenesis, 2009. 30(11): p. 1903-1909.
65. Chute, C.G., et al., *Presenting conditions of 1539 population-based lung cancer patients by cell type and stage in new hampshire and vermont*. Cancer, 1985. 56(8): p. 2107-2111.
66. Spiro, S.G., M.K. Gould, and G.L. Colice, *Initial Evaluation of the Patient With Lung Cancer: Symptoms, Signs, Laboratory Tests, and Paraneoplastic Syndromes* ACCP Evidenced-Based Clinical Practice Guidelines. CHEST Journal, 2007. 132(3_suppl): p. 149S-160S.
67. Aberle, D., et al., *The National Lung Screening Trial: overview and study design*. Radiology, 2011. 258(1): p. 243-253.
68. Monnier-Cholley, L., et al., *Detection of Lung Cancer on Radiographs: Receiver Operating Characteristic Analyses of Radiologists', Pulmonologists', and Anesthesiologists' Performance*. Radiology, 2004. 233(3): p. 799-805.
69. McMahon, P.M., et al., *Estimating Long-term Effectiveness of Lung Cancer Screening in the Mayo CT Screening Study*. Radiology, 2008. 248(1): p. 278-287.
70. von Schulthess, G.K., H.C. Steinert, and T.F. Hany, *Integrated PET/CT: current applications and future directions*. Radiology, 2006. 238(2): p. 405-422.
71. Blodgett, T.M., C.C. Meltzer, and D.W. Townsend, *PET/CT: Form and Function*. Radiology, 2007. 242(2): p. 360-385.
72. Fischer, B., et al., *Preoperative staging of lung cancer with combined PET-CT*. New England Journal of Medicine, 2009. 361(1): p. 32-39.

73. Yeh, D.W., et al., *Mediastinal Nodes in Patients with Non–Small Cell Lung Cancer: MRI Findings with PET/CT and Pathologic Correlation*. American Journal of Roentgenology, 2009. 193(3): p. 813-821.
74. Schwartz, A.M. and M.K. Rezaei, *Diagnostic Surgical Pathology in Lung Cancer* *Diagnostic Surgical Pathology in Lung Cancer* *Diagnosis and Management of Lung Cancer: American College of Chest Physicians Evidence-Based Clinical Practice Guidelines*. CHEST Journal, 2013. 143(5_suppl): p. e251S-e262S.
75. Goldstraw, P., et al., *The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification of malignant tumours*. Journal of Thoracic Oncology, 2007. 2(8): p. 706-714.
76. Rami-Porta, R., V. Bolejack, and P. Goldstraw. *The new tumor, node, and metastasis staging system*. in *Seminars in respiratory and critical care medicine*. 2011: © Thieme Medical Publishers.
77. Group, N.-s.C.L.C.C., *Chemotherapy in non-small cell lung cancer. A meta-analysis using updated data on individual patients from 52 randomised clinical trials*. Bmj., 1995. 311: p. 899-909.
78. Douillard, J.-Y., et al., *Adjuvant vinorelbine plus cisplatin versus observation in patients with completely resected stage IB–IIIA non-small-cell lung cancer (Adjuvant Navelbine International Trialist Association [ANITA]): a randomised controlled trial*. The lancet oncology, 2006. 7(9): p. 719-727.
79. Pignon, J.-P., et al., *Lung adjuvant cisplatin evaluation: a pooled analysis by the LACE Collaborative Group*. Journal of Clinical Oncology, 2008. 26(21): p. 3552-3559.
80. Durko, L. and E. Malecka-Panas, *Lifestyle Modifications and Colorectal Cancer*. Current Colorectal Cancer Reports, 2014: p. 1-10.
81. Center, M.M., et al., *Worldwide variations in colorectal cancer*. CA: a cancer journal for clinicians, 2009. 59(6): p. 366-378.
82. Xu, X.M., et al., *DNA alterations of microsatellite DNA, p53, APC and K-ras in Chinese colorectal cancer patients*. European journal of clinical investigation, 2012. 42(7): p. 751-759.
83. Larsson, S.C., N. Orsini, and A. Wolk, *Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis*. Journal of the National Cancer Institute, 2005. 97(22): p. 1679-1687.
84. Gillen, C., et al., *Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis*. Gut, 1994. 35(11): p. 1590-1592.
85. Walter, V., et al., *Smoking and survival of colorectal cancer patients: systematic review and meta-analysis*. Annals of oncology, 2014: p. mdu040.
86. Bingham, S.A., et al., *Dietary fibre in food and protection against colorectal cancer in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC): an observational study*. The Lancet, 2003. 361(9368): p. 1496-1501.
87. Autier, P., et al., *Vitamin D status and ill health: a systematic review*. The Lancet Diabetes & Endocrinology, 2014. 2(1): p. 76-89.
88. Gatalica, Z. and E. Torlakovic, *Pathology of the hereditary colorectal carcinoma*. Familial cancer, 2008. 7(1): p. 15-26.
89. Fearon, E.R. and B. Vogelstein, *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. Cell, 1990. 61(5): p. 759-767.

90. Kuismanen, S.A., et al., *Genetic and Epigenetic Modification of MLH1 Accounts for a Major Share of Microsatellite-Unstable Colorectal Cancers*. *The American journal of pathology*, 2000. 156(5): p. 1773-1779.
91. Cunningham, J.M., et al., *Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability*. *Cancer research*, 1998. 58(15): p. 3455-3460.
92. Green, S., et al., *Hereditary non-polyposis colorectal cancer*. *International journal of colorectal disease*, 1998. 13(1): p. 3-12.
93. Kowalski, L.D., et al., *Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER+ endometrial cancers*. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 1997. 18(3): p. 219-227.
94. Lin, K.M., et al., *Cumulative incidence of colorectal and extracolonic cancers in MLH1 and MSH2 mutation carriers of hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. *Journal of Gastrointestinal Surgery*, 1998. 2(1): p. 67-71.
95. Mori, Y., et al., *Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene*. *Human molecular genetics*, 1992. 1(4): p. 229-233.
96. De la Chapelle, A., *Genetic predisposition to colorectal cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2004. 4(10): p. 769-780.
97. Burt, R. and D.W. Neklason, *Genetic testing for inherited colon cancer*. *Gastroenterology*, 2005. 128(6): p. 1696-1716.
98. Knudsen, A.L., M.L. Bisgaard, and S. Bülow, *Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a review of the literature*. *Familial cancer*, 2003. 2(1): p. 43-55.
99. Gammon, A., et al., *Hamartomatous polyposis syndromes*. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology*, 2009. 23(2): p. 219-231.
100. Howe, J.R., et al., *A gene for familial juvenile polyposis maps to chromosome 18q21. 1*. *The American Journal of Human Genetics*, 1998. 62(5): p. 1129-1136.
101. Howe, J.R., et al., *Germline mutations of the gene encoding bone morphogenetic protein receptor 1A in juvenile polyposis*. *Nature genetics*, 2001. 28(2): p. 184-187.
102. Hemminki, A., et al., *Localization of a susceptibility locus for Peutz-Jeghers syndrome to 19p using comparative genomic hybridization and targeted linkage analysis*. *Nature genetics*, 1997. 15(1): p. 87-90.
103. HEATH, J.P., *Epithelial cell migration in the intestine*. *Cell biology international*, 1996. 20(2): p. 139-146.
104. Davies, R.J., R. Miller, and N. Coleman, *Colorectal cancer screening: prospects for molecular stool analysis*. *Nature Reviews Cancer*, 2005. 5(3): p. 199-209.
105. Papailiou, J., et al., *Stem cells in colon cancer. A new era in cancer theory begins*. *International journal of colorectal disease*, 2011. 26(1): p. 1-11.
106. Ricci-Vitiani, L., et al., *Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells*. *Nature*, 2007. 445(7123): p. 111-115.
107. Zhu, L., et al., *Prominin 1 marks intestinal stem cells that are susceptible to neoplastic transformation*. *Nature*, 2009. 457(7229): p. 603-607.
108. Shih, I.-M., et al., *Top-down morphogenesis of colorectal tumors*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001. 98(5): p. 2640-2645.
109. Puglisi, M.A., et al., *Colon cancer stem cells: Controversies and perspectives*. *World journal of gastroenterology: WJG*, 2013. 19(20): p. 2997.

110. Kinzler, K.W. and B. Vogelstein, *Lessons from hereditary colorectal cancer*. Cell, 1996. 87(2): p. 159-170.
111. Takahashi-Yanaga, F. and M. Kahn, *Targeting Wnt signaling: can we safely eradicate cancer stem cells?* Clinical Cancer Research, 2010. 16(12): p. 3153-3162.
112. MacDonald, B.T., K. Tamai, and X. He, *Wnt/ β -catenin signaling: components, mechanisms, and diseases*. Developmental cell, 2009. 17(1): p. 9-26.
113. Karapetis, C.S., et al., *K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2008. 359(17): p. 1757-1765.
114. Patel, G.S. and C. Karapetis, *Personalized treatment for advanced colorectal cancer: KRAS and beyond*. Cancer Management and Research, 2013. 5: p. 387-400.
115. Fink, S.P., et al., *Transforming growth factor- β -induced growth inhibition in a Smad4 mutant colon adenoma cell line*. Cancer research, 2001. 61(1): p. 256-260.
116. Tarafa, G., et al., *DCC and SMAD4 alterations in human colorectal and pancreatic tumor dissemination*. Oncogene, 2000. 19(4): p. 546-555.
117. Thibodeau, S., G. Bren, and D. Schaid, *Microsatellite instability in cancer of the proximal colon*. Science, 1993. 260(5109): p. 816-819.
118. Søreide, K., et al., *Microsatellite instability in colorectal cancer*. British journal of surgery, 2006. 93(4): p. 395-406.
119. De Jong, A.E., et al., *The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC*. Gastroenterology, 2004. 126(1): p. 42-48.
120. Castells, A., *Cribado del cáncer colorrectal*. Gastroenterología y Hepatología, 2013. 36: p. 66-72.
121. Sobin, L.H., M.K. Gospodarowicz, and C. Wittekind, *TNM classification of malignant tumours*. 2011: Wiley. com.
122. Gómez Pérez, L., et al., *Evaluación del estudio pT3a de la actual clasificación TNM del cáncer renal*. Actas Urológicas Españolas, 2006. 30(3): p. 287-294.
123. Edge, S.B. and C.C. Compton, *The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM*. Annals of surgical oncology, 2010. 17(6): p. 1471-1474.
124. Kapiteijn, E., et al., *Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2001. 345(9): p. 638-646.
125. Twelves, C., et al., *Capecitabine versus 5-fluorouracil/folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer: final results from the X-ACT trial with analysis by age and preliminary evidence of a pharmacodynamic marker of efficacy*. Annals of oncology, 2012. 23(5): p. 1190-1197.
126. Gill, S., et al., *Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much?* Journal of Clinical Oncology, 2004. 22(10): p. 1797-1806.
127. André, T., et al., *Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial*. Journal of Clinical Oncology, 2009. 27(19): p. 3109-3116.
128. Cassidy, J., et al., *XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2004. 22(11): p. 2084-2091.

129. André, T., et al., *Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer*. New England Journal of Medicine, 2004. 350(23): p. 2343-2351.
130. Kabbinavar, F.F., et al., *Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial*. Journal of Clinical Oncology, 2005. 23(16): p. 3697-3705.
131. Van Cutsem, E., et al., *Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer*. New England Journal of Medicine, 2009. 360(14): p. 1408-1417.
132. Peeters, M., et al., *Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer*. Journal of Clinical Oncology, 2010. 28(31): p. 4706-4713.
133. Filipowicz, W., S.N. Bhattacharyya, and N. Sonenberg, *Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?* Nature Reviews Genetics, 2008. 9(2): p. 102-114.
134. Pritchard, C.C., H.H. Cheng, and M. Tewari, *MicroRNA profiling: approaches and considerations*. Nature Reviews Genetics, 2012. 13(5): p. 358-369.
135. Bartel, D.P., *MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function*. Cell, 2004. 116(2): p. 281-297.
136. Ambros, V., *The functions of animal microRNAs*. Nature, 2004. 431(7006): p. 350-355.
137. Lee, R.C., R.L. Feinbaum, and V. Ambros, *The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14*. Cell, 1993. 75(5): p. 843-854.
138. Ambros, V. and H.R. Horvitz, *Heterochronic mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. Science, 1984. 226(4673): p. 409-416.
139. Horvitz, H.R. and J.E. Sulston, *Isolation and genetic characterization of cell-lineage mutants of the nematode Caenorhabditis elegans*. Genetics, 1980. 96(2): p. 435-454.
140. Lee, R., R. Feinbaum, and V. Ambros, *A short history of a short RNA*. Cell, 2004. 116: p. S89-S92.
141. Pasquinelli, A.E., et al., *Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA*. Nature, 2000. 408(6808): p. 86-89.
142. Kaufman, E.J. and E.A. Miska. *The microRNAs of Caenorhabditis elegans*. in *Seminars in cell & developmental biology*. 2010: Elsevier.
143. Calin, G.A., et al., *Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2002. 99(24): p. 15524-15529.
144. Calin, G.A., et al., *Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004. 101(9): p. 2999-3004.
145. Li, C., et al., *Therapeutic microRNA strategies in human cancer*. The AAPS journal, 2009. 11(4): p. 747-757.
146. Hsu, P.W., et al., *miRNAMap: genomic maps of microRNA genes and their target genes in mammalian genomes*. Nucleic acids research, 2006. 34(suppl 1): p. D135-D139.
147. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: tools for microRNA genomics*. Nucleic acids research, 2008. 36(suppl 1): p. D154-D158.

148. Betel, D., et al., *The microRNA.org resource: targets and expression*. Nucleic acids research, 2008. 36(suppl 1): p. D149-D153.
149. Maselli, V., D. Di Bernardo, and S. Banfi, *CoGemIR: a comparative genomics microRNA database*. BMC genomics, 2008. 9(1): p. 457.
150. Alexiou, P., et al., *miRGen 2.0: a database of microRNA genomic information and regulation*. Nucleic acids research, 2010. 38(suppl 1): p. D137-D141.
151. Yang, J.-H., et al., *deepBase: a database for deeply annotating and mining deep sequencing data*. Nucleic acids research, 2010. 38(suppl 1): p. D123-D130.
152. Iorio, M.V. and C.M. Croce, *MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review*. EMBO molecular medicine, 2012. 4(3): p. 143-159.
153. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. Nucleic acids research, 2011. 39(suppl 1): p. D152-D157.
154. Rajewsky, N., *microRNA target predictions in animals*. Nature genetics, 2006. 38: p. S8-S13.
155. Bartel, D.P., *MicroRNAs: target recognition and regulatory functions*. Cell, 2009. 136(2): p. 215-233.
156. Da Wei Huang, B.T.S. and R.A. Lempicki, *Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources*. Nature protocols, 2008. 4(1): p. 44-57.
157. Xia, W., G. Cao, and N. Shao, *Progress in miRNA target prediction and identification*. Science in China Series C: Life Sciences, 2009. 52(12): p. 1123-1130.
158. Lewis, B.P., C.B. Burge, and D.P. Bartel, *Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets*. Cell, 2005. 120(1): p. 15-20.
159. Krek, A., et al., *Combinatorial microRNA target predictions*. Nature genetics, 2005. 37(5): p. 495-500.
160. Miranda, K.C., et al., *A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes*. Cell, 2006. 126(6): p. 1203-1217.
161. Sethupathy, P., B. Corda, and A.G. Hatzigeorgiou, *TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets*. Rna, 2006. 12(2): p. 192-197.
162. Kertesz, M., et al., *The role of site accessibility in microRNA target recognition*. Nature genetics, 2007. 39(10): p. 1278-1284.
163. Maragkakis, M., et al., *DIANA-microT web server: elucidating microRNA functions through target prediction*. Nucleic acids research, 2009. 37(suppl 2): p. W273-W276.
164. Xiao, F., et al., *miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions*. Nucleic acids research, 2009. 37(suppl 1): p. D105-D110.
165. Yang, J.-H., et al., *starBase: a database for exploring microRNA-mRNA interaction maps from Argonaute CLIP-Seq and Degradome-Seq data*. Nucleic acids research, 2011. 39(suppl 1): p. D202-D209.
166. Zeng, Y., *Principles of micro-RNA production and maturation*. Oncogene, 2006. 25(46): p. 6156-6162.
167. Rodriguez, A., et al., *Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units*. Genome research, 2004. 14(10a): p. 1902-1910.
168. Lee, Y., et al., *The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing*. Nature, 2003. 425(6956): p. 415-419.

169. Yi, R., et al., *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. *Genes & development*, 2003. 17(24): p. 3011-3016.
170. Hutvagner, G., et al., *A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA*. *Science*, 2001. 293(5531): p. 834-838.
171. Siomi, H. and M.C. Siomi, *Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals*. *Molecular cell*, 2010. 38(3): p. 323-332.
172. Esquela-Kerscher, A. and F.J. Slack, *Oncomirs—microRNAs with a role in cancer*. *Nature Reviews Cancer*, 2006. 6(4): p. 259-269.
173. Garzon, R., G. Marcucci, and C.M. Croce, *Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges*. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2010. 9(10): p. 775-789.
174. Doench, J.G., C.P. Petersen, and P.A. Sharp, *siRNAs can function as miRNAs*. *Genes & development*, 2003. 17(4): p. 438-442.
175. Brennecke, J., et al., *Principles of microRNA–target recognition*. *PLoS biology*, 2005. 3(3): p. e85.
176. Hutvagner, G. and P.D. Zamore, *A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex*. *Science*, 2002. 297(5589): p. 2056-2060.
177. Fabian, M.R., N. Sonenberg, and W. Filipowicz, *Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs*. *Annual review of biochemistry*, 2010. 79: p. 351-379.
178. Vasudevan, S., Y. Tong, and J.A. Steitz, *Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation*. *Science*, 2007. 318(5858): p. 1931-1934.
179. Jopling, C.L., et al., *Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA*. *Science*, 2005. 309(5740): p. 1577-1581.
180. Ørom, U.A., F.C. Nielsen, and A.H. Lund, *MicroRNA-10a binds the 5' UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation*. *Molecular cell*, 2008. 30(4): p. 460-471.
181. Place, R.F., et al., *MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008. 105(5): p. 1608-1613.
182. Gonzalez, S., D.G. Pisano, and M. Serrano, *Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs*. *Cell Cycle*, 2008. 7(16): p. 2601-2608.
183. Khraiwesh, B., et al., *Transcriptional control of gene expression by microRNAs*. *Cell*, 2010. 140(1): p. 111-122.
184. Eiring, A.M., et al., *miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts*. *Cell*, 2010. 140(5): p. 652-665.
185. Garzon, R., G.A. Calin, and C.M. Croce, *MicroRNAs in cancer*. *Annual review of medicine*, 2009. 60: p. 167-179.
186. Sato, F., et al., *MicroRNAs and epigenetics*. *Febs Journal*, 2011. 278(10): p. 1598-1609.
187. Lu, J., et al., *MicroRNA expression profiles classify human cancers*. *Nature*, 2005. 435(7043): p. 834-838.
188. Nicoloso, M.S., et al., *MicroRNAs—the micro steering wheel of tumour metastases*. *Nature Reviews Cancer*, 2009. 9(4): p. 293-302.
189. Ma, L., J. Teruya-Feldstein, and R.A. Weinberg, *Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer*. *Nature*, 2007. 449(7163): p. 682-688.
190. Tavazoie, S.F., et al., *Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis*. *Nature*, 2008. 451(7175): p. 147-152.

191. Cimmino, A., et al., *miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005. 102(39): p. 13944-13949.
192. Bueno, M.J., et al., *Combinatorial effects of microRNAs to suppress the Myc oncogenic pathway*. Blood, 2011. 117(23): p. 6255-6266.
193. Johnson, C.D., et al., *The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells*. Cancer research, 2007. 67(16): p. 7713-7722.
194. Takamizawa, J., et al., *Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival*. Cancer research, 2004. 64(11): p. 3753-3756.
195. Garzon, R., et al., *MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia*. Blood, 2008. 111(6): p. 3183-3189.
196. Iorio, M.V., et al., *MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer*. Cancer research, 2005. 65(16): p. 7065-7070.
197. Mott, J.L., et al., *mir-29 regulates Mcl-1 protein expression and apoptosis*. Oncogene, 2007. 26(42): p. 6133-6140.
198. Chang, T.-C., et al., *Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis*. Molecular cell, 2007. 26(5): p. 745-752.
199. Yanaihara, N., et al., *Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis*. Cancer cell, 2006. 9(3): p. 189-198.
200. Trotta, R., et al., *miR-155 regulates IFN- γ production in natural killer cells*. Blood, 2012. 119(15): p. 3478-3485.
201. Turner, M.L., F.M. Schnorfeil, and T. Brocker, *MicroRNAs regulate dendritic cell differentiation and function*. The Journal of Immunology, 2011. 187(8): p. 3911-3917.
202. Wang, J. and H. Hua, *Role of miR-155 in breast cancer*. Frontiers in bioscience: a journal and virtual library, 2012. 17: p. 2350.
203. Ota, A., et al., *Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma*. Cancer research, 2004. 64(9): p. 3087-3095.
204. He, L., et al., *A microRNA polycistron as a potential human oncogene*. Nature, 2005. 435(7043): p. 828-833.
205. Si, M., et al., *miR-21-mediated tumor growth*. Oncogene, 2006. 26(19): p. 2799-2803.
206. Ciafre, S., et al., *Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma*. Biochemical and biophysical research communications, 2005. 334(4): p. 1351-1358.
207. Meng, F., et al., *MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer*. Gastroenterology, 2007. 133(2): p. 647-658.
208. White, N.M., et al., *Metastamirs: a stepping stone towards improved cancer management*. Nature Reviews Clinical Oncology, 2011. 8(2): p. 75-84.
209. Uhlmann, S., et al., *mir-200bc/429 cluster targets plcy1 and differentially regulates proliferation and egf-driven invasion than mir-200a/141 in breast cancer*. Oncogene, 2010. 29(30): p. 4297-4306.
210. Howe, E.N., D.R. Cochrane, and J.K. Richer, *The miR-200 and miR-221/222 microRNA families: opposing effects on epithelial identity*. Journal of mammary gland biology and neoplasia, 2012. 17(1): p. 65-77.

211. Elson-Schwab, I., A. Lorentzen, and C.J. Marshall, *MicroRNA-200 family members differentially regulate morphological plasticity and mode of melanoma cell invasion*. PLoS One, 2010. 5(10): p. e13176.
212. Mizuguchi, Y., et al., *Cooperation of p300 and PCAF in the control of microRNA 200c/141 transcription and epithelial characteristics*. PLoS One, 2012. 7(2): p. e32449.
213. Chang, C.-J., et al., *p53 regulates epithelial-mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs*. Nature cell biology, 2011. 13(3): p. 317-323.
214. Feng, X., et al., *MiR-200, a new star miRNA in human cancer*. Cancer letters, 2013.
215. Vrba, L., et al., *Role for DNA methylation in the regulation of miR-200c and miR-141 expression in normal and cancer cells*. PLoS One, 2010. 5(1): p. e8697.
216. Yu, Y., et al., *Kindlin 2 promotes breast cancer invasion via epigenetic silencing of the microRNA200 gene family*. International journal of cancer, 2013. 133(6): p. 1368-1379.
217. Hill, L., G. Browne, and E. Tulchinsky, *ZEB/miR-200 feedback loop: At the crossroads of signal transduction in cancer*. International journal of cancer, 2013. 132(4): p. 745-754.
218. Yang, J. and R.A. Weinberg, *Epithelial-mesenchymal transition: at the crossroads of development and tumor metastasis*. Developmental cell, 2008. 14(6): p. 818-829.
219. Acloque, H., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease*. The Journal of clinical investigation, 2009. 119(6): p. 1438.
220. Park, S.-M., et al., *The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2*. Genes & development, 2008. 22(7): p. 894-907.
221. Gregory, P.A., et al., *The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1*. Nature cell biology, 2008. 10(5): p. 593-601.
222. Korpál, M., et al., *The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2*. Journal of Biological Chemistry, 2008. 283(22): p. 14910-14914.
223. Katsuno, Y., S. Lamouille, and R. Derynck, *TGF- β signaling and epithelial-mesenchymal transition in cancer progression*. Current opinion in oncology, 2013. 25(1): p. 76-84.
224. Burk, U., et al., *A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells*. EMBO reports, 2008. 9(6): p. 582-589.
225. Gregory, P.A., et al., *MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition*. Cell Cycle, 2008. 7(20): p. 3112-3117.
226. Sahlgren, C., et al., *Notch signaling mediates hypoxia-induced tumor cell migration and invasion*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2008. 105(17): p. 6392-6397.
227. Chen, Y. and L. Zhang, *MiR-200 family and cancer: Function, regulation and signaling*. Surgical oncology, 2014.
228. Sánchez-Tilló, E., et al., *β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2011. 108(48): p. 19204-19209.

229. Kahlert, C., et al., *Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro*. *Clinical Cancer Research*, 2011. 17(24): p. 7654-7663.
230. Wiklund, E.D., et al., *Coordinated epigenetic repression of the miR-200 family and miR-205 in invasive bladder cancer*. *International journal of cancer*, 2011. 128(6): p. 1327-1334.
231. Aydoğdu, E., et al., *MicroRNA-regulated gene networks during mammary cell differentiation are associated with breast cancer*. *Carcinogenesis*, 2012. 33(8): p. 1502-1511.
232. Castilla, M.Á., et al., *MicroRNA-200 family modulation in distinct breast cancer phenotypes*. *PLoS One*, 2012. 7(10): p. e47709.
233. Hur, K., et al., *MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis*. *Gut*, 2013. 62(9): p. 1315-1326.
234. Paterson, E.L., et al., *Down-regulation of the miRNA-200 family at the invasive front of colorectal cancers with degraded basement membrane indicates EMT is involved in cancer progression*. *Neoplasia (New York, NY)*, 2013. 15(2): p. 180.
235. Pacurari, M., et al., *The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells*. *International journal of oncology*, 2013. 43(2): p. 548-560.
236. Liu, X.-G., et al., *High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer*. *Medical Oncology*, 2012. 29(2): p. 618-626.
237. Du, Y., et al., *Down-regulation of miR-141 in gastric cancer and its involvement in cell growth*. *Journal of gastroenterology*, 2009. 44(6): p. 556-561.
238. Valladares-Ayerbes, M., et al., *Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer*. *J Transl Med*, 2012. 10(1): p. 186.
239. Bendoraite, A., et al., *Regulation of miR-200 family microRNAs and ZEB transcription factors in ovarian cancer: evidence supporting a mesothelial-to-epithelial transition*. *Gynecologic oncology*, 2010. 116(1): p. 117-125.
240. Hu, X., et al., *A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer*. *Gynecologic oncology*, 2009. 114(3): p. 457-464.
241. Prislei, S., et al., *MiR-200c and HuR in ovarian cancer*. *BMC cancer*, 2013. 13(1): p. 72.
242. Li, A., et al., *Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels*. *Cancer research*, 2010. 70(13): p. 5226-5237.
243. Yu, J., et al., *Research MicroRNA, hsa-miR-200c, is an independent prognostic factor in pancreatic cancer and its upregulation inhibits pancreatic cancer invasion but increases cell proliferation*. *Cancer research*, 2010. 12: p. 13.
244. Barron, N., et al., *Biochemical relapse following radical prostatectomy and miR-200a levels in prostate cancer*. *The Prostate*, 2012. 72(11): p. 1193-1199.
245. Hu, M., et al., *MicroRNA-141 regulates Smad interacting protein 1 (SIP1) and inhibits migration and invasion of colorectal cancer cells*. *Digestive diseases and sciences*, 2010. 55(8): p. 2365-2372.
246. Wellner, U., et al., *The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs*. *Nature cell biology*, 2009. 11(12): p. 1487-1495.

247. Yang, Y., et al., *The Notch ligand Jagged2 promotes lung adenocarcinoma metastasis through a miR-200-dependent pathway in mice*. *The Journal of clinical investigation*, 2011. 121(4): p. 1373.
248. Ceppi, P., et al., *Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer*. *Molecular Cancer Research*, 2010. 8(9): p. 1207-1216.
249. Thiery, J.P. and J.P. Sleeman, *Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions*. *Nature reviews Molecular cell biology*, 2006. 7(2): p. 131-142.
250. Thompson, E. and I. Haviv, *The social aspects of EMT-MET plasticity*. *Nature medicine*, 2011. 17(9): p. 1048.
251. Baffa, R., et al., *MicroRNA expression profiling of human metastatic cancers identifies cancer gene targets*. *The Journal of pathology*, 2009. 219(2): p. 214-221.
252. Korpala, M., et al., *Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization*. *Nature medicine*, 2011. 17(9): p. 1101-1108.
253. Dykxhoorn, D.M., et al., *miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases*. *PLoS One*, 2009. 4(9): p. e7181.
254. Wang, G., et al., *Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013. 110(8): p. 2858-2863.
255. Thiery, J.P., et al., *Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease*. *Cell*, 2009. 139(5): p. 871-890.
256. Navarro, A. and M. Monzó, *MicroRNAs in human embryonic and cancer stem cells*. *Yonsei medical journal*, 2010. 51(5): p. 622-632.
257. Wang, X., et al., *microRNA-200c modulates the epithelial-to-mesenchymal transition in human renal cell carcinoma metastasis*. *Oncology reports*, 2013. 30(2): p. 643-650.
258. Roybal, J.D., et al., *miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1*. *Molecular Cancer Research*, 2011. 9(1): p. 25-35.
259. Pecot, C.V., et al., *Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family*. *Nature communications*, 2013. 4.
260. Bremnes, R.M., C. Camps, and R. Sirera, *Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood*. *Lung cancer*, 2006. 51(2): p. 143-158.
261. Chaffer, C.L., et al., *Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: role of fibroblast growth factor receptor-2*. *Cancer research*, 2006. 66(23): p. 11271-11278.
262. Lee, J.-W., et al., *The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma*. *Gynecologic oncology*, 2011. 120(1): p. 56-62.
263. Hurteau, G.J., et al., *Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression*. *Cell Cycle*, 2009. 8(13): p. 2064-2069.
264. Longley, D.B., D.P. Harkin, and P.G. Johnston, *5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies*. *Nature Reviews Cancer*, 2003. 3(5): p. 330-338.

ANEXOS

8. Anexos

8.1 Publicaciones a las que ha dado lugar la tesis

PLOS ONE

miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	PONE-D-14-09142R1
Article Type:	Research article
Full Title:	miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma
Short Title:	miR-200c and miR-141 as prognostic markers in NSCLC adenocarcinoma
Corresponding Author:	Alfons Navarro, Ph.D. University of Barcelona Barcelona, Barcelona SPAIN
Keywords:	NSCLC, adenocarcinoma, miR-200c, miR-141, overall survival, VEGF, angiogenesis, EMT, MET
Abstract:	<p>Background Several treatments in non-small cell lung cancer (NSCLC) are histology-dependent, and the need for histology-related markers is increasing. MicroRNAs (miRNAs) are promising molecular markers in multiple cancers and show differences in expression depending on histological subtype. The miRNA family miR-200 has been associated with the regulation of epithelial-mesenchymal (EMT)/mesenchymal-epithelial transition (MET). EMT involves profound phenotypic changes that include the loss of cell-cell adhesion, the loss of cell polarity, and the acquisition of migratory and invasive properties that facilitates metastasis. A dual role for the miR-200 family in the prognosis of several tumors has been related to tumor cell origin. However, the prognostic role and function of miR-200 family in early-stage NSCLC adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (SCC) have not been well established.</p> <p>Methods miRNA expression was determined using TaqMan assays in 155 tumors from resected NSCLC patients. Functional studies were conducted in three NSCLC cell lines: H23, A-549 and HCC-44.</p> <p>Results High miR-200c expression was associated with shorter overall survival (OS) in the entire cohort ($p=0.024$). High miR-200c ($p=0.0004$) and miR-141 ($p=0.009$) expression correlated with shorter OS in adenocarcinoma - but not in SCC. In the multivariate analysis, a risk score based on miR-141 and miR-200c expression emerged as an independent prognostic factor for OS in the entire cohort (OR, 2.787; $p=0.033$) and in adenocarcinoma patients (OR, 10.649; $p=0.002$). Functional analyses showed that miR-200c, was related to mesenchymal-epithelial transition (MET) and affected cell migration and E-cadherin levels, while overexpression of miR-141 reduced KLF6 protein levels and produced an increase of secretion of VEGFA in vitro (H23, $p=0.04$; A-549, $p=0.03$; HCC-44, $p=0.02$) and was associated with higher blood microvessel density in patient tumor samples ($p<0.001$).</p> <p>Conclusion High miR-141 and miR-200c expression are associated with shorter OS in NSCLC patients with adenocarcinoma through MET and angiogenesis.</p>
Order of Authors:	Rut Tejero Alfons Navarro, Ph.D. Marc Campayo Nuria Viñolas Ramon M. Marrades Anna Cordeiro Marc Ruíz-Martínez Sandra Santasusagna

	Laureano Molins
	Josep Ramirez
	Mariano Monzó
Suggested Reviewers:	Jesus Garcia-Foncillas Fundación Jiménez Díaz jgfoncillas@fjd.es
	Beatriz Bellosillo Hospital del Mar- Parc de Salut MAR bbellosillo@parcdesalutmar.cat
Opposed Reviewers:	
Response to Reviewers:	<p>Academic Editor:</p> <p>1. This manuscript was reviewed by two scientists who are experts in the field. While they find merit in the study, one reviewer has pointed out that the validation studies were conducted in only one cell line. It is strongly recommended that the validity of the findings be established in a panel of NSCLC cell lines. While novelty is not a criteria for publication in PLOS One, the authors are expected to cite all the relevant publications on the specific topic and place the current study in the proper context. One reviewer has pointed out multiple publications on the topic that are not cited. The second reviewer has raised a question regarding the p values; an adequate explanation is needed for this as well. We look forward to receiving the revised manuscript.</p> <p>Our reply: In accordance with the academic editor's and the reviewers' suggestions, we have performed all the in vitro experiments in two additional cell lines (A-549 and HCC-44). The results obtained in the new cell lines are in line with those reported for the H23 cell line.</p> <p>We have also referenced all the relevant publications suggested by reviewer #1 and we have answered all the statistical questions raised by reviewer #2.</p> <p>Reviewer #1:</p> <p>1. The authors have analyzed 155 adenocarcinoma patients and screened for miRNAs that can serve as markers for early stage NSCLC. They have specifically investigated the miR200 family members and their association with EMT/MET. The major part of the manuscript has focused on miR200c and not miR141.</p> <p>The authors have mentioned in the abstract "The prognostic role and function of miR-200 family in early-stage NSCLC adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (SCC) have not been well established. miR200c has been well studied in the recent years and there are many articles published on NSCLC. The functional role of miR200c has been reported in the article "Loss of miR-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non-Small Cell Lung Cancer. Ceppi et al MCR 2010." The above article investigated the expression of miR-200c in a panel of NSCLC cell lines (n = 9), and a strong inverse correlation with invasion was detected. Reintroduction of miR-200c into highly invasive/aggressive NSCLC cells induced a loss of the mesenchymal phenotype by restoring E-cadherin and reducing N-cadherin expression, and inhibited in vitro cell invasion as well as in vivo metastasis formation. They have produced some important conclusions with respect to miR200c across various cell lines.</p> <p>Other articles mentioned below have already studied in detail miR200c in NSCLC patients.</p> <p>"High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. Liu et al 2012". The study suggests that tumor miR-21, miR-141, miR-200c, and serum miR-21 may be potential biomarkers for diagnosis and prognosis of NSCLC patients.</p> <p>The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. Pacurari IJC 2013.</p> <p>With already well published results on miR200c the novelty of the work in the author's manuscript doesn't stand. Moreover, the results and conclusions were based on validation with just one cell line. Also the authors have failed to mention the above articles in their manuscript.</p> <p>With these limitations, I suggest the article not suitable for publication in PLoS one.</p> <p>Our reply: In the present work, as stated by this reviewer, we have analyzed the</p>

prognostic role of miR-200 family and their implications in MET/EMT. We have focused our study on both miR-141 and miR-200c. Firstly, we identified only miR-141 and miR-200c as prognostic markers in the adenocarcinoma subgroup. Secondly, we observed by scratching assay that miR-200c had a greater impact on migration than miR-141, as we have now shown in three cell lines, none of which were included in the paper by Ceppi et al, where the authors only state the involvement of miR-200c in migration and invasiveness. Moreover, since miR-141 does not play a crucial role in cell migration, we decided to study the potential relation of this miRNA with angiogenesis. We showed that in hypoxia conditions the overexpression of miR-141 is related to VEGFA release by NSCLC cell lines, and in the patients with high miR-141 we observed higher microvessel density than in the other patients.

It is true that our results and conclusions were based on only one cell line, and we have now included two additional cell lines, with results that validate our original results. We have included this information in the revised version of the manuscript. Moreover, we have included the two missing references by Ceppi et al and Pacurari et al. (The article by Liu et al. was already included in the original version.) However, we would like to point out that Pacurari's results were obtained in patients with squamous cell carcinoma rather than adenocarcinoma.

Reviewer #2:

Solid manuscript correlating miRs 141 and 200c with OS supported by cell line studies. I suggested a few minor revisions.

1.The authors state that OS for those patients with high levels of miR141 showed a "trend" of poor survival. The p value given was 0.163. Trend is too strong of a word for this result.

Our reply: We agree with this reviewer and we have eliminated that sentence from the manuscript.

2.In building the multivariate COX model univariate p-values of ≤ 0.1 were used. Is this standard practice or should the univariate p-values also be significant?

Our reply: To the best of our knowledge, the inclusion of all significant values or values with potential significance ($p < 0.1$) is a standard practice in survival analysis using Cox Model in oncology (Veronica Monsálvez, et al. Modern Pathology 2013; John G. Edwards et al. Clinical Cancer Research 2002; Oleksey P. Kolesnik et al. Advances in Lung Cancer 2014). However, in response to the reviewer's comment, we have performed the multivariate analysis including only the significant factors (Entire cohort: Stage, Age, miRNA score; ADK cohort: Age >65 and microRNA Score). The results are shown here:

ENTIRE COHORT

OSOR (95% CI)P

Stage >12.17 (1.051-4.489)0.036

Age >652.817 (1.488-5.336)0.001

High-risk miR-141/miR-200c score 2.751 (1.074-7.047)0.035

ADENOCARCINOMA

OSOR (95% CI)P

Age >653.693 (1.420-9.601)0.007

High-risk miR-141/miR-200c score 10.649 (2.433-46.608)0.002

3.Background section of the abstract is poorly formed and should be re-written.

Our reply: We have improved the background section of the abstract.

Additional Information:

Question

Response

Competing Interest

The authors have declared that no competing interests exist

<p>For yourself and on behalf of all the authors of this manuscript, please declare below any competing interests as described in the "PLoS Policy on Declaration and Evaluation of Competing Interests."</p> <p>You are responsible for recognizing and disclosing on behalf of all authors any competing interest that could be perceived to bias their work, acknowledging all financial support and any other relevant financial or competing interests.</p> <p>If no competing interests exist, enter: "The authors have declared that no competing interests exist."</p> <p>If you have competing interests to declare, please fill out the text box completing the following statement: "I have read the journal's policy and have the following conflicts"</p> <p>* typeset</p>	
<p>Financial Disclosure</p> <p>Describe the sources of funding that have supported the work. Please include relevant grant numbers and the URL of any funder's website. Please also include this sentence: "The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript." If this statement is not correct, you must describe the role of any sponsors or funders and amend the aforementioned sentence as needed.</p> <p>* typeset</p>	<p>This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI0900547), SDCSD of University of Barcelona and AECC-Catalunya 2013. Rut Tejero, Anna Cordeiro, Marc Ruiz-Martinez are APIF fellows of University of Barcelona.</p>
<p>Ethics Statement</p> <p>All research involving human participants must have been approved by the authors' institutional review board or equivalent committee(s) and that board must be named by the authors in the manuscript. For research involving human participants, informed consent must have been obtained (or the reason for lack of consent explained, e.g. the data were analyzed anonymously) and all clinical</p>	<p>Approval for the study was obtained from the Clinical Research Ethics Committee of the Hospital Clínic de Barcelona (CEIC Hospital Clínic), and written informed consent was obtained from each participant in accordance with the Declaration of Helsinki.</p>

investigation must have been conducted according to the principles expressed in the [Declaration of Helsinki](#). Authors should submit a statement from their ethics committee or institutional review board indicating the approval of the research. We also encourage authors to submit a sample of a patient consent form and may require submission of completed forms on particular occasions.

All animal work must have been conducted according to relevant national and international guidelines. In accordance with the recommendations of the Weatherall report, "[The use of non-human primates in research](#)" we specifically require authors to include details of animal welfare and steps taken to ameliorate suffering in all work involving non-human primates. The relevant guidelines followed and the committee that approved the study should be identified in the ethics statement.

Please enter your ethics statement below and place the same text at the beginning of the Methods section of your manuscript (with the subheading Ethics Statement). Enter "N/A" if you do not require an ethics statement.

07 May 2014

Dr Srikumar P Chellappan
PLOS ONE

RE: PONE-D-14-09142: "miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma"

Dear Dr Chellappan:

Thank you for your letter of 2 April 2014, informing us of the reviewers' comments on our referenced manuscript. We have modified the manuscript based on these comments as follows:

Academic Editor:

- This manuscript was reviewed by two scientists who are experts in the field. While they find merit in the study, one reviewer has pointed out that the validation studies were conducted in only one cell line. It is strongly recommended that the validity of the findings be established in a panel of NSCLC cell lines. While novelty is not a criteria for publication in PLOS One, the authors are expected to cite all the relevant publications on the specific topic and place the current study in the proper context. One reviewer has pointed out multiple publications on the topic that are not cited. The second reviewer has raised a question regarding the p values; an adequate explanation is needed for this as well. We look forward to receiving the revised manuscript.*

Our reply: In accordance with the academic editor's and the reviewers' suggestions, we have performed all the *in vitro* experiments in two additional cell lines (A-549 and HCC-44). The results obtained in the new cell lines are in line with those reported for the H23 cell line. We have also referenced all the relevant publications suggested by reviewer #1 and we have answered all the statistical questions raised by reviewer #2.

Reviewer #1:

- The authors have analyzed 155 adenocarcinoma patients and screened for miRNAs that can serve as markers for early stage NSCLC. They have specifically investigated the miR200 family members and their association with EMT/MET. The major part of the manuscript has focused on miR200c and not miR141.*

The authors have mentioned in the abstract “The prognostic role and function of miR-200 family in early-stage NSCLC adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (SCC) have not been well established. miR200c has been well studied in the recent years and there are many articles published on NSCLC. The functional role of miR200c has been reported in the article “Loss of miR-200c Expression Induces an Aggressive, Invasive, and Chemoresistant Phenotype in Non–Small Cell Lung Cancer. Ceppi et al MCR 2010.” The above article investigated the expression of miR-200c in a panel of NSCLC cell lines (n = 9), and a strong inverse correlation with invasion was detected. Reintroduction of miR-200c into highly invasive/aggressive NSCLC cells induced a loss of the mesenchymal phenotype by restoring E-cadherin and reducing N-cadherin expression, and inhibited in vitro cell invasion as well as in vivo metastasis formation. They have produced some important conclusions with respect to miR200c across various cell lines. Other articles mentioned below have already studied in detail miR200c in NSCLC patients.

“High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. Liu et al 2012”. The study suggests that tumor miR-21, miR-141, miR-200c, and serum miR-21 may be potential biomarkers for diagnosis and prognosis of NSCLC patients.

The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. Pacurari IJC 2013.

With already well published results on miR200c the novelty of the work in the author’s manuscript doesn’t stand. Moreover, the results and conclusions were based on validation with just one cell line. Also the authors have failed to mention the above articles in their manuscript.

With these limitations, I suggest the article not suitable for publication in PLoS one.

Our reply: In the present work, as stated by this reviewer, we have analyzed the prognostic role of miR-200 family and their implications in MET/EMT. We have focused our study on both miR-141 and miR-200c. Firstly, we identified only miR-141 and miR-200c as prognostic markers in the adenocarcinoma subgroup. Secondly, we observed by scratching assay that miR-200c had a greater impact on migration than miR-141, as we have now shown in three cell lines, none of which were included in the paper by Ceppi *et al*, where the authors only state the involvement of miR-200c in migration and invasiveness. Moreover, since miR-141 does not play a crucial role in cell migration, we decided to study the potential relation of this miRNA with angiogenesis. We showed that in hypoxia conditions the overexpression of miR-141 is related to VEGFA release by NSCLC cell lines, and in the patients with high miR-141 we observed higher microvessel density than in the other patients.

It is true that our results and conclusions were based on only one cell line, and we have now included two additional cell lines, with results that validate our original results. We have included this information in the revised version of the manuscript. Moreover, we have included the two missing references by Ceppi *et al* and Pacurari *et al*. (The article by Liu *et al*. was already included in the original version.) However, we would like to point out that Pacurari’s results were obtained in patients with squamous cell carcinoma rather than adenocarcinoma.

Reviewer #2:

Solid manuscript correlating miRs 141 and 200c with OS supported by cell line studies. I suggested a few minor revisions.

1. *The authors state that OS for those patients with high levels of miR141 showed a "trend" of poor survival. The p value given was 0.163. Trend is too strong of a word for this result.*

Our reply: We agree with this reviewer and we have eliminated that sentence from the manuscript.

2. *In building the multivariate COX model univariate p-values of ≤ 0.1 were used. Is this standard practice or should the univariate p-values also be significant?*

Our reply: To the best of our knowledge, the inclusion of all significant values or values with potential significance ($p < 0.1$) is a standard practice in survival analysis using Cox Model in oncology (Veronica Monsálvez, et al. Modern Pathology 2013; John G. Edwards et al. Clinical Cancer Research 2002; Oleksey P. Kolesnik et al. Advances in Lung Cancer 2014). However, in response to the reviewer's comment, we have performed the multivariate analysis including only the significant factors (Entire cohort: Stage, Age, miRNA score; ADK cohort: Age >65 and microRNA Score). The results are shown here:

ENTIRE COHORT		
OS	OR (95% CI)	P
Stage >I	2.17 (1.051-4.489)	0.036
Age >65	2.817(1.488-5.336)	0.001
High-risk miR-141/miR-200c score	2.751 (1.074-7.047)	0.035
ADENOCARCINOMA		
OS	OR (95% CI)	P
Age >65	3.693 (1.420-9.601)	0.007
High-risk miR-141/miR-200c score	10.649 (2.433-46.608)	0.002



3. *Background section of the abstract is poorly formed and should be re-written.*

Our reply: We have improved the background section of the abstract.

We have submitted a clean copy of the revised manuscript, as well as a copy with the edits tracked. Please let us know if you require any further information at this time.

Sincerely,

Alfons Navarro, PhD

University of Barcelona
School of Medicine
Human Anatomy and Embryology Unit
Casanova 143
08036 Barcelona
Spain
anavarroponz@ub.edu

miR-141 and miR-200c as markers of overall survival in early stage non-small cell lung cancer adenocarcinoma

Rut Tejero^{1*}, Alfons Navarro^{1*}, Marc Campayo², Nuria Viñolas², Ramon M. Marrades³, Anna Cordeiro¹, Marc Ruíz-Martínez¹, Sandra Santasusagna¹, Laureano Molins⁵, Josep Ramirez⁴, Mariano Monzó¹

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ²Department of Medical Oncology, Institut Clinic Malalties Hemato-Oncològiques (ICMHO), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain; ³Department of Pneumology, Institut Clínic del Tórax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBER de Enfermedades Respiratorias (CIBERES), Barcelona, Spain; ⁴Department of Pathology, Centro de Diagnóstico Biomédico (CDB), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, IDIBAPS, CIBERES, Barcelona, Spain; ⁵Department of Thoracic Surgery, Institut Clínic del Tórax (ICT), Hospital Clinic de Barcelona, University of Barcelona, Barcelona, Spain

* R. Tejero and A. Navarro equally contributed to this article.

Corresponding Authors: Alfons Navarro, Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, Casanova 143, 08036 Barcelona, Spain. Phone: 0034-93-402-1903; Fax: 0034-93-403-5263; E-mail: anavarroponz@ub.edu; and Mariano Monzó, E-mail: mmonzo@ub.edu.

Running title: miR-200c and miR-141 as prognostic markers in NSCLC adenocarcinoma

Key words: NSCLC, adenocarcinoma, miR-200c, miR-141, overall survival, VEGF, angiogenesis, EMT, MET

Abstract

Background

Several treatments in non-small cell lung cancer (NSCLC) are histology-dependent, and the need for histology-related markers is increasing. MicroRNAs (miRNAs) are promising molecular markers in multiple cancers and show differences in expression depending on histological subtype. The miRNA family miR-200 has been associated with the regulation of epithelial-mesenchymal (EMT)/mesenchymal-epithelial transition (MET). EMT involves profound phenotypic changes that include the loss of cell-cell adhesion, the loss of cell polarity, and the acquisition of migratory and invasive properties that facilitates metastasis. A dual role for the miR-200 family in the prognosis of several tumors has been related to tumor cell origin. However, the prognostic role and function of miR-200 family in early-stage NSCLC adenocarcinoma and squamous cell carcinoma (SCC) have not been well established.

Methods

miRNA expression was determined using TaqMan assays in 155 tumors from resected NSCLC patients. Functional studies were conducted in three NSCLC cell lines: H23, A-549 and HCC-44.

Results

High miR-200c expression was associated with shorter overall survival (OS) in the entire cohort ($p=0.024$). High miR-200c ($p=0.0004$) and miR-141 ($p=0.009$) expression correlated with shorter OS in adenocarcinoma – but not in SCC. In the multivariate analysis, a risk score based on miR-141 and miR-200c expression emerged as an independent prognostic factor for OS in the entire cohort (OR, 2.787; $p=0.033$) and in adenocarcinoma patients (OR, 10.649; $p=0.002$).

Functional analyses showed that miR-200c, was related to mesenchymal-epithelial transition (MET) and affected cell migration and E-cadherin levels, while overexpression of miR-141 reduced *KLF6* protein levels and produced an increase of secretion of *VEGFA in vitro* (H23, $p=0.04$; A-549, $p=0.03$; HCC-44, $p=0.02$) and was associated with higher blood microvessel density in patient tumor samples ($p<0.001$).

Conclusion

High miR-141 and miR-200c expression are associated with shorter OS in NSCLC patients with adenocarcinoma through MET and angiogenesis.

Introduction

Lung cancer is the most common cause of cancer death, with more than 226,000 new cases in the United States in 2012 [1]. Eighty percent of lung cancers are non-small-cell lung cancer (NSCLC) [2], which has a 5-year survival of only 10% overall and 60-70% in stage I patients, highlighting the need for novel diagnostic and therapeutic strategies. Surgical resection, when possible, remains the only curative treatment for early-stage NSCLC. However, nearly 50% of resected patients experience recurrence and have a dismal prognosis [2]. Several novel treatments in NSCLC are histology-dependent, and squamous cell carcinoma (SCC) responds somewhat differently than adenocarcinoma to certain treatment regimens[3,4] [5]. However, few histology-dependent prognostic biomarkers are available for routine use in clinical practice, especially in resectable patients.

In recent years, microRNAs (miRNAs) have emerged as promising molecular markers in multiple cancers, including NSCLC [6]. Specific miRNAs have been described as histology-specific prognostic markers for SCC (miR-146b and miR-155) [7] or adenocarcinoma (miR-21) [8].

The miR-200 family is composed of five members located in two different clusters: miR-200a, miR-200b and miR-429 comprise cluster 1(chromosome 1), and miR-200c and miR-141 comprise cluster 2 (chromosome 12). All five miRNAs have been associated with the regulation of epithelial-mesenchymal (EMT)/mesenchymal-epithelial transition (MET) [9]. EMT involves profound phenotypic changes that include the loss of cell-cell adhesion, the loss of cell polarity, and the acquisition of migratory and invasive properties [10]. This process is fundamental for embryonic

development and is also involved in tumor invasion and metastasis [11]. The miR-200 family act through their targets ZEB1 and ZEB2 [9] and TGF- β 2 [12]. The miRNAs are thus able to enforce the epithelial phenotype through post-transcriptional repression of these genes, allowing the expression of E-cadherin and of polarity factors necessary for the formation of cell-cell junctions. The miR-200 family seems to have a dual role in patient prognosis. Overexpression of the miR-200 family acts as a marker of better outcome in gastric and ovarian cancers [13,14,15]. In breast cancer [16] and NSCLC [17] in contrast, high expression of the miR-200 family is associated with shorter survival. In breast cancer, the miR-200 family promotes metastasis through an non-E-cadherin-related mechanism, targeting *SEC23A*, which mediates secretion of metastasis-suppressive proteins[16]. However, the role of high miR-200 levels in NSCLC has not yet been elucidated.

In the present work, we have analyzed the role of members of the miR-200 family in tumors from resected NSCLC patients and correlated our findings with overall survival (OS) after surgery, both in the entire cohort and according to histological subtypes. In addition, we have studied the functional implications of the prognostic markers in NSCLC cell lines.

Results

Patients

Table 1 shows the main clinical characteristics for all 155 patients. Median age was 65 years (range, 35–85) and 87% were males. Twenty-one (13.6%) patients had Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status (PS) 0, and 132 (85.2%) had PS 1. Ninety-four (60.6%) patients had stage I disease. Seventy-three (47.1%) patients had adenocarcinoma and 70 (45.1%) SCC. One hundred and thirty-eight (89%) patients were current or former smokers. Twenty (12.9%) patients received adjuvant chemotherapy (16 for stage II or III disease and four for stage I disease with T>4 cm). Median follow-up was 43 months (range, 2-160). After a follow-up of 160 months, 70 (45.2%) patients had relapsed.

miR-200 family expression and clinical characteristics

Paired tumor and normal tissue samples were obtained from 155 NSCLC patients. The five members of miR-200 are found in two clusters: miR-200a/b, and miR-429 (cluster 1) and miR-200c and miR-141 (cluster 2). All members of the miR-200 family, except miR-141, were downregulated in tumor compared to normal tissue (miR-200a, $p=0.043$; miR-200b, $p<0.001$; miR-429, $p=0.003$; miR-200c, $p<0.001$) (Supplemental Figure 1).

Patients with PS 1-2 showed higher levels of miR-429 ($p=0.039$) than those with PS 0. Current smokers had lower levels of miR-200a ($p=0.027$) and miR-429 ($p=0.032$) than never-smokers or former smokers.

miR-141 and miR-200c as markers of OS

Using the cutoffs defined by the Maxstat package of R, we classified patients as having high or low expression levels of the five miRNAs. Among the 155 patients in the entire cohort, those with high levels of miR-200c showed a shorter OS ($p=0.024$; Figure 1A). Among the 94 patients with stage I disease, high levels of miR-200c ($p=0.019$; Figure 1B) and miR-141 ($p=0.03$; Figure 1C) were both associated with shorter OS. No significant differences in OS were identified according to the expression levels of the remaining miRNAs.

miR-141 and miR-200c in adenocarcinoma

No differences in OS were observed according to the expression levels of either miR-141 or miR-200c in patients with SCC (Figure 2A and 2B). However, among patients with adenocarcinoma, the miRNAs identified two well-differentiated groups. Mean OS for adenocarcinoma patients with high miR-200c expression was 61.2 months (95% CI=42.9-79.5), while it was 145.5 months (95% CI=134.4-156.6) for those with low levels ($P<0.001$; Figure 2C). Mean OS for adenocarcinoma patients with high miR-141 expression was 71.7 months (95% CI=44.9-81.6), while it was 136.9 months (95% CI=110.9-1162.9) for those with low levels ($p=0.009$; Figure 2D).

We then analyzed the combinatory effect of miR-141 and miR-200c by generating a risk score based on expression levels of both miRNAs. Patients with high levels of both miRNAs were classified as high-risk, those with low levels of both miRNAs as low-risk, and those with other combinations as intermediate-risk. Five year OS was 49.4% for high-risk patients, 66.7% for intermediate-risk patients, and 100% for low-risk patients ($p=0.002$; Figure 3).

miR-200c has a greater impact on cell migration than miR-141

Cell migration was measured by *in vitro* scratch assay after transfection with pre-miR-200c, pre-miR-141 or pre-miRNA negative control. High levels of miR-200c reduced cell migration in comparison with control in the H23 cell line ($p=0.005$), A-549 ($p=0.0085$) and HCC-44 ($p=0.013$) (Figure 4A). No significant differences were observed for miR-141, except in A-549 ($p=0.043$). After transfection, E-cadherin levels were analyzed by immunohistochemistry (Figure 4B) and increased levels were observed in cells transfected with pre-miR-200c. **miR-141 negatively regulates KLF6, leading to increased VEGFA levels *in vitro*, and is related to higher microvessel density in patient samples**

Since miR-141 overexpression had previously been related to higher blood vessel formation in ovarian tumors of mouse models [18], we examined the potential impact of this mechanism on the prognostic role of miR-141 in NSCLC. Using TargetScan 6.2, we identified KLF6 as a putative target of miR-141 but not of miR-200c. Immunoblotting of KLF6 in H23 cells transfected with pre-miR-141 or pre-miR-200c showed that only miR-141 significantly reduced the KLF6 protein levels at 24h (Figure 5A). Since KLF6 regulates the expression and secretion of VEGFA, a critical angiogenic factor [19], we examined the effect of increasing miR-141 expression levels on VEGFA levels. We overexpressed both miR-141 and miR-200c in the H23, A-549 and HCC-44 NSCLC cell lines and treated the cells with DFX to produce hypoxia. After 48 hours, we analyzed the protein levels of VEGFA in the supernatant of these cells. The overexpression of miR-141 produced a mean increase of 28% in release of VEGFA (H23, $p=0.04$; A-549, $p=0.03$, HCC-44, $p=0.02$), while no

significant differences were observed for miR-200c, except in the HCC-44 cell line ($p=0.04$) (Figure 5B).

We then sought to determine if there exists a relation between miR-141 expression levels and the number of blood vessels in patient samples. After determining the number of blood vessels in tumor samples from 29 patients by immunohistochemistry, using an antibody against CD34+, which is a marker of the blood vessel endothelium (Figure 5C), we classified the tumor samples in two groups: high or low levels of miR-141. The mean number of blood vessels in tumors with high levels was 22% higher than the mean in tumors with low levels ($P<0.001$; Figure 5D).

Multivariate analyses

In the multivariate analysis in the entire cohort, we included all the clinical and biological factors with univariate $P\leq 0.1$ and the risk score based on miR-141 and miR-200c expression. The miR-141/miR-200c risk score (high-risk vs others) emerged as an independent prognostic marker of shorter OS (OR, 2.787; 95% CI=1.087-7.148; $p=0.033$), together with stage > I and age > 65 (Table 2).

In the multivariate analysis including only adenocarcinoma patients, the miR-141/miR-200c risk score was also an independent prognostic factor for OS (OR, 10.649; 95% CI=2.433-46.608; $p=0.002$) together with age > 65 (Table 2).

Discussion

In the present work, we have found that high miR-141 and miR-200c expression are associated with shorter survival in resected NSCLC adenocarcinoma patients, including those with early-stage disease. Moreover, the combinatory effect of the two miRNAs was an independent prognostic factor for OS. Different mechanisms are involved in the effect of these miRNAs; while miR-141 seems to act through angiogenesis by inhibiting *KLF6* and increasing *VEGFA* levels, miR-200c plays a role in the regulation of MET.

Recently, a phenotypic plasticity has been postulated for transient EMT-MET processes [20]. Induction of MET by overexpression of miR-200 family members is important at a later point in the metastasis process. While EMT allows the cell to migrate from the primary tumor, MET enables it to colonize and produce metastases in distant organs [10,11]. Thus, both downregulation and overexpression of miR-200 family members have been related to worse prognosis. In order to investigate if the regulation of MET by miR-141 and miR-200c was histology-dependent, we examined their prognostic value in the two major histological subtypes and found both miR-141 and miR-200c were related to OS only in adenocarcinoma patients. It has been observed that NSCLC adenocarcinoma is a more mesenchymal-like tumor type, since it has been observed that vimentin, a marker of mesenchymal cells, was overexpressed in well differentiated adenocarcinomas and in the H23, A-549 and HCC-44 cell lines, but not detected in SCC tissues [21,22]. In line with our results, miR-200c overexpression as a marker of poor prognosis was previously reported in a cohort of 70 NSCLC patients comprised of both adenocarcinoma and SCC histologies [17], but its prognostic value was not examined in the subgroup of patients with

adenocarcinoma. In other tumor models, such as breast cancer, overexpression of miR-200 family members led to increased metastasis [23] and is associated with poor prognosis [16]. In addition, high serum levels of miR-141 have been associated with poor prognosis in colon cancer [24] and high levels of miR-200c with poor prognosis in gastric cancer [25]. In contrast, a work using data from an online TCGA database reported that low levels of miR-200b*, miR-200a and miR-429 were related to shorter OS in a heterogeneous cohort of NSCLC patients that included those with metastatic disease [26].

Since miRNAs modulate the levels of multiple target proteins depending on their sequence, their effect is dependent on the proteins expressed in each cellular type [27]. Both miR-141 and miR-200c are located in the same chromosomal region (12p13.31) and share the same transcription starting site [28], but if we group the miRNAs of the miR-200 family according to the similarity of their seed sequence, we can identify two different clusters – miR-200bc/429 and miR-200a/141 – which are differentiated by a single nucleotide change [29]. Although miR-141 and miR-200c are transcriptionally regulated in the same way, they differ in their targets. When we analyzed the role of miR-141 and miR-200c in EMT/MET in the H23, A-549 and HCC-44 cell lines, only miR-200c influenced EMT in all three cell lines. Overexpression of miR-200c increased the protein levels of E-cadherin and reduced the migration capacity of the tumor cells, as was previously shown by Ceppi *et al* in a different panel of NSCLC cell lines. Ceppi *et al* investigated the expression of miR-200c *in vitro* and *in vivo* and a strong inverse correlation with invasion was detected. Reintroduction of miR-200c into highly invasive/aggressive NSCLC cells induced a loss of the mesenchymal phenotype by restoring E-cadherin and reducing N-cadherin expression, and inhibited *in vitro* cell invasion as well as *in vivo* metastasis formation

[30]. Moreover, Pacurari et al. found that miR-200c downregulation in SCC lung tumor samples was correlated with increased levels of DCL1, ATRX and HFE – biomarkers related to EMT [31].

Although miR-141 is a mir-200 family member, it was not involved in EMT/MET. The *in vitro* overexpression of miR-141 was related to reduction of *KLF6* protein levels, producing an increase in the secretion of *VEGFA*. Moreover, tumors with high levels of miR-141 had a higher number of blood vessels. It has been shown that cancer-associated fibroblasts (CAFs) isolated from murine lung adenocarcinomas secreted abundant *VEGFA* and enhanced tumor cell invasion in coculture studies [32]. When we analyzed the expression of miR-141 in tumor and paired normal tissue, we did not observe significant differences in expression levels, leading us to speculate that the prognostic role of miR-141 may be related to its expression in CAF cells rather than in tumor cells. The overexpression of miR-141 would lead to overproduction of *VEGFA* and increased neoangiogenesis, which have previously been related to prognosis in NSCLC [33].

Materials and Methods

Study population and ethics statement

One hundred and fifty-five adult patients diagnosed with NSCLC who underwent complete surgical resection at Hospital Clinic in Barcelona, Spain between March 1996 and December 2009 were included in the study. Approval for the study was obtained from the center's institutional review board, and written informed consent was obtained from each participant in accordance with the Declaration of Helsinki.

RNA extraction and miRNA analysis

Total RNA and miRNA detection was performed from FFPE tumor tissues as previously described [34]. MiRNA detection was performed using commercial assays (TaqMan MicroRNA assays, Applied Biosystems).

Western Blot analysis

Western Blot analysis was performed as previously described [35] using the following primary antibodies: KLF6 sc-7158 (Santa Cruz Biotechnology) and α -tubulin (Sigma).

Immunohistochemistry

The immunohistochemical assay, were performed as previously described [36] using a Flex Monoclonal Mouse Anti-Human CD34 Class II clone QBend 10 Ready-to-Use (Dako) and Monoclonal Mouse Anti-Human E-Cadherin Clone NCH-38 (Dako).

Blood vessel quantification

Four independent areas were selected under a 40X field, and a 200X field (0.785 mm² per field) and used to count CD34-positive vessels in each of these areas. Two independent pathologists examined the slides, and the average of four 200X field counts of CD34-positive vessels was recorded.

Cell lines, miRNA transfection and VEGF quantification

H23 (American Type Culture Collection) and HCC-44 (DSMZ) cells were cultured in RPMI 1640 (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum (Invitrogen). A-549(DSMZ) cells were cultured in DMEM (Invitrogen) containing 10% fetal calf serum.

One day before transfection, 7×10^4 cells were seeded in 6-well plates. The following day, cells were transfected with 100nM pre-miR-141/200c or pre-miR-Negative Control#2 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). At 24h post-transfection, cells were treated with 400 μ M desferrioxamine to induce hypoxic conditions. After 24h incubation, VEGF concentration in supernatants was measured in triplicate using the VEGF Human Elisa Kit (ab100662, Abcam).

Cell migration analysis

Cell migration was measured by *in vitro* scratch assay [37]. 5×10^5 cells were plated in a 12-well plate one day before transfection with pre-miRNAs. Twenty-four hours after transfection, the cell monolayer was scraped in a straight line to create a “scratch” with a p100 pipet tip. The migration distance (μ m) was assessed at 36h (HCC-44) or at 48h (H23 and A-549) after transfection using cellSense Entry 1.7 software (Olympus).

Statistical analyses

OS was calculated from the time of surgery to the date of death or last follow-up. Kaplan-Meier curves for OS, with their 95% confidence intervals (CIs), were drawn and compared by means of a log-rank test. All factors with a p-value<0.1 in the univariate analysis were included in the Cox multivariate regression analyses for OS.

Paired t-test was used to compare expression levels of miRNAs between tumor tissue and paired normal tissue. Non-paired t-test was used to compare differences between two groups. Optimal cutoffs of miRNA expression data for OS were assessed by means of maximally selected log-rank statistics using the Maxstat package (R package). The applicability of these cutoffs was confirmed by the Kaplan-Meier test. All statistical analyses were performed using PASW Statistics v18 (SPSS) and R v2.8.1. The level of significance was set at ≤ 0.05 .

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

R.T. performed the research and wrote the paper; A.N. designed the research, analyzed the data, and wrote the manuscript; M.C., N.V., R.M. and L.M. selected cases and analyzed the clinical data; A.C., M.R-M. and S.S. performed the research; J.R. provided samples and performed the histopathological review; M.M. designed and supervised the research. All authors have seen and approved this final version of the manuscript and agree with the decision to submit.

Acknowledgments

This work was supported by grants from Instituto de Salud Carlos III (FIS-PI0900547), SDCSD of University of Barcelona and AECC-Catalunya 2013. Rut Tejero, Anna Cordeiro, Marc Ruiz-Martinez are APIF fellows of University of Barcelona.

References

1. Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2012) Cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*.
2. Goldstraw P, Ball D, Jett JR, Le Chevalier T, Lim E, et al. (2011) Non-small-cell lung cancer. *The Lancet* 378: 1727-1740.
3. Travis WD (2004) Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart: *Iarc*.
4. Scagliotti G, Hanna N, Fossella F, Sugarman K, Blatter J, et al. (2009) The differential efficacy of pemetrexed according to NSCLC histology: a review of two Phase III studies. *The oncologist* 14: 253-263.
5. Patel J, Hensing T, Villafor V, Hart E, Bonomi P (2007) Pemetrexed and carboplatin plus bevacizumab for advanced non-squamous non-small cell lung cancer (NSCLC): Preliminary results. *J Clin Oncol* 25: 7601.
6. Campayo M, Navarro A, Vinolas N, Diaz T, Tejero R, et al. (2012) Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavorable prognosis in resected NSCLC. *Eur Respir J*.
7. Raponi M, Dossey L, Jatkoe T, Wu X, Chen G, et al. (2009) MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer research* 69: 5776-5783.
8. Saito M, Schetter AJ, Mollerup S, Kohno T, Skaug V, et al. (2011) The Association of MicroRNA Expression with Prognosis and Progression in Early-Stage, Non-Small Cell Lung Adenocarcinoma: A Retrospective Analysis of Three Cohorts. *Clinical Cancer Research* 17: 1875-1882.
9. Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, Barry SC, Tsykin A, et al. (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature cell biology* 10: 593-601.
10. Thiery JP, Acloque H, Huang RYJ, Nieto MA (2009) Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139: 871-890.
11. Navarro A, Monzó M (2010) MicroRNAs in human embryonic and cancer stem cells. *Yonsei medical journal* 51: 622-632.
12. Burk U, Schubert J, Wellner U, Schmalhofer O, Vincan E, et al. (2008) A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. *EMBO reports* 9: 582-589.
13. Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, Iglesias-Díaz P, Lorenzo-Patiño MJ, et al. (2012) Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of Translational Medicine* 10: 186.
14. Chen J, Tian W, Cai H, He H, Deng Y (2011) Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. *Medical Oncology*: 1-8.
15. Hu X, Macdonald DM, Huettnner PC, Feng Z, El Naqa IM, et al. (2009) A miR-200 microRNA cluster as prognostic marker in advanced ovarian cancer. *Gynecologic oncology* 114: 457.
16. Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, Ibrahim T, Blanco MA, et al. (2011) Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nature medicine* 17: 1101-1108.

17. Liu X-G, Zhu W-Y, Huang Y-Y, Ma L-N, Zhou S-Q, et al. (2012) High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Medical Oncology* 29: 618-626.
18. Mateescu B, Batista L, Cardon M, Gruosso T, de Feraudy Y, et al. (2011) miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nature medicine* 17: 1627-1635.
19. DiFeo A, Narla G, Hirshfeld J, Camacho-Vanegas O, Narla J, et al. (2006) Roles of KLF6 and KLF6-SV1 in ovarian cancer progression and intraperitoneal dissemination. *Clinical Cancer Research* 12: 3730-3739.
20. Brabletz T (2012) To differentiate or not—routes towards metastasis. *Nature Reviews Cancer* 12: 425-436.
21. Upton MP, Hirohashi S, Tome Y, Miyazawa N, Suemasu K, et al. (1986) Expression of vimentin in surgically resected adenocarcinomas and large cell carcinomas of lung. *The American journal of surgical pathology* 10: 560-567.
22. Kawai T, Torikata C, Suzuki M (1988) Immunohistochemical study of pulmonary adenocarcinoma. *American journal of clinical pathology* 89: 455-462.
23. Dykxhoorn DM, Wu Y, Xie H, Yu F, Lal A, et al. (2009) miR-200 enhances mouse breast cancer cell colonization to form distant metastases. *PLoS One* 4: e7181.
24. Cheng H, Zhang L, Cogdell DE, Zheng H, Schetter AJ, et al. (2011) Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS One* 6: e17745.
25. Valladares-Ayerbes M, Reboredo M, Medina-Villaamil V, Iglesias-Díaz P, Lorenzo-Patiño MJ, et al. (2012) Circulating miR-200c as a diagnostic and prognostic biomarker for gastric cancer. *Journal of Translational Medicine* 10: 1-14.
26. Pecot CV, Rupaimoole R, Yang D, Akbani R, Ivan C, et al. (2013) Tumour angiogenesis regulation by the miR-200 family. *Nature communications* 4.
27. Bartel DP (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136: 215-233.
28. Wang G, Guo X, Hong W, Liu Q, Wei T, et al. (2013) Critical regulation of miR-200/ZEB2 pathway in Oct4/Sox2-induced mesenchymal-to-epithelial transition and induced pluripotent stem cell generation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110: 2858-2863.
29. Uhlmann S, Zhang J, Schwäger A, Mannsperger H, Riazalhosseini Y, et al. (2010) miR-200bc/429 cluster targets PLCγ1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene* 29: 4297-4306.
30. Ceppi P, Mudduluru G, Kumarswamy R, Rapa I, Scagliotti GV, et al. (2010) Loss of miR-200c expression induces an aggressive, invasive, and chemoresistant phenotype in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer Research* 8: 1207-1216.
31. Pacurari M, Addison JB, Bondalapati N, Wan Y-W, Luo D, et al. (2013) The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. *International journal of oncology* 43: 548-560.

32. Roybal JD, Zang Y, Ahn Y-H, Yang Y, Gibbons DL, et al. (2011) miR-200 Inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1. *Molecular Cancer Research* 9: 25-35.
33. Bremnes RM, Camps C, Sirera R (2006) Angiogenesis in non-small cell lung cancer: the prognostic impact of neoangiogenesis and the cytokines VEGF and bFGF in tumours and blood. *Lung cancer* 51: 143-158.
34. Gallardo E, Navarro A, Vinolas N, Marrades RM, Diaz T, et al. (2009) miR-34a as a prognostic marker of relapse in surgically resected non-small-cell lung cancer. *Carcinogenesis* 30: 1903-1909.
35. Diaz T, Navarro A, Ferrer G, Gel B, Gaya A, et al. (2011) Lestaurtinib inhibition of the Jak/STAT signaling pathway in hodgkin lymphoma inhibits proliferation and induces apoptosis. *PLoS One* 6: e18856.
36. Artells R, Navarro A, Diaz T, Monzó M (2011) Ultrastructural and Immunohistochemical Analysis of Intestinal Myofibroblasts During the Early Organogenesis of the Human Small Intestine. *The Anatomical Record* 294: 462-471.
37. Liang CC, Park AY, Guan JL (2007) In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc* 2: 329-333.

Table 1. Main patient characteristics.

Characteristic	Value	N=155 N (%)
Sex	Male	135 (87)
	Female	20 (13)
Age	≤65	74 (47.8)
	>65	81 (52.2)
ECOG Performance Status	0	21 (13.6)
	1	132 (85.2)
	2	2 (1.2)
Disease Stage	I	94 (60.6)
	II	34 (22)
	III	27 (17.4)
Histology	Adenocarcinoma	73 (47.1)
	Squamous cell carcinoma	70 (45.1)
	Others	12 (7.8)
Smoking History	Current smoker	61 (39.3)
	Former smoker	77 (49.7)
	Never smoker	9 (5.8)
	Unknown	8 (5.2)
Type of Surgery	Lobectomy/Bilobectomy	121 (78.1)
	Pneumonectomy	25 (16.1)
	Atypical resection	9 (5.8)
Adjuvant Chemotherapy	Yes	20 (12.9)
	No	135 (87.1)
Recurrence	No	85 (54.8)
	Yes	70 (45.2)
TP53 mutated	Yes	32 (62.6)
	No	97 (20.6)
	Unknown	26 (16.8)

Table 2. Multivariate analysis for OS in the entire cohort (N=155) and in the subgroup of patients with adenocarcinoma (N=73).

ENTIRE COHORT		
OS	OR (95% CI)	P
Male sex	2.773 (0.949-8.100)	0.062
Stage >I	2.58 (1.178-5.494)	0.017
Age >65	2.629 (1.374-5.029)	0.003
High-risk miR-141/miR-200c score	2.787 (1.087-7.148)	0.033
ADENOCARCINOMA		
OS	OR (95% CI)	P
Age>65	3.693 (1.420-9.601)	0.007
High-risk miR-141/miR-200c score	10.649 (2.433-46.608)	0.002

Figure Legends

Figure 1. OS analysis in the entire cohort. OS according to (A) miR-200c expression levels in the entire cohort (N=155); (B) miR-200c expression levels in stage I patients (N=94); and (C) miR-141 expression levels in stage I patients (N=94).

Figure 2. OS analysis by histological subtype. Overall survival according to (A) miR-200c expression levels in patients with SCC (N=70); (B) miR-141 expression levels in patients with SCC (N=70); (C) miR-200c expression levels in patients with adenocarcinoma (N=73); and (D) miR-141 expression levels in patients with adenocarcinoma (N=73).

Figure 3. OS in 73 patients with adenocarcinoma according to the miR-141/miR-200c risk score.

Figure 4. Overexpression of miR-200c affects cell migration. (A) After 36 or 48h of transfection with pre-miRNAs in the NSCLC cell lines, cell migration was measured by *in vitro* scratch assay. High levels of miR-200c reduced cell migration in comparison with control in all cell lines (H23, $p=0.005$; A-549, $p=0.0085$; HCC-44, $p=0.013$), while high levels of miR-141 reduced cell migration only in A-549 ($p=0.04$). (B) E-cadherin levels were evaluated by immunohistochemistry and increased levels were observed in cells transfected with pre-miR-200c in comparison with those transfected with pre-miR-141 or pre-miR-control in all three cell lines.

Figure 5. Overexpression of miR-141 negatively regulates KLF6, leading to increased VEGFA levels *in vitro*, and is related to higher microvessel density in patient samples. (A) Immunoblotting of KLF6 in cells transfected with pre-miR-Negative Control or pre-miR-141/200c. miR-141 significantly reduced KLF6 protein

level in the three cell lines. **(B)** After 48h of transfection with pre-miRNAs in hypoxic conditions, VEGFA concentration in the culture supernatant was measured by ELISA. All results represent the mean \pm SEM from 3 independent experiments. **(C)** A total of 29 adenocarcinoma tumor tissue sections were analyzed by immunohistochemistry with CD34+ as vessel marker; two representative cases with high/low levels of miR-141 are shown. **(D)** Significant differences in blood microvessel density between adenocarcinomas with high levels of miR-141 and those with low levels of miR-141 were observed ($p < 0.001$).

Supplemental Figure Legends

Supplemental Figure 1. Expression levels of miR-200 family members obtained from 155 NSCLC tumor and paired normal tissue. **(A)** Cluster 1: miR-200a, miR-200b, and miR-429. **(B)** Cluster 2: miR-141 and miR-200c.

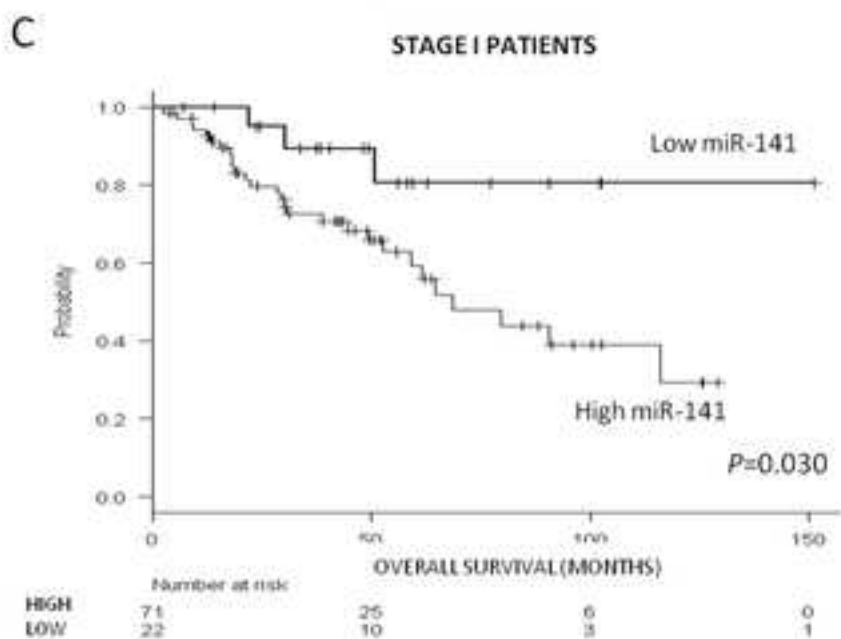
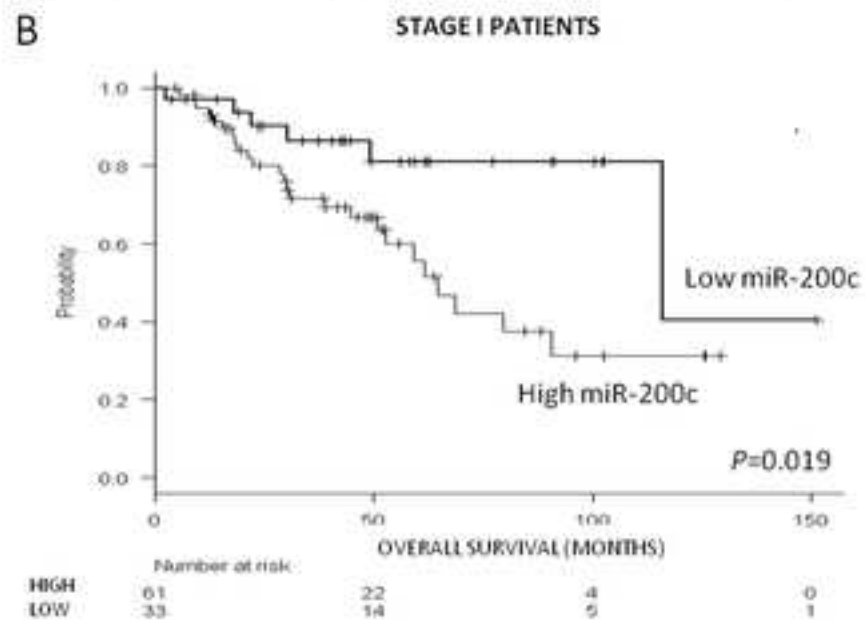
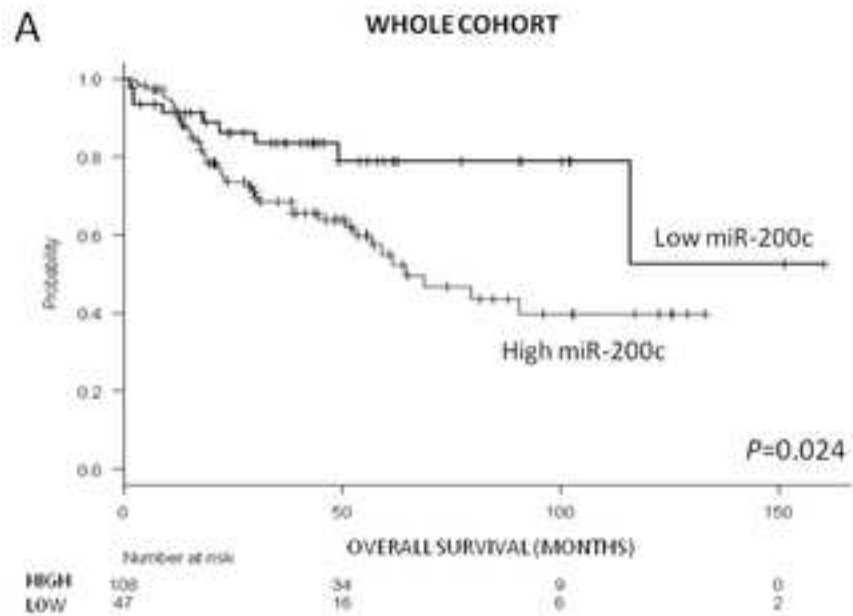


Figure 2

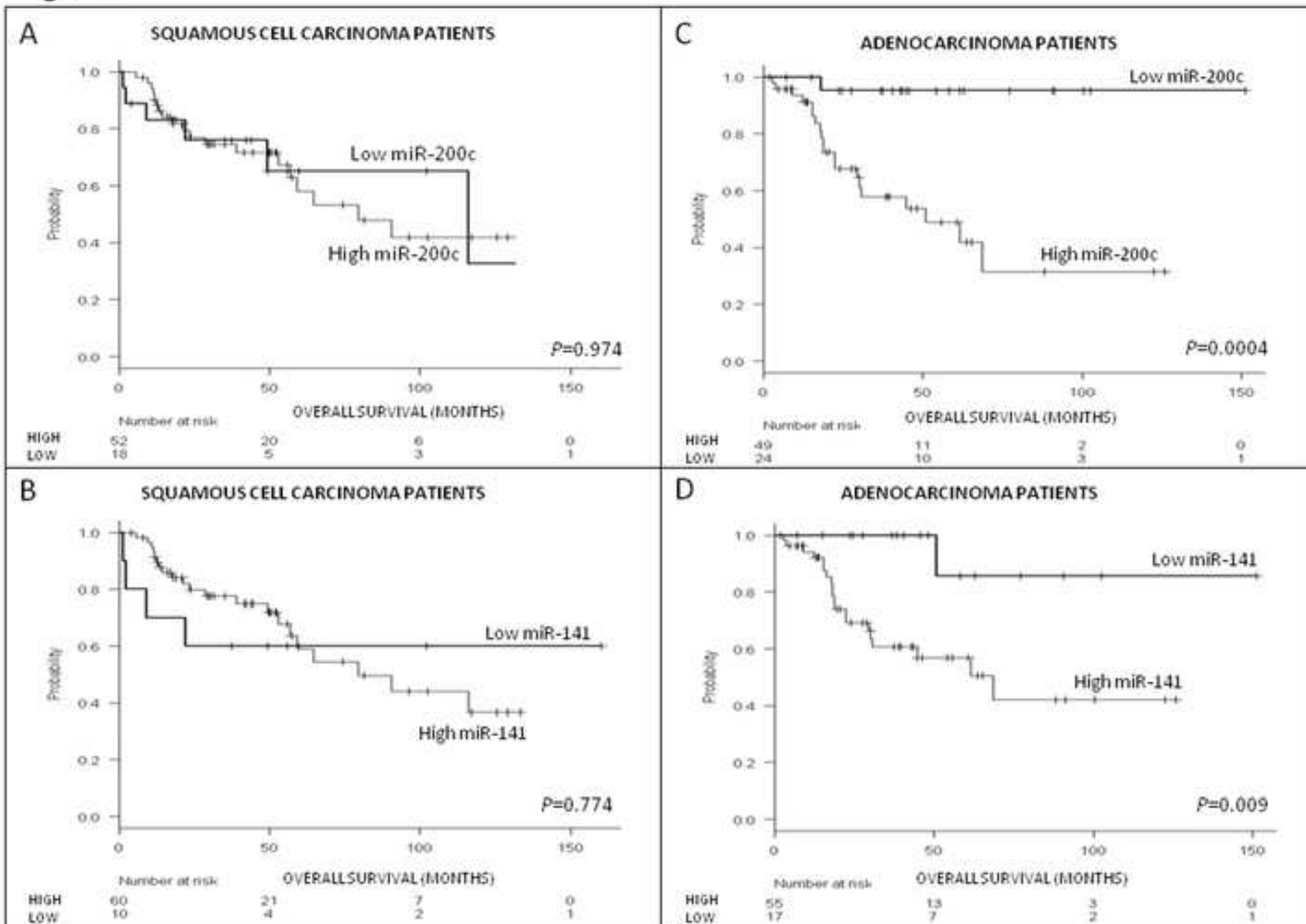
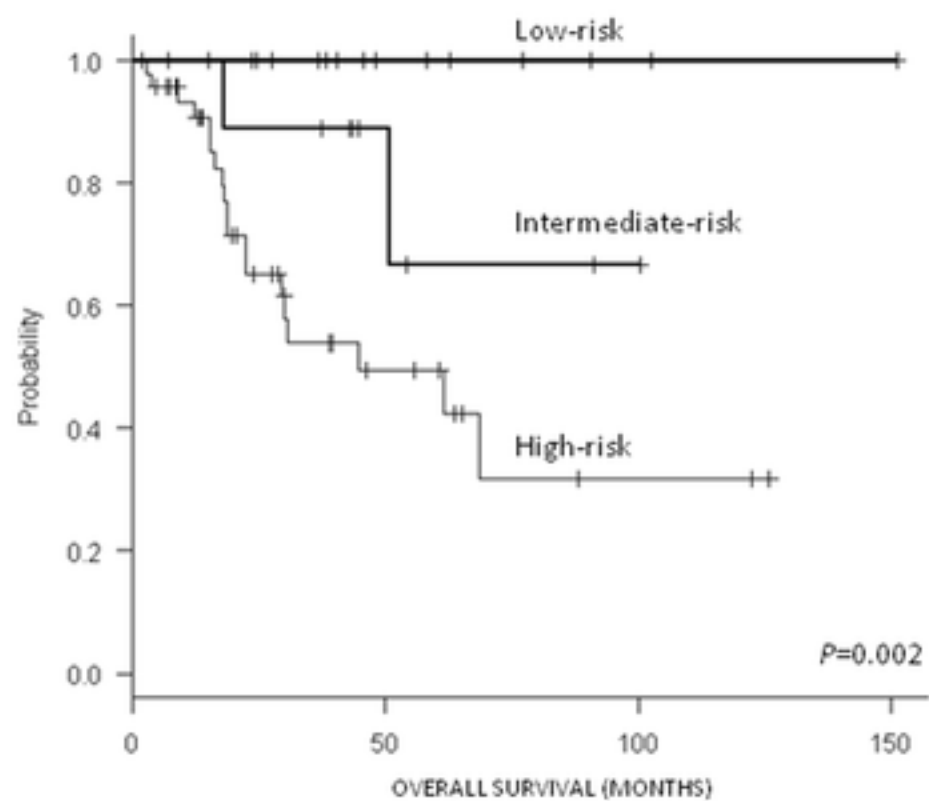


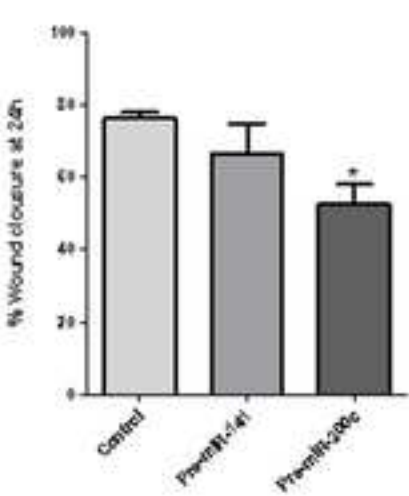
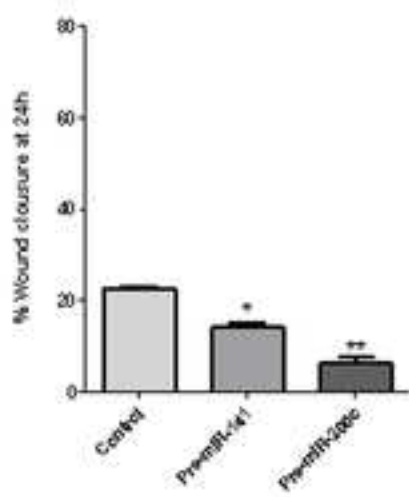
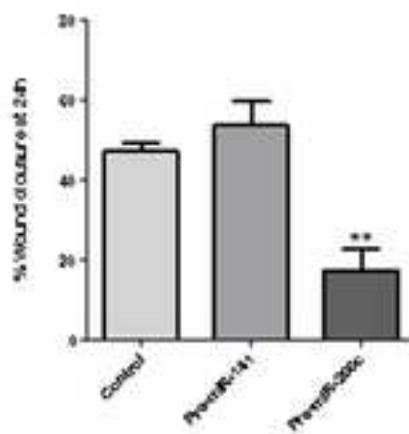
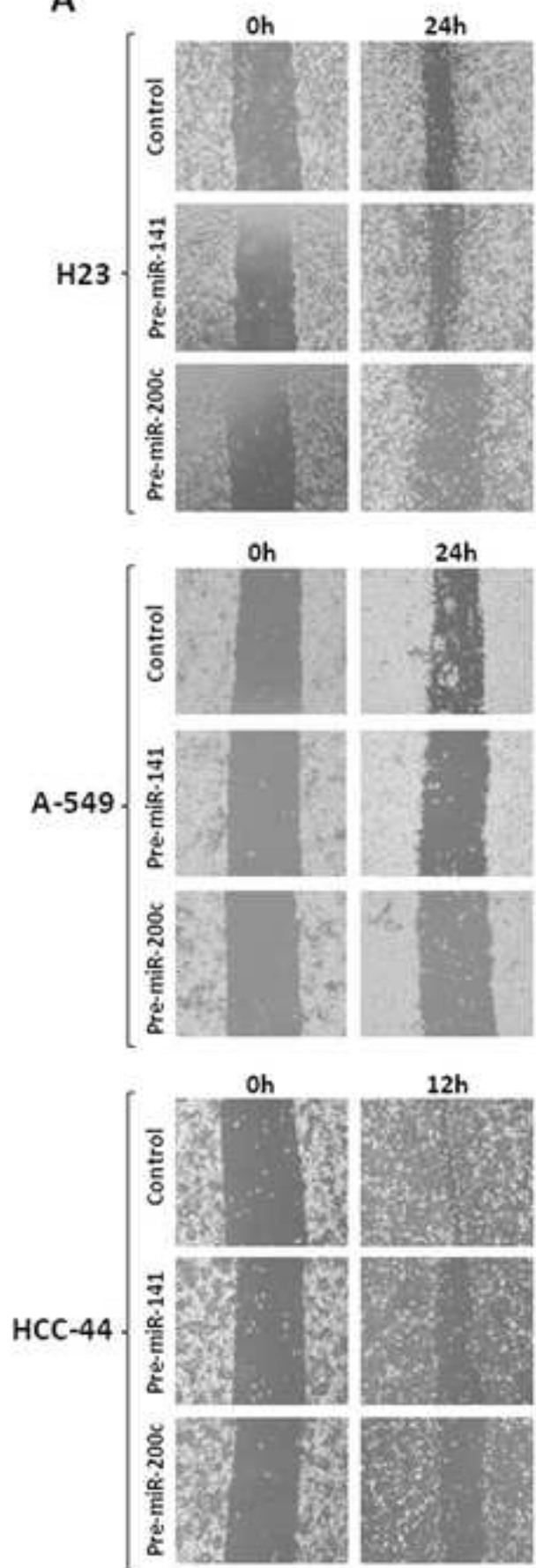
Figure 3



	Number at risk			
	0	50	100	150
High-risk	46	10	2	0
Intermediate-risk	10	4	1	0
Low-risk	16	6	2	1

Figure 4

A



B

E-cadherin

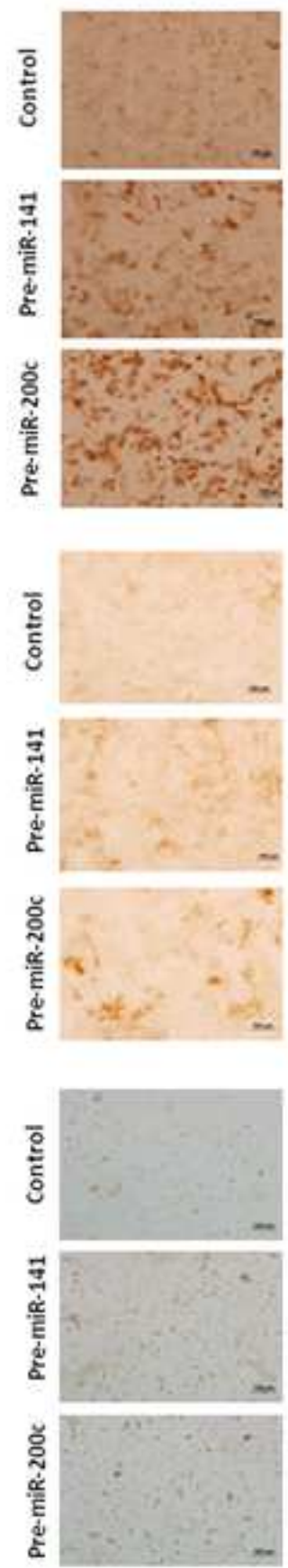
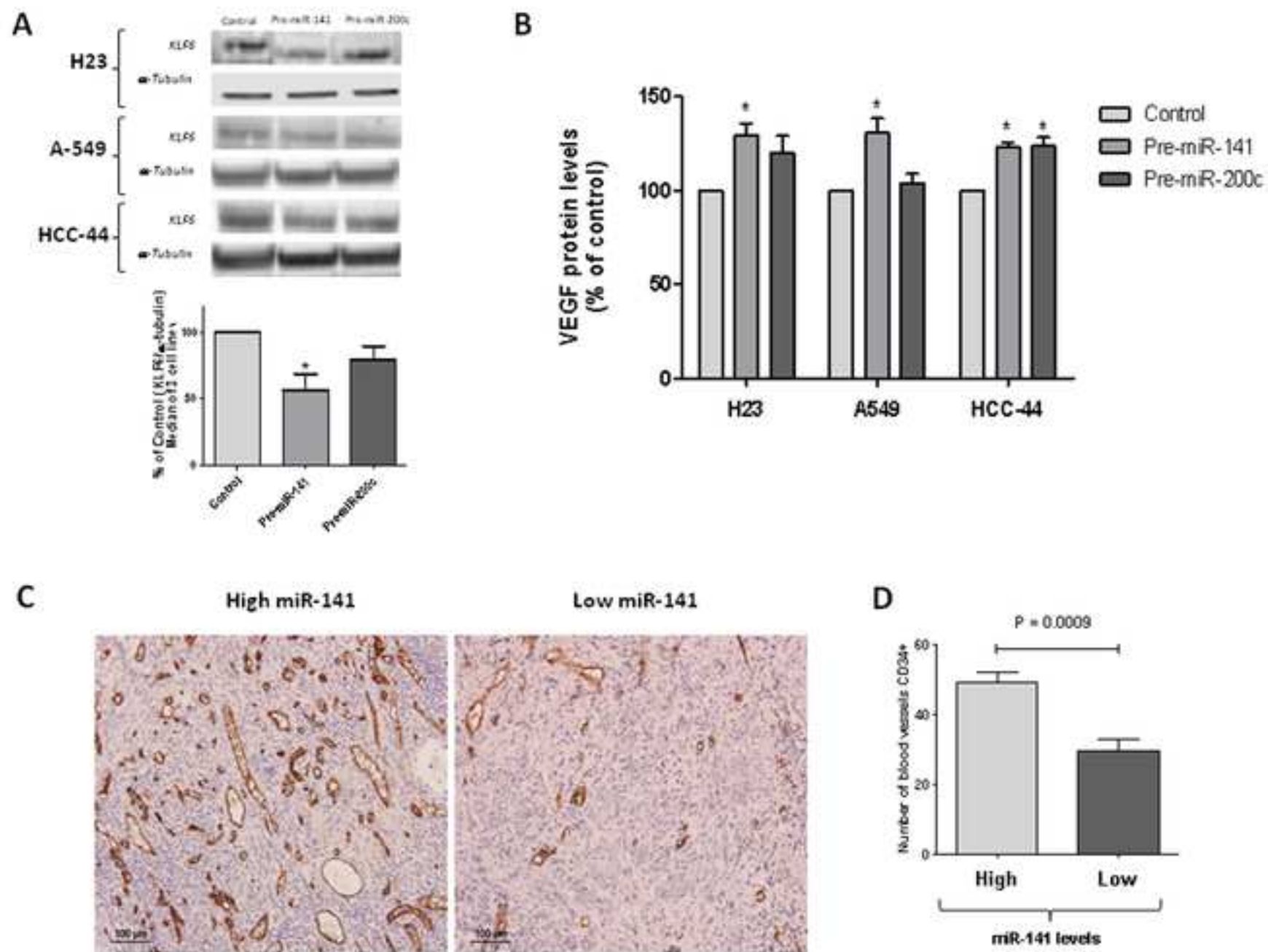


Figure 5



Publicaciones a las que ha dado lugar la tesis

Role of miR-200 Family Members in Survival of Colorectal Cancer Patients Treated with Fluoropyrimidines

TANIA DIAZ, PhD,¹ RUT TEJERO, MSc,¹ ISABEL MORENO, MD,² GERARDO FERRER, PhD,³
ANNA CORDEIRO, MSc,¹ ROSA ARTELLS, PhD,¹ ALFONS NAVARRO, PhD,¹ RAQUEL HERNANDEZ, MD,²
GUSTAVO TAPIA, MD,⁴ AND MARIANO MONZO, MD, PhD^{1*}

¹Molecular Oncology and Embryology Laboratory, Human Anatomy Unit, School of Medicine, University of Barcelona, IDIBAPS, Barcelona, Spain

²Department of Medical Oncology and Surgery, Hospital Municipal de Badalona, Badalona, Spain

³Laboratory of Translational Hematology, Hospital Clinic, IDIBAPS, Barcelona, Spain

⁴Department of Pathology, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Spain

Background and Objectives: Surgery is the standard treatment for colorectal cancer (CRC), and adjuvant chemotherapy has been shown to be effective in stage III but less so in stage II. We have analyzed the expression of the miR-200 family in tissue samples from resected CRC patients and correlated our findings with survival to adjuvant treatment with fluoropyrimidines.

Methods: Tumor tissue samples were obtained from 127 surgically resected patients with stage I-III CRC. miRNA detection was performed using TaqMan MicroRNA assays.

Results: High levels of miR-200a and miR-200c were associated with longer overall survival, while high levels of miR-429 correlated with longer overall and disease-free survival (DFS). In the subgroup of 56 patients treated with fluoropyrimidines and in the smaller subgroup of 32 stage II patients treated with fluoropyrimidines, those with high levels of miR-200a, miR-200c, miR-141, or miR-429 had significantly longer overall and DFS. Low miR-429 levels were identified as an independent prognostic marker. High levels of miR-429 combined with 5-fluorouracil inhibited cell invasion in LOVO cells.

Conclusions: miR-200a, miR-200c, miR-141, and miR-429 expression levels may identify CRC patients, including those with stage II disease, who are most likely to benefit from adjuvant chemotherapy.

J. Surg. Oncol. 2014;109:676–683. © 2014 Wiley Periodicals, Inc.

KEY WORDS: cell invasion; miR-200a; miR-200c; miR-141; miR-429

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the third most common type of cancer and the second cause of cancer death worldwide [1]. The main prognostic factor for relapse and survival in CRC is disease stage, and patients with stage III disease have a higher risk of relapse than those with stage II. Surgery is the standard treatment for stage I-III, and adjuvant chemotherapy with fluoropyrimidines (5-fluorouracil [5-FU] or capecitabine), XELOX (capecitabine plus oxaliplatin), or FOLFOX (5-FU, leucovorin, and oxaliplatin) has been shown to be effective in stage III but less so in stage II [2-4].

Recent reports have suggested a role for epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and mesenchymal-to-epithelial transition (MET) in the development of CRC [5,6]. EMT causes the loss of intercellular adhesion in the epithelial cells of the colon, leading to their transformation into mesenchymal tumor cells [7,8]. MET gives mesenchymal tumor cells the capacity to synthesize molecules that favor intercellular adhesion, leading to epithelial cell differentiation [7].

MicroRNAs (miRNAs) are short RNA sequences that influence gene transcription. The miR-200 family of miRNAs is composed of miR-200a, miR-200b, and miR-429, located on chromosome 1, and miR-200c and miR-141, located on chromosome 12. These miRNAs work together with ZEB1 and ZEB2 proteins to directly influence EMT and MET [9]. In EMT, the miR-200 family is underexpressed, while ZEB1 and ZEB2 are overexpressed. ZEB1 and ZEB2 bind to the promoter region of CDH1, hampering the synthesis of the tumor suppressor gene E-cadherin [10]. In MET, in contrast, the miR-200 family is overexpressed, which in turn inhibits ZEB1 and ZEB2 expression and

promotes the synthesis of E-cadherin, which is necessary for intercellular adhesion [7,11].

Several miRNAs have been related to CRC prognosis and treatment efficacy [12-15], and multiple studies have investigated the role of the miR-200 family in both early tumor development and metastasis in breast [16], prostate [17], endometrial [18], ovarian [19], and lung [5] cancers. A recent comparison of primary colorectal tumors and corresponding matched liver metastases found that miR-200c plays a key role in the regulation of the EMT-MET process [20].

To date, however, no studies have explored the potential impact of the miR-200 family on survival in early-stage CRC treated with either single-agent or combination chemotherapy. In the present study, we have analyzed the expression of miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, and miR-429 in 127 stage I-III CRC patients—tumor samples and

Grant sponsor: Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social; Grant number: FIS-PI09/0547; Grant sponsor: SDCC (Servei de Donació del Cos a la Ciència); Grant sponsor: Universitat de Barcelona.

*Correspondence to: Mariano Monzo, MD, PhD, Department of Human Anatomy, Embryology School of Medicine, University of Barcelona, Casanovas 143 08036, Barcelona, Spain. Fax: þ34-934035263. E-mail: mmonzo@ub.edu

Received 3 October 2013; Accepted 14 January 2014

DOI 10.1002/jso.23572

Published online 10 February 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

paired normal tissue samples—and correlated our findings with clinicopathological characteristics and with overall survival (OS) and disease-free survival (DFS).

MATERIALS AND METHODS

Eligibility and Patient Evaluation

From August 2003 to August 2007, tumor and paired normal tissue samples were obtained from 127 consecutively selected patients with stage I-III CRC who underwent surgical resection at the Municipal Hospital of Badalona, Spain. Fresh tumor and normal tissue were preserved in liquid nitrogen. Approval for the study was obtained from the institutional review board of the hospital, and signed informed consent was obtained from all patients in accordance with the Declaration of Helsinki.

All 127 patients underwent a complete history and physical examination including routine hematological and biochemical analyses, chest radiographs and computed tomography (CT) of the thorax and abdomen. Target lesions detected by abdominal ultrasound were also assessed by CT or magnetic resonance imaging. Hematological and biochemical analyses were repeated after each cycle of therapy.

Cell Culture and Transfection

The CRC cell line LOVO was cultured in RPMI 1640 containing 10% fetal calf serum (Life Technologies, Carlsbad, CA). Cells were transfected with 100 nM of anti-miR-200a, anti-miR-200c, anti-miR-429, anti-miR negative control, pre-miR-429, or pre-miR negative control (Life Technologies) using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) as per the manufacturer's protocol.

RNA Extraction and mRNA and miRNA Quantification

Total RNA was extracted from fresh tumor and paired normal tissue using Trizol¹ total RNA isolation reagent (Life Technologies) according to the manufacturer's protocol. mRNA quantification of E-cadherin was performed using commercially available TaqMan Expression Assay (Hs_01023895_m1, Life Technologies) with GAPDH as endogenous control. miRNA detection was performed using commercial assays (TaqMan MicroRNA assays, Life Technologies) for miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, and miR-429 in the 7500 Sequence Detection System (Life Technologies). The appropriate negative controls (nontemplate control) were also run in each reaction. All reactions were performed in duplicate. Relative quantification was calculated using the formula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Normalization was performed with RNU6B.

Wound-Healing Assay

LOVO cells (5×10^5 cells/well) were seeded in 12-well plates and were grown to confluence. After 72 hr, the cells were transfected with anti-miR-200a, anti-miR-200c, anti-miR-429, or anti-miR negative control. The day after transfection, an artificial homogenous wound was created on the monolayer with a sterile 100 μ l tip. After scratching, the cell medium was removed and changed. Images of cell invasion into the wound were captured at 0, 24, 48, and 72 hr by inverted microscope.

For drug treatment experiments, LOVO cells were treated with 10 mM 5-FU (Sigma, St Louis, MO) or 10 mM NH₄OH vehicle control, both alone and in combination with pre-miR-429 or pre-miR negative control, respectively, the day before scratching. 5-FU or NH₄OH was added each day during the period of the experiment.

TABLE I. Main Clinical Characteristics of 127 Colorectal Cancer Patients and Their Correlation With Overall and Disease-Free Survival in the Univariate Analyses

Characteristic	N (%), N / 127	P-Value	
		OS	DFS
Sex			
Male	69 (54.3)	0.418	0.334
Female	58 (45.7)		
Median age	67.4	0.008	0.034
ECOG PS			
01	11 (8.7)		
2	80 (63)	0.116	0.028
CEA levels	36 (28.3)		
5			
>5	78 (61.4)		
ND	29 (22.8)	0.064	0.029
C 19.9 levels	20 (15.8)		
37			
> 37	103 (81.1)		
ND	16 (12.6)	0.025	0.131
Tumor site	8 (6.3)		
Colon			
Rectum	86 (67.7)	0.241	0.185
Pre-existent polyp	41 (32.3)		
Absent			
Present	97 (76.4)	0.007	0.014
Mucin secretion	30 (23.6)		
Absent			
Present	113 (89)	0.205	0.418
Perilymphatic invasion	14 (11)		
Absent			
Present	117 (92.1)	0.008	0.027
Perivascular invasion	10 (7.9)		
Absent			
Present	118 (92.9)	0.463	0.649
Perineural invasion	9 (7.1)		
Absent			
Present	119 (93.7)	0.054	0.085
T stage	8 (6.3)		
T1	2 (1.6)		
T2	20 (15.7)	0.425	0.606
T3	100 (78.7)		
T4	5 (4)		
N stage	82 (64.6)	0.216	0.196
N0	45 (35.4)		
TNM stage			
I	18 (14.2)		
II	64 (50.4)	0.406	0.419
III	45 (35.4)		
Adjuvant treatment			
Fluoropyrimidines	56 ^a (44.1)		
XELOX	24 ^b (18.9)	0.790	0.869
None	47 (37)		
Relapse			
Yes	18 (14.2)		
No	109 (85.8)		

^a39 colon, 17 rectum.

^b17 colon, 7 rectum.

Statistical Analyses

Differences between two or more groups were calculated using the Mann-Whitney U-test and the Kruskal-Wallis test. Pearson correlation was used to identify correlation between miRNA and mRNA expression levels. miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, and miR-429 expression levels were dichotomized using the maxstat package of R in order to determine the optimal cutoff that best discriminated between different groups of patients for OS and DFS [21]. OS was calculated from the date of surgery to the date of death or last follow-up. DFS was calculated from the date of surgery to the date of death, relapse or last follow-up. The univariate analyses of OS and DFS were calculated with the Kaplan-Meier method and compared using the log-rank test. All variables with $P < 0.100$ in the univariate analysis were included in a multivariate analysis using the proportional hazard Cox regression model. All statistical analyses were performed with SPSS 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL) and R 2.6.0 Software. Statistical significance was set at $P < 0.050$.

RESULTS

Patient Characteristics

Table I shows the clinicopathologic characteristics of the 127 patients included in the study. Median age was 67.4 years and 69 patients were

males. Eighty-six patients had colon cancer, and 41 had rectal cancer. Eighteen patients (14.2%) were stage I, 64 (50.5%) stage II, and 45 (35.5%) stage III. All patients underwent surgical resection. No patient received neoadjuvant radiotherapy. A total of 56 patients (44%; 39 with colon and 17 with rectal cancer) received single-agent adjuvant chemotherapy with fluoropyrimidines (5-FU or capecitabine). Twenty-four patients (19%; 17 with colon and 7 with rectal cancer) received combination adjuvant chemotherapy with XELOX (capecitabine plus oxaliplatin). The 24 patients with rectal cancer who received adjuvant chemotherapy also received adjuvant radiotherapy. The remaining 47 patients (37%) received neither chemotherapy nor radiotherapy as adjuvant treatment. Median follow-up was 113 months.

miR-200 Family Expression in Tumor and Normal Tissue

The expression levels of all five miRNAs, those located on chromosome 1 (miR-200a, miR-200b, and miR-429) and those located on chromosome 12 (miR-200c and miR-141), were higher in tumor than in normal tissue (miR-200a: $P < 0.0001$; miR-200b: $P < 0.0001$; miR-429: $P < 0.0011$; miR-200c: $P < 0.0001$; miR-141: $P = 0.036$; Supplementary Fig. S1). Stage I patients had lower levels than those with stage II or III disease (miR-200a: $P = 0.008$; miR-200b: $P = 0.003$; miR-429: $P = 0.042$; miR-200c: $P = 0.009$; miR-141:

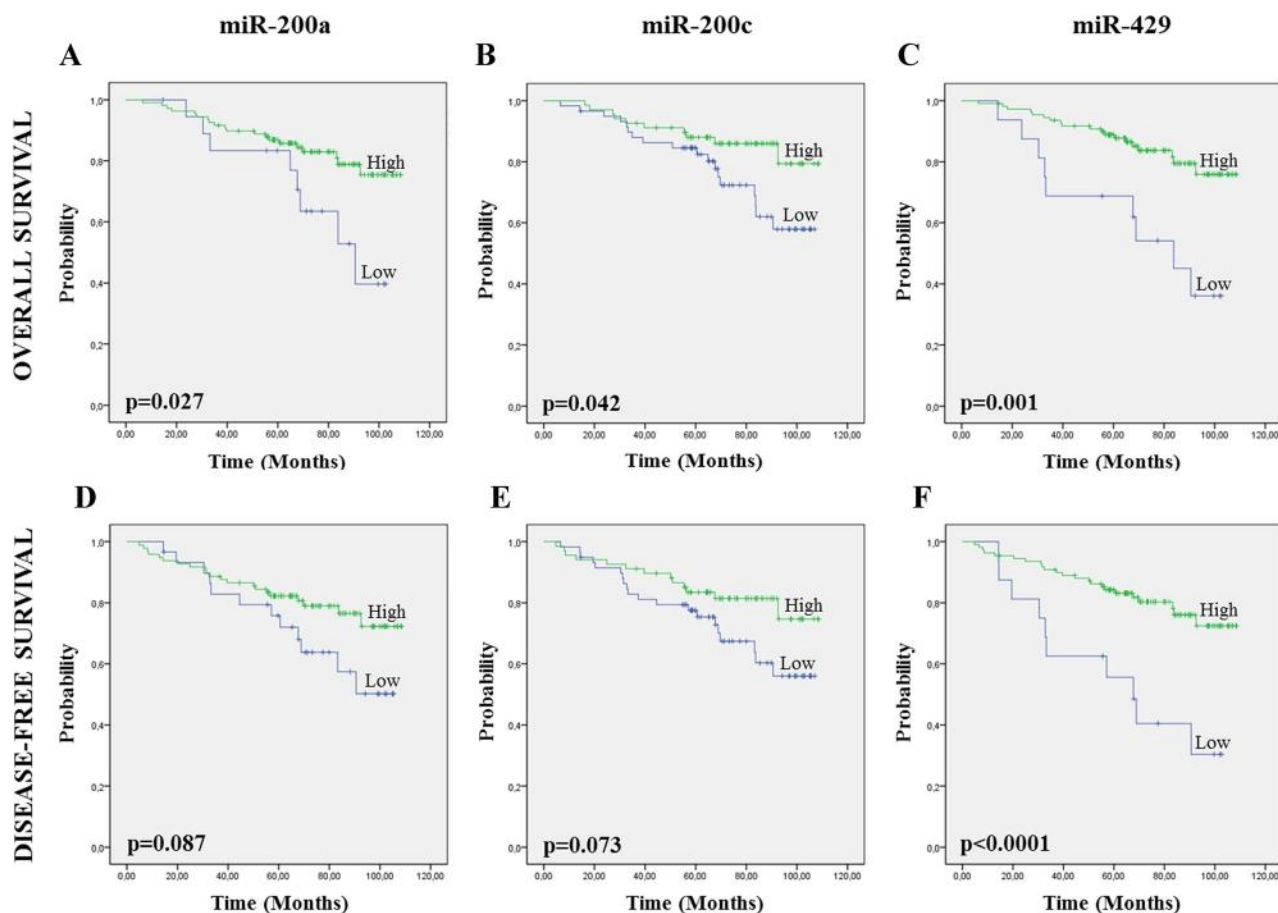


Fig. 1. Kaplan-Meier curves showing (A-C) overall survival and (D-F) disease-free survival according to the expression levels of miR-200a, miR-200c, and miR-429 in the complete series of 127 CRC patients.

$P = 0.076$; Supplementary Fig. S2). The expression of all five miRNAs correlated positively with the mRNA expression of E-cadherin ($P < 0.001$).

miR-200 Family Expression, OS, and DFS

Mean OS for all 127 patients was 93 months (95%CI: 88-98) and mean DFS was 89 months (95%CI: 84-95). In the univariate analyses including clinicopathologic characteristics but not miRNA levels (Table I), advanced age ($P = 0.008$), C19.9 levels >37 ($P = 0.025$), pre-existent polyps ($P = 0.007$), and perilymphatic invasion ($P = 0.008$) were associated with shorter OS. In addition, older age ($P = 0.034$), ECOG performance status 2 ($P = 0.028$), CEA levels >5 ($P = 0.029$), pre-existent polyps ($P = 0.014$), and perilymphatic invasion ($P = 0.027$) were associated with shorter DFS.

Patients were classified as having high or low levels of miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141, and miR-429 using the cutoff identified by the maxstat package of R. Mean OS was 95.4 months for those with high miR-200a levels versus 79.7 months for those with low levels ($P = 0.027$), 97.8 months for those with high miR-200c levels versus 87 months for those with low levels ($P = 0.042$), and 96.4 months for those with high miR-429 levels versus 71.2 months for those with low levels ($P = 0.001$; Supplementary Table SI; Fig. 1A-C). Mean DFS was 93 months for those with high miR-429 levels versus 63.6 months for those with low levels ($P < 0.0001$), 91.8 months for those with high miR-200a levels versus 80.7 months for those with low levels ($P = 0.087$), and 93.9 months for those with high miR-200c levels versus 83.1 months for those with low levels ($P = 0.073$; Supplementary Table SI; Fig. 1D-F).

When patients were classified according to the type of adjuvant treatment received, among the 56 patients treated with fluoropyrimidines, the beneficial effect of high levels of miR-200a, miR-200c, or miR-429 continued to hold true. Additionally, in this subgroup of patients, high levels of miR-141 were also associated with longer OS and DFS. Mean OS was 97.8 months for those with high miR-200a levels versus 58.6 months for those with low levels ($P = 0.001$), 100.7 months for those with high miR-200c levels versus 80.6 months for those with low levels ($P = 0.011$), 95.1 months for those with high miR-141 levels versus 82.6 months for those with low levels ($P = 0.023$), and 98.4 months for those with high miR-429 levels versus 43.9 months for those with low levels ($P < 0.0001$; Supplementary Table SI; Fig. 2A-D). Mean DFS was 93.6 months for those with high miR-200a levels versus 65.4 months for those with low levels ($P = 0.022$), 96.1 months for those with high miR-200c levels versus 74.7 months for those with low levels ($P = 0.019$), 90.6 months for those with high miR-141 levels versus 77.1 months for those with low levels ($P = 0.040$), and 92.9 months for those with high miR-429 levels versus 49.1 months for those with low levels ($P < 0.0001$; Supplementary Table SI; Fig. 2E-H). No correlation between survival and miRNA expression levels was observed in the subgroup of patients treated with XELOX or in those receiving no adjuvant treatment.

Finally, high levels of miR-200a, miR-200c, miR-141, or miR-429 were also associated with longer OS and DFS in the subgroup of 32 patients with stage II disease treated with fluoropyrimidines. In this subgroup, mean OS was 100.9 months for those with high miR-200a levels versus 54.4 months for those with low levels ($P = 0.003$), and 103.5 months for those with high miR-429 levels versus 49.1 months for those with low levels ($P < 0.0001$). Mean OS for miR-200c ($P = 0.001$)

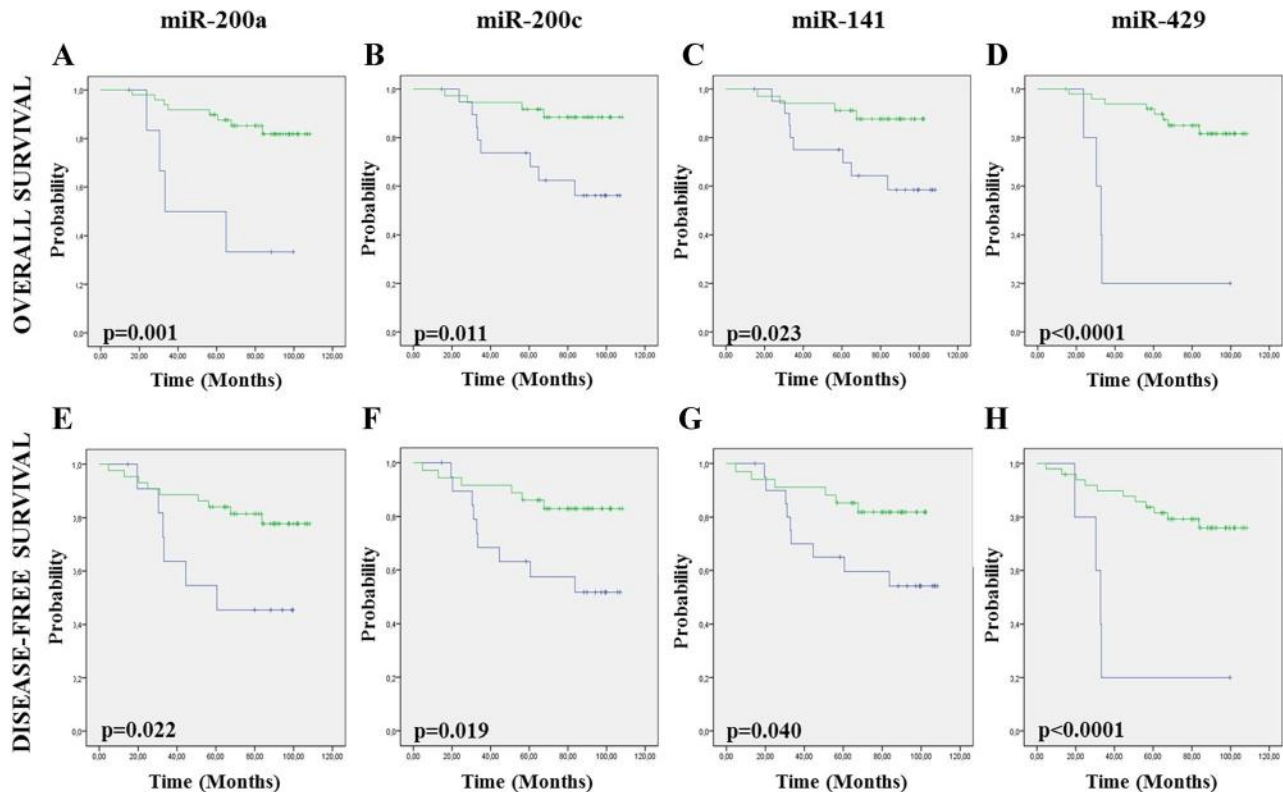


Fig. 2. Kaplan-Meier curves showing (A-D) overall survival and (E-H) disease-free survival according to the expression levels of miR-200a, miR-200c, miR-141, and miR-429 in the 56 patients treated with fluoropyrimidines.

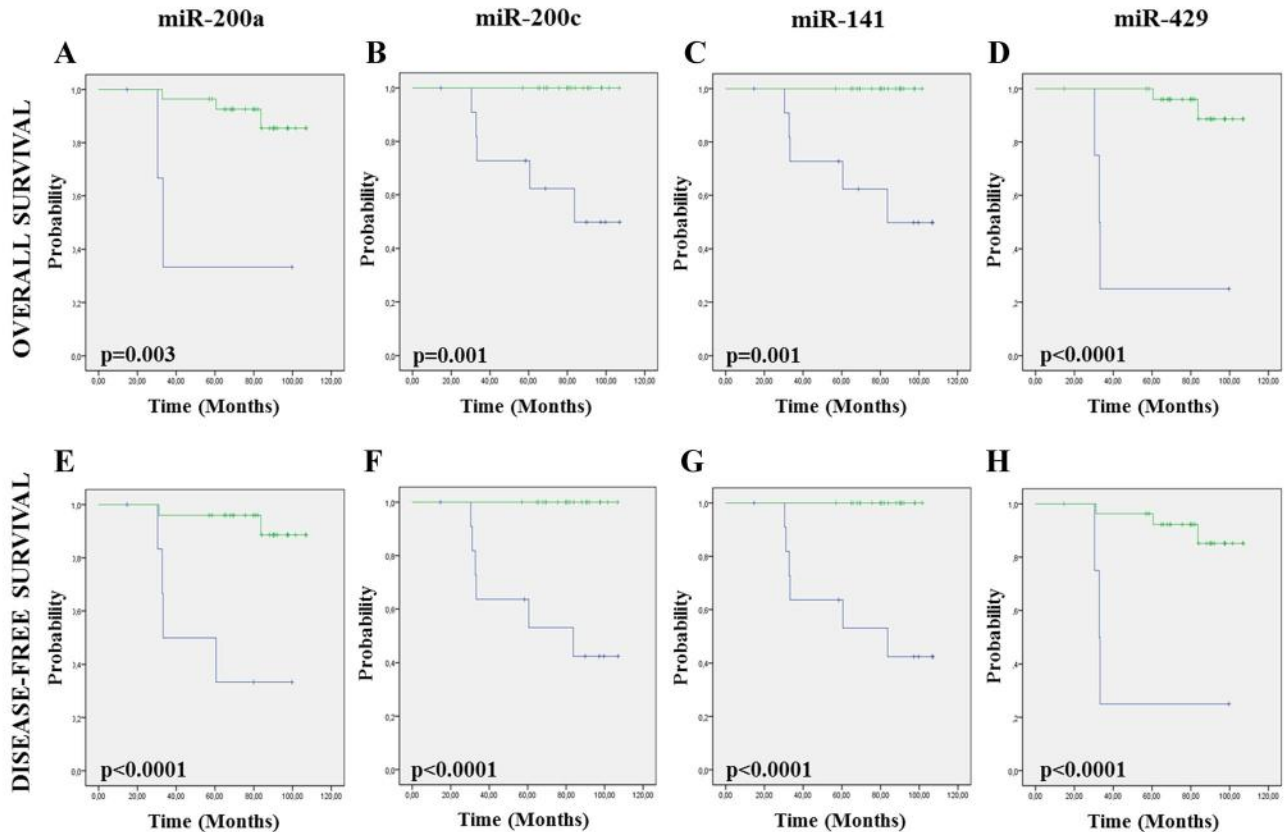


Fig. 3. Kaplan-Meier curves showing (A-D) overall survival and (E-H) disease-free survival according to the expression levels of miR-200a, miR-200c, miR-141, and miR-429 in the subgroup of 32 stage II patients treated with fluoropyrimidines.

and miR-141 ($P = 0.001$) could not be calculated because all cases were censored (Supplementary Table SI; Fig. 3A-D). Mean DFS was 102.3 months for those with high miR-200a levels versus 59.4 months for those with low levels ($P < 0.0001$), and 100.7 months for those with high miR-429 levels versus 49.1 months for those with low levels ($P < 0.0001$). Mean DFS for miR-200c ($P = 0.001$) and miR-141 ($P < 0.0001$) could not be calculated because all cases were censored (Supplementary Table SI; Fig. 3E-H).

Multivariate Analyses for OS and DFS

All variables with $P < 0.1$ in the univariate analyses were included in the Cox multivariate analyses for DFS and OS. In the total cohort, CEA levels >5 (OR: 2.286; 95%CI: 1.264-9.805; $P = 0.016$), perilymphatic invasion (OR: 3.521; 95%CI: 1.738-18.011; $P = 0.004$), perineural invasion (OR: 5.595; 95%CI: 1.165-22.487; $P = 0.031$), pre-existent polyps (OR: 5.117; 95%CI: 1.402-8.938; $P = 0.007$), and low levels of miR-429 (OR: 3.540; 95%CI: 12.355-19.040; $P < 0.0001$) were independent prognostic factors for shorter OS (Table II). Moreover, CEA levels >5 (OR: 3.050; 95%CI: 1.257-7.400; $P = 0.014$), perilymphatic invasion (OR: 4.758; 95%CI: 1.530-14.799; $P = 0.007$), perineural invasion (OR: 4.313; 95%CI: 1.057-17.597; $P = 0.042$), pre-existent polyps (OR: 2.744; 95%CI: 1.178-6.390; $P = 0.019$), and low levels of miR-429 (OR: 5.884; 95%CI: 2.283-15.166; $P < 0.0001$) were also independent prognostic factors for shorter DFS (Table II).

In the Cox multivariate analyses in the subgroup of 56 patients treated with fluoropyrimidines, pre-existent polyps (OR: 4.891; 95%CI: 1.340-17.851; $P = 0.016$) and low levels of miR-429 (OR: 17.675; 95%CI:

3.849-81.161; $P < 0.0001$) were independent prognostic factors for shorter OS (Table II). Age > 67 years (OR: 3.326; 95%CI: 1.007-10.993; $P = 0.049$), CEA levels >5 (OR: 3.393; 95%CI: 1.096-10.507; $P = 0.034$), and ECOG performance status 2 (OR: 5.792; 95%CI: 1.948-17.218; $P = 0.002$) were independent prognostic factors for shorter DFS (Table II).

In the multivariate analyses in the subgroup of 32 stage II patients treated with fluoropyrimidines, low miR-429 expression (OR: 0.005; 95%CI: 2.708-300.254; $P = 0.005$) was an independent prognostic factor for shorter OS (Table II). No variable emerged as a prognostic factor for DFS.

Downregulation of miR-429 Promotes Cell Invasion

Given that miR-200 family members had high levels in LOVO cells (data not shown), these cells were transfected with anti-miRs. After 48 hr of transfection, the cells transfected with anti-miR-429 showed higher cell invasion into the wound than those transfected with anti-miR negative control ($P = 0.01$ at 72 hr of transfection; Fig. 4A,B, Supplementary Fig. S3). However, no differences in cell invasion were observed between cells transfected with anti-miR-200a or anti-miR-200c and those transfected with anti-miR negative control (Fig. 4A).

Overexpression of miR-429 Combined With 5-FU Treatment Inhibits Cell Invasion

The expression levels of miR-429 increased considerably 24 hr after pre-miR-429 transfection (Supplementary Fig. S4). When cells were

TABLE II. Significant Prognostic Markers of Overall and Disease-Free Survival in All 127 Colorectal Cancer Patients, in the Subgroup of 56 Patients Treated With Fluoropyrimidines and in the Smaller Subgroup of 32 Patients With Stage II Disease Treated With Fluoropyrimidines, According to the Multivariate Analysis Including All Factors With Univariate $P \leq 0.100$

Variables ^a	P-Value	OR	95%CI
All patients (N = 127)			
OS			
CEA levels > 5	0.016	2.286	1.264-9.805
Perilymphatic invasion	0.004	3.521	1.738-18.011
Perineural invasion	0.031	5.595	1.165-22.487
Pre-existent polyps	0.007	5.117	1.402-8.938
Low miR-429 levels	<0.0001	3.540	2.355-19.040
DFS			
CEA levels > 5	0.014	3.050	1.257-7.400
Perilymphatic invasion	0.007	4.758	1.530-14.799
Perineural invasion	0.042	4.313	1.057-17.597
Pre-existent polyps	0.019	2.744	1.178-6.390
Low miR-429 levels	<0.0001	5.884	2.283-15.166
Patients treated with fluoropyrimidines (N = 56)			
OS			
Pre-existent polyps	0.016	4.891	1.340-17.851
Low miR-429 levels	<0.0001	4.891	3.849-81.161
DFS			
Age > 67	0.049	3.326	1.007-10.993
CEA levels > 5	0.034	3.393	1.096-10.507
ECOG PS ≥ 2	0.002	5.792	1.948-17.218
Stage II patients treated with fluoropyrimidines (N = 32)			
OS			
Low miR-429 levels	0.005	28.513	2.708-300.254

^aOnly variables with $P > 0.05$ are shown.

transfected with pre-miR-429 or pre-miR negative control, those transfected with pre-miR-429 showed less invasion into the wound, though the differences were not significant when compared with cells transfected with pre-miR negative control ($P = 0.06$ at 72 hr of

transfection; Fig. 5A, Supplementary Fig. S5). Moreover, the cells transfected with pre-miR-429 combined with 5-FU treatment showed less invasion into the wound than those transfected with pre-miR negative control combined with NH_4OH treatment ($P = 0.001$ at 72 hr of transfection; Fig. 5B).

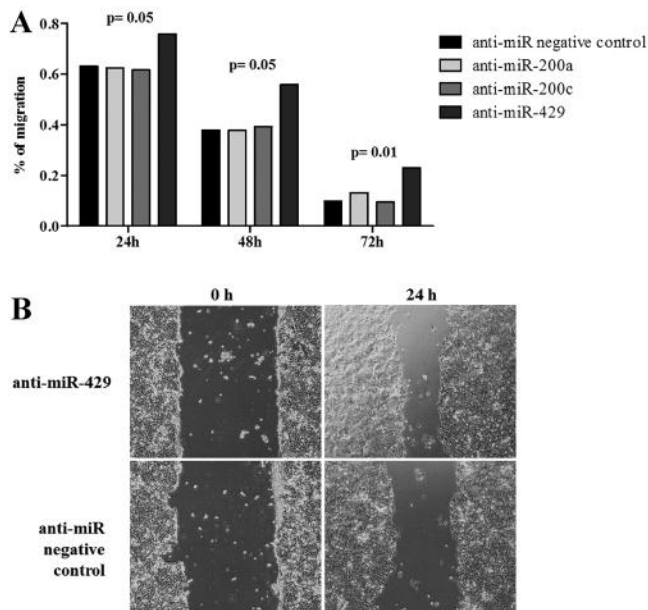


Fig. 4. Effect of anti-miR transfection on cell invasion. A: Invasion of cells transfected with anti-miR negative control, anti-miR-200a, anti-miR-200c, and anti-miR-429 at 24, 48, and 72 hr. B: Images at the time of scratching (0 hr) and at 24 hr after scratching in cells transfected with anti-miR-429 and anti-miR negative control.

DISCUSSION

One of the primary molecular characteristics of normal colon epithelial cells is the overexpression of miR-200 family members, which inhibits the expression of ZEB1/ZEB2 and thus promotes the synthesis of E-cadherin, thereby increasing intercellular adhesion and cell differentiation [8]. During tumor development, normal epithelial cells acquire mesenchymal characteristics through EMT, leading to lower expression of the miR-200 family, upregulation of ZEB1/ZEB2 and inhibition of E-cadherin synthesis. The resulting loss of intercellular adhesion facilitates tumor spread and metastasis. Recent studies have found that in metastasis, MET leads to overexpression of miR-200, which results in E-cadherin synthesis and tumor re-epithelialization [7,22,23]. In the present study, we have found that members of the miR-200 family are overexpressed in tumor tissue compared to normal tissue, both in colon and in rectal cancer patients. Similar results have been reported in bladder cancer [23] and in endometrial endometrioid carcinoma [18]. In addition, stage I patients had lower levels of miR-200 than those with stage II or III disease, indicating that while cells in stage I tumors still have predominantly EMT features, in stage II-III, tumor re-epithelialization increases and EMT characteristics decrease. This finding is in line with a recent report suggesting that MET, regulated by the miR-200 family, plays a key role during the transition of the primary tumor to metastasis in CRC [20].

In the present study, all patients with high levels of miR-200a, miR-200c, or miR-429, regardless of stage, had better prognosis than those with low levels, who likely harbored a more aggressive population of tumor cells with EMT characteristics. The exact mechanism of action of

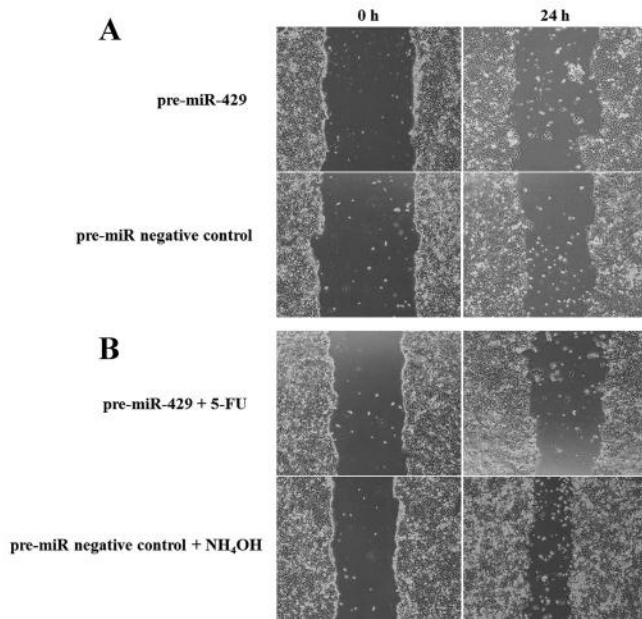


Fig. 5. Effect of pre-miR-429 transfection combined with 5-FU treatment on cell invasion. A: Images at the time of scratching (0 hr) and at 24 hr after scratching in cells transfected with pre-miR-429 or pre-miR negative control. B: Images at the time of scratching (0 hr) and at 24 hr after scratching in cells transfected with pre-miR-429 combined with 5-FU treatment or pre-miR negative control combined with NH₄OH.

these miRNAs is not clear, but previous studies in cell lines have shown that not only do they regulate E-cadherin synthesis but they are also involved in the regulation of several genes, including WNT/b-catenin, which is targeted by miR-200a [24], and ZEB1, a target of miR-200c [11]. In addition, studies in cell lines and in gastric tumors have found that miR-429 controls tumor growth through the regulation of c-Myc [25]. Taken together, these findings indicate that miR-200 family members regulate cell growth and differentiation by targeting several genes and may act as tumor suppressors.

Fluoropyrimidines, administered either orally (capecitabine) or intravenously (5-FU plus leucovorin) are one of the standard adjuvant treatments for stage II-III CRC, with similar results being obtained with both methods [3]. We have found that the correlation observed between miRNAs and OS continues to hold true for the subgroup of patients treated with fluoropyrimidines: patients with low levels of miR-200a, miR-200c, miR-141, or miR-429 have a worse prognosis than those with high levels.

Eighty percent of node-negative stage II patients will benefit from surgical resection alone [2], indicating that only a small portion of these patients will derive additional benefit from chemotherapy. In our study, stage II patients with high levels of miR-200a, miR-200c, or miR-429 treated with fluoropyrimidines had better prognosis than those with low levels. These findings lead us to speculate that stage II patients with low levels of miR-200a, miR-200c, miR-141, or miR-429 may constitute a subset of patients who might be candidates for alternative adjuvant therapy.

Several studies have shown that miRNAs play a role in the regulation of apoptosis and chemoresistance. Recently, for example, in a study of CRC patients including those with stage IV disease, high serum levels of miR-200c were significantly correlated with lymph node metastasis, distant metastasis, and poor prognosis, while low tumor levels were associated with poorer prognosis, in line with our findings in tumor samples [26]. In addition, miR-21 is overexpressed in chemoresistant

breast cancer and glioblastoma cell lines, but downregulation of miR-21 by transfection with anti-miR-21 oligonucleotides increased chemosensitivity and led to apoptosis [27]. Along the same lines, miR-15b, miR-16, miR-181b, and miR-497 are underexpressed in gastric cell lines resistant to vincristine, but when these miRNAs are overexpressed, binding to the anti-apoptotic gene Bcl-2 occurs and sensitivity to vincristine increases [28]. Recent experiments in cell lines have found that high levels of miR-200b, miR-200c, and miR-429 inhibit the expression of Bcl-2 and XIAP, while Bcl-2 and XIAP expression increases in the presence of low levels of these miRNAs [13]. These findings could help to explain the results of the present study, in that low levels of miR-200a, miR-200c, and miR-429 could be related to high levels of Bcl-2 and XIAP, which would inhibit apoptosis in patients treated with fluoropyrimidines but not affect patients treated with XELOX. Although our findings indicate a role for miR-200a but not for miR-200b, this may be due to the fact that previous studies have been carried out in cell lines, while tumor tissue contains a more heterogeneous cell population. Additionally, miR-200b expression levels can affect apoptosis [29]; for instance, miR-200b was downregulated in a cisplatin-resistant human breast cancer cell line [30] and overexpression of miR-200b increased apoptosis in breast cancer cells [31].

Since it is well known that miRNAs target multiple genes, in order to ascertain whether the miR-200 family could act by targeting genes other than ZEB, we have also identified with bioinformatics tools other potential targets that could influence prognosis: KLF4, ERBB2, and VEGFA. However, when we examined the correlation between the mRNA expression levels of these genes with miRNA expression, only ERBB2 had a negative correlation with the expression of the miR-200 family (data not shown).

Interestingly, the only miRNA identified as a prognostic factor in the multivariate analysis was miR-429 ($P = 0.004$), suggesting that miR-429 may play a direct role in the survival of CRC patients treated with fluoropyrimidines. Functional studies performed in our laboratory have shown that downregulation of miR-429 increased the invasive properties of LOVO cells, while upregulation of miR-429 decreased their invasive capacity. Moreover, upregulation of miR-429 combined with 5-FU treatment completely inhibited cell invasion. Fluoropyrimidines, including 5-FU, are one of the standard adjuvant treatments for stage II-III CRC [3]. 5-FU is an analog of uracil which once inside the cell contributes to the disruption of RNA synthesis and thymidine synthase action, leading to a decrease in cell proliferation [32]. This apoptotic effect of 5-FU, combined with miR-429-induced modulation of cell invasive capacity, may well be the basis for a novel therapeutic approach in CRC.

CONCLUSIONS

To the best of our knowledge, the present study is the first to show an association between members of the miR-200 family and survival in CRC patients. miR-200a, miR-200c, and miR-429 expression in surgical samples may be useful for tailoring treatment, especially in patients with stage II disease, for whom the optimal treatment has yet to be determined. Future studies with larger numbers of patients are warranted to determine the impact of these miRNAs on the efficacy of fluoropyrimidine treatment. miR-429 seems to have the most promising role, and if our results are confirmed in an independent series and CRC cell lines, miR-429 could well be used for developing novel treatment strategies based on the combination of 5-FU with upregulation of miR-429.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social FIS-PI09/0547 and SDCC (Servei de Donació del

Cos a la Ciència). RT and AC are recipients of an APIF (Ajuts de Personal Investigador Predoctoral en Formació) grant from the Universitat de Barcelona.

REFERENCES

- Siegel R, Naishadham D, Jemal A: Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 2013;63:11-30.
- Gray R, Barnwell J, McConkey C, et al.: Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: A randomised study. *Lancet* 2007;370:2020-2029.
- Twelves C, Wong A, Nowacki MP, et al.: Capecitabine as adjuvant treatment for stage III colon cancer. *N Engl J Med* 2005;352:2696-2704.
- Chibaudel B, Tournigand C, Andre T, et al.: Targeted therapies as adjuvant treatment for early-stage colorectal cancer: First impressions and clinical questions. *Clin Colorectal Cancer* 2010;9:269-273.
- Tellez CS, Juri DE, Do K, et al.: EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. *Cancer Res* 2011;71:3087-3097.
- Schliekelman MJ, Gibbons DL, Faca VM, et al.: Targets of the tumor suppressor miR-200 in regulation of the epithelial-mesenchymal transition in cancer. *Cancer Res* 2011;71:7670-7682.
- Korpál M, Ell BJ, Buffa FM, et al.: Direct targeting of Sec23a by miR-200s influences cancer cell secretome and promotes metastatic colonization. *Nat Med* 2011;17:1101-1108.
- Mongroo PS, Rustgi AK: The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol Ther* 2010;10:219-222.
- Gregory PA, Bert AG, Paterson EL, et al.: The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat Cell Biol* 2008;10:593-601.
- Park SM, Gaur AB, Lengyel E, et al.: The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes Dev* 2008;22:894-907.
- Hurteau GJ, Carlson JA, Roos E, et al.: Stable expression of miR-200c alone is sufficient to regulate TCF8 (ZEB1) and restore E-cadherin expression. *Cell Cycle* 2009;8:2064-2069.
- Chang KH, Miller N, Kheirleiseid EA, et al.: MicroRNA signature analysis in colorectal cancer: Identification of expression profiles in stage II tumors associated with aggressive disease. *Int J Colorectal Dis* 2011;26:1415-1422.
- Zhu W, Xu H, Zhu D, et al.: miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. *Cancer Chemother Pharmacol* 2012;69:723-731.
- Kahlert C, Lahes S, Radhakrishnan P, et al.: Overexpression of ZEB2 at the invasion front of colorectal cancer is an independent prognostic marker and regulates tumor invasion in vitro. *Clin Cancer Res* 2011;17:7654-7663.
- Monzo M, Navarro A, Bandres E, et al.: Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Res* 2008;18:823-833.
- Gravgaard KH, Lyng MB, Laenkholm AV, et al.: The miRNA-200 family and miRNA-9 exhibit differential expression in primary versus corresponding metastatic tissue in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2012;134:207-217.
- Barron N, Keenan J, Gammell P, et al.: Biochemical relapse following radical prostatectomy and miR-200a levels in prostate cancer. *Prostate* 2012;72:1193-1199.
- Lee JW, Park YA, Choi JJ, et al.: The expression of the miRNA-200 family in endometrial endometrioid carcinoma. *Gynecol Oncol* 2011;120:56-62.
- Mateescu B, Batista L, Cardon M, et al.: miR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nat Med* 2011;17:1627-1635.
- Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, et al.: MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut* 2013;62:1315-1326.
- Hothorn TLB: On the exact distribution of maximally selected rank statistics. *Comput Stat Data Anal* 2003;43:121-137.
- Brabletz T, Jung A, Reu S, et al.: Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10356-10361.
- Chaffer CL, Brennan JP, Slavin JL, et al.: Mesenchymal-to-epithelial transition facilitates bladder cancer metastasis: Role of fibroblast growth factor receptor-2. *Cancer Res* 2006;66:11271-11278.
- Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, et al.: Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2009;29:5923-5940.
- Sun T, Wang C, Xing J, et al.: miR-429 modulates the expression of c-myc in human gastric carcinoma cells. *Eur J Cancer* 2011;47:2552-2559.
- Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, et al.: Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg*. 2013 Aug 26. [Epub ahead of print]
- Li Y, Li W, Yang Y, et al.: MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res* 2009;1286:13-18.
- Zhu W, Shan X, Wang T, et al.: miR-181b modulates multidrug resistance by targeting BCL2 in human cancer cell lines. *Int J Cancer* 2010;127:2520-2529.
- Hummel R, Hussey DJ, Haier J: MicroRNAs: Predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur J Cancer* 2010;46:298-311.
- Pogribny IP, Filkowski JN, Tryndyak VP, et al.: Alterations of microRNAs and their targets are associated with acquired resistance of MCF-7 breast cancer cells to cisplatin. *Int J Cancer* 2010;127:1785-1794.
- Meng F, Henson R, Lang M, et al.: Involvement of human microRNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology* 2006;130:2113-2129.
- Longley DB, Harkin DP, Johnston PG: 5-Fluorouracil: Mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 2003;3:330-338.

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found in the online version of this article at the publisher's web-site.

8.2 Otras publicaciones en las que he participado durante el período de tesis

AUTORES: Campayo M; Navarro A; Viñolas N; **Tejero R**; Muñoz C; Diaz T; Marrades R; L Cabanas ML; Gimferrer JM; Gascon P; Ramirez J; Monzó M.

TÍTULO: A dual role for KRT81: a miR-SNP associated with recurrence in non-small-cell lung and a novel marker of squamous cell lung carcinoma.

REVISTA /LIBRO: PlosOne FECHA: 2011

CLAVE: A VOLUMEN: 6 PÁG. INICIAL/FINAL: e22509 IF: 4,092

AUTORES: De Larrea CF, Navarro A, **Tejero R**, Tovar N, Díaz T, Cibeira MT, Rosiñol L, Ferrer G, Rovira M, Rozman M, Monzó M, Bladé J

TÍTULO: Impact of miRSNPs on Survival and Progression in patients with Multiple Myeloma Under going Autologous Stem Cell Transplantation.

REF. REVISTA /LIBRO: Clinical Cancer Research FECHA: 2012

CLAVE: A VOLUMEN: 18 PÁG. INICIAL/FINAL: 3697-704 IF: 7,338

AUTORES: Campayo M, Navarro A, Viñolas N, Diaz T, **Tejero R**, Gimferrer JM, Molins L, Cabanas ML, Ramirez J, Monzó M y Marrades R.

TÍTULO: Low miR-145 and high miR-367 are associated with unfavorable prognosis in resected NSCLC.

REF. REVISTA /LIBRO: European Respiratory Journal FECHA: 2012

CLAVE: A VOLUMEN: 41(5):1172-8 IF: 5,895

AUTORES: Navarro A, Muñoz C, Gaya A, Díaz-Beyá M, Gel B, **Tejero R**, Díaz T, Martinez A, Monzó M.

TÍTULO: MiR-SNPs as markers of toxicity and clinical outcome in Hodgkin lymphoma patients.

REF. REVISTA /LIBRO: PLoS One FECHA: 2013

CLAVE: A VOLUMEN: 21 PÁG. INICIAL/FINAL: e64716 IF: 5,895

AUTORES: Díaz-Beyá M, Brunet S, Nomdedéu J, **Tejero R**, Díaz T, Pratcorona M, Tormo M, Ribera JM, Escoda L, Duarte R, Gallardo D, Heras I, Queipo de Llano MP, Bargay J, Monzo M, Sierra J, Navarro A, Esteve J.

TÍTULO: MicroRNA expression at diagnosis adds relevant prognostic information to molecular categorization in patients with intermediate-risk cytogenetic acute myeloid leukemia.

REF. REVISTA /LIBRO: Leukemia FECHA: 2013
CLAVE: A VOLUMEN: 28(4):804-12 IF: 10.164

AUTORES: Ferrer G, Bosch R, Hodgson K, **Tejero R**, Roué G, Colomer D, Montserrat E, and Moreno C.

TÍTULO: B cell activation through CD40 ligation modulates the response of chronic Lymphocytic leukemia cells to BAFF and APRIL

REF. REVISTA /LIBRO: British Journal Haematology FECHA: 2014
CLAVE: A VOLUMEN: 164 PÁG.INICIAL/FINAL: 570-8. IF: 4.942

AUTORES: Diaz T, **Tejero R**, Moreno I, Ferrer G, Cordeiro A, Artells R, Navarro A, Hernandez R, Tapia G, Monzo M.

TÍTULO: Role of miR-200 family members in survival of colorectal cancer patients treated with fluoropyrimidines.

REF. REVISTA /LIBRO: Journal Surgical Oncology FECHA: 2014
CLAVE: A VOLUMEN: 109(7):676-83 IF: 2.644

8.3 Abstracts enviados a congresos durante el período de tesis

Congreso: 47th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. Junio 3-7, 2011, Chicago, IL, USA

- Campayo M, Navarro A, Viñolas N, **Tejero R**, Muñoz C, Diaz T, Marrades R, Cabanas ML, Gimferrer JM, Ramirez J, Gascon P, Monzo M. A single nucleotide polymorphism (SNP) in a microRNA (miRNA)-binding site of KRT81 and time to recurrence (TTR) in surgically resected non-small-cell lung cancer (NSCLC) patients. J Clin Oncol 29: 2011 (suppl; Abstract 10587). Póster

Congreso: 53rd ASH Annual Meeting and Exposition. Diciembre 10-13, 2011, San Diego, CA, USA

- Navarro A, Muñoz C, Gaya A, Martínez A, Diaz-Beya M, **Tejero R**, Diaz T, Ferrer G, Urbano-Ispizua A, Monzó M. miR-SNP Haplotype in the MicroRNA Maturation Pathway as a Marker of Clinical Outcome in Hodgkin Lymphoma (HL). Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011; 118. Abstract 1561. Póster
- Díaz-Beyá M, Navarro A, Díaz T, Ferrer G, **Tejero R**, Camós M, Torrebadell M, Pratcorona M, Rozman M, Monzó M, and Esteve J. The Distinctive MicroRNA Signature of Acute Myeloid Leukemia with Translocation t(8;16)(p11;p13)/ MYST3-CREBBP Is Responsible for RET Overexpression and Is Regulated by Epigenetic Mechanism. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011; 118. Abstract 2434. Oral
- De Larrea CF, Diaz T, MT Cibeira, **Tejero R**, Tovar N, Ferrer G, Rosiñol L, Rovira M, Rozman M, Monzó M, and Blade J. Impact of Single Nucleotide Polymorphisms in Genes Involved in miRNA Network on Survival and Progression After Autologous Stem Cell Transplantation in Patients with Multiple Myeloma. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2011; 118. Abstract 3945. Póster

Congreso: 17th Congress of the European Hematology Association 2012. Junio 14-17, 2012
Amsterdam

- Díaz-Beyá M, Navarro A, Pratcorona M, **Tejero R**, Magnano L, Monzó M, Esteve J. A specific microRNA signature characterizes acute myeloid leukemia with translocation t (6; 9) (p23; q34)/dek-nup214. Haematologica 2012; 97: supplement no. 1. Abstract 0046. Póster
- Ferrer G, Navarro A, **Tejero R**, Baumman T, Monzó M, Moreno C, and Montserrat E. Cd80 as a target of mir-146 in chronic Lymphocytic leukemia associated with autoimmune hemolytic anemia. Haematologica 2012; 97: supplement no. 1. Abstract 0729. Póster
- Tovar N, De Larrea CF, Navarro A, Muñoz C, Díaz T, Cibeira MT, **Tejero R**, Rosiñol L, Rozman M, Monzo M, Blade J. Impact of single nucleotide polymorphisms in genes involved in mirna network on survival and toxicities in patients with relapsed multiple myeloma treated with bortezomib. Haematologica 2012; 97: supplement no. 1. Abstract 0555. Póster
- Calvo X, Nomdedeu M, Costa D, Navarro A, Pereira A, **Tejero R**, Muñoz C, Cobo F, Rovira J, Díaz-Beyá M, Monzó M, Esteve J, Nomdedeu B. High levels of global dna methylation are an independent adverse prognostic factor in a series of 90 patients with de novo myelodysplastic syndrome. Haematologica 2012; 97: supplement no. 1. Abstract 1140. Póster

Congreso: LIV Reunión de la sociedad española de hematología. Octubre 18-21, 2012
Salamanca, SP

- Díaz-Beyá M, Navarro A, **Tejero R**, Díaz T, Pratcorona M, Nomdedeu M, Muñoz R, Risueño L, Rozman M, Monzó M, Esteve J. La leucemia mieloide aguda con translocación t (6; 9) (p23; q34) tiene una firma específica de microRNAs. Thrombosis and Haemostasis (XXVIII Congreso Nacional de la SETH) 2012; Abstract CO-025. Oral

- Ferrer G, Navarro A, **Tejero R**, Aymerich M, Pereira A, Baumman T, Monzó M, Moreno C, y Montserrat E. La leucemia linfática crónica asociada con anemia hemolítica autoinmune presenta una “firma” de microRNAs característica y que modula los niveles de CD80. Thrombosis and Haemostasis (XXVIII Congreso Nacional de la SETH) 2012; Abstract PO-118. Póster
- Navarro A, Muñoz C, Gaya A, Díaz-Beyá M, **Tejero R**, Díaz T, Martínez A, Monzó M. Influencia de los polimorfismos relacionados con microRNAs (miR-SNPs) sobre la toxicidad relacionada con el tratamiento y pronóstico del linfoma de Hodgkin. Thrombosis and Haemostasis (XXVIII Congreso Nacional de la SETH) 2012; AbstractCO-004. Oral

Congreso: 54rd ASH Annual Meeting and Exposition. Diciembre 8-11, 2012, Atlanta, USA

- Díaz-Beyá M, Navarro A, **Tejero R**, Pratcorona M, Díaz T, Monzó M and Esteve J, MD, PhD1 Overall hydroxymethylation levels as an independent prognostic marker in intermediate cytogenetic risk acute myeloid leukemia. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012. Abstract 1375. Póster
- Navarro A, Ferrer G, Díaz-Beyá M, Muñoz C, **Tejero R**, Díaz T, Monzó M, and Montserrat E. Global Methylation Provides Independent Prognostic Information in Chronic Lymphocytic Leukemia and is Associated with a MicroRNA Signature. Blood (ASH Annual Meeting Abstracts) 2012; 120: Abstract 3873. Póster

Congreso: 49th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology. Mayo 31-June4, 2013, Chicago, IL, USA

- Campayo M, Navarro A, **Tejero R**, Cabanas M, Molins L, Marrades R, Ramirez J, Monzo M, Viñolas N. mir-141 and miR-200c are associated with time to recurrence and Overall survival in resected non-small-cell lung cancer adenocarcinoma patients. J Clin Oncol 31, 2013 (suppl; Abstract 7547). Póster

Congreso: 18th Congress of the European Hematology Association 2013 Junio 13-16 in Stockholm, Sweden

- De Larrea CF, Navarro A, Tovar N, Pedrosa F, **Tejero R**, Cibeira M^a, Díaz T, Magnano L, Rosiñol L, Monzó M, Bladé J. Identification of serum microRNA profile in multiple myeloma associated with complete remission and Progression after Autologous stem-cell transplantation. Abstract. Póster

Congreso: 19th Congress of the European Hematology Association 2014 Junio 12-15 in Milano, Italy

- Navarro A, Cordeiro A, Gaya A, Gonzalez-Farre B, Díaz-Beyá M, Fuster D, **Tejero R**, Ruiz M, Santasusagna S, Muñoz C, Caritg O, Martínez A and Monzó M. Germline small non coding rnas, piwirnas, are expressed in hodgkin lymphoma: the role of piwirna-651 as prognostic factor in hodgkin lymphoma. Abstract. Póster