

NUEVOS BIOMARCADORES DE CÁNCER DE PULMÓN BASADOS EN MIRNA

M. Arroyo Varela¹, R. Larrosa Jiménez², J. Gómez Maldonado³, E. Espinosa García², R. Bautista Moreno³.

¹U.G.C. Médico-Quirúrgica de Enfermedades Respiratorias, Hospital Regional Universitario de Málaga.

²Dpto. de Arquitecturas de Computadores, Universidad de Málaga.

³Plataforma Andaluza de Bioinformática-SCBI, Universidad de Málaga.

Proyecto financiado con las Becas Neumosur nº12/2015, nº14/2016 y nº5/2017.

RESUMEN

Objetivo: Determinar si existen diferencias de expresión entre los miRNA de tejido sano y tumoral de adenocarcinoma de pulmón y carcinoma epidermoide de pulmón, con lo que podrían ser usados como biomarcadores.

Material y métodos: Se ha extraído y secuenciado el miRNA de tejido tumoral y sano adyacente de muestras de adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de dieciséis pacientes intervenidos en el Hospital Regional de Málaga. Esas secuencias se han analizado con un flujo de trabajo bioinformático específico que conlleva varios pasos: 1º) preprocesar las lecturas, 2º) mapearlas sobre el genoma humano de referencia, 3º) determinar la expresión de los miRNA en cada una de las muestras, 4º) calcular su expresión diferencial entre el tejido sano y el tumoral de cada paciente, 5º) realizar un análisis funcional de los miRNA encontrados.

Resultados: Hemos analizado los miRNA con expresión diferencial en cada uno de los tipos histológicos estudiados. El análisis del adenocarcinoma y carcinoma epidermoide de pulmón ha dado como resultado un total de 82 y 360 miRNA diferencialmente expresados (miDE), respectivamente. Hemos encontrado 50 miRNA comunes a los dos tipos histológicos, y su análisis funcional indica que están implicados en el crecimiento, desarrollo y movimiento celular, que se produce tanto en la célula normal como en el cáncer.

Conclusiones: Los miDE encontrados son una fuente de biomarcadores, al tener una reprogramación específica en cáncer, y ser obtenibles de forma no invasiva.

Palabras clave: Ultrasecuenciación, RNA-seq, miRNA, cáncer de pulmón, carcinoma epidermoide de pulmón, adenocarcinoma de pulmón.

ABSTRACT

Objective: Determine if there are differences in expression between the miRNAs of healthy and tumor tissue of lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung, with which they could be used as biomarkers.

Material and methods: miRNA has been extracted and sequenced from tumor and adjacent healthy tissue from samples of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma from sixteen patients operated at the Regional Hospital of Malaga. These sequences have been analyzed with a specific bioinformatic workflow that involves several steps: 1st) preprocessing the reads, 2nd) mapping them onto the reference human genome, 3rd) determining the expression of the miRNAs in each of the samples, 4th) calculate its differential expression between the healthy and tumor tissue of each patient, 5th) perform a functional analysis of the miRNAs found.

Results: We have analyzed the miRNAs with differential expression in each of the histological types studied. Analysis of adenocarcinoma and squamous cell carcinoma of the lung has resulted in a total of 82 and 360 differentially expressed miRNAs (miDE), respectively. We have found 50 miRNAs common to the two histological types, and their functional analysis indicates that they are involved in cell growth, development and movement, which occurs both in normal cells and in cancer.

Conclusions: The miDEs found are a source of biomarkers, as they have a specific reprogramming in cancer, and are obtainable non-invasively.

Keywords: Ultrasequencing, RNA-seq, miRNA, lung cancer, squamous cell carcinoma of the lung, lung adenocarcinoma.

INTRODUCCIÓN

El avance en el conocimiento de la génesis del cáncer de pulmón es de vital importancia dada la elevada prevalencia y mortalidad que presenta el mismo¹. La falta de herramientas para su diagnóstico precoz² y la escasez de terapias dirigidas contribuyen a su mal pronóstico³. A ello se une que durante el desarrollo de la enfermedad, la mayoría de los pacientes desarrollan resistencias frente a estos tratamientos dirigidos, lo que obliga a investigar en los mecanismos implicados en su desarrollo. Para poder realizar un diagnóstico precoz se dedican numerosos

esfuerzos en la búsqueda de variantes genómicas, variaciones en el DNA, iniciadoras del proceso tumoral y en la detección de algunas de estas dianas en biopsias líquidas⁴; sin embargo, estos esfuerzos no han sido suficientes, y dada la naturaleza del progreso del cáncer de pulmón se hacen necesarias nuevas vías de identificación de biomarcadores.

Por este motivo, muchos investigadores se han centrado en el estudio de los distintos tipos de RNAs⁵⁻⁷, entre los que se encuentran los RNA mensajeros (mRNA), los RNA pequeños (miRNA y piRNA) y los RNA

Recibido: 31.01.2021 Aceptado: 18.04.2021

Dra. Macarena Arroyo Varela
macarrovo@gmail.com

largos no codificantes (lncRNA). En concreto, los miRNA, son pequeños RNA no codificantes, entre 21 y 24 nucleótidos de longitud, con demostrada participación en procesos de regulación génica⁸. Estos miRNAs se unen al mRNA inhibiendo su traducción o promoviendo su degradación, de tal forma que se bloquea la síntesis de una proteína dada. Esta forma de actuar influye en procesos biológicos fundamentales, algunos de los cuales se han vinculado a distintas patologías, como es el cáncer.

Así, está descrito que los patrones de expresión de los miRNA se correlacionan con parámetros clinicopatológicos en los subtipos de cáncer, lo que sugiere su uso como potenciales biomarcadores de los mismos. Es más, estos miRNAs, cuando se excretan, son estables en diferentes fluidos corporales (plasma, suero, saliva, orina, lágrimas, líquido amniótico, calostro, leche materna, líquido seminal, fluido bronquial, líquido cefalorraquídeo, líquido peritoneal y líquido pleural) donde se encuentran encapsulados en vesículas, de tal forma que quedan protegidos de la degradación, permitiendo así su detección mediante técnicas no invasivas.

En relación a su implicación en el desarrollo del cáncer se ha descrito que el miR-21, el cluster miR-17-92 y los miR-221/222 actúan como oncogenes en la progresión del tumor, mientras que las familias de los let-7, miR-34 y miR-200 tienen un papel predominante como supresores del tumor^{9, 10}. Además, recientemente, se han identificado algunos miRNAs claves en el diagnóstico y tratamiento del cáncer, procedentes del análisis de células tumorales circulante, así como procedentes de microvesículas exudadas, como pueden ser los exosomas¹¹⁻¹⁶.

Debido a estas propiedades biológicas y funcionales los miRNAs se plantean como excelentes biomarcadores en la práctica clínica, además de poder actuar como agentes terapéuticos. Se conoce que algunos miRNA desempeñan una función importante en el cáncer de pulmón, por lo que nuestra hipótesis plantea la existencia de miRNA desregulados, tanto en adenocarcinoma de pulmón (LAC), como en carcinoma epidermoide (SqCC), que se activen de forma masiva en el proceso de oncogénesis, y que puedan ser fuente de nuevos biomarcadores o dianas terapéuticas. Por ello, en este trabajo proponemos un estudio prospectivo de los perfiles diferenciados de miRNA en LAC y SqCC, entre tejido sano y tumoral, que sirvan de nueva fuente de biomarcadores.

MATERIAL Y MÉTODOS

Reclutamiento de muestras y secuenciación:

En el presente estudio se han utilizado muestras de tejido sano y tumoral provenientes de pacientes intervenidos de cáncer de pulmón en el Hospital Regional de Málaga, contando con la aprobación del Comité de Ética de la Investigación Provincial de Málaga.

En el desarrollo de nuestro estudio las muestras seleccionadas deben cumplir una serie de criterios específicos:

- (1) que sean muestras procedentes de pacientes con LAC o SqCC en estadios 1B, 2A-B o 3A-B.
- (2) Que el paciente de procedencia no haya recibido ni quimioterapia ni radioterapia antes de la intervención.
- (3) Que el paciente de procedencia no haya tenido nunca otra neoplasia, tratada o no.
- (4) Que hubiera material suficiente tanto tumoral como sano para extraer el RNA de ambos.

Así, cumpliendo todos los criterios anteriormente descritos se seleccionaron, desde el Biobanco del Sistema Sanitario Público de Andalucía, 8 pacientes, tanto para LAC, como SqCC, cuyas características clínicas se describen en las **tablas 1 y 2**, respectivamente.

Tabla 1: Información clinicopatológica sobre las muestras de LAC seleccionadas en el estudio.

ID	Edad	Sexo	Estadio	Fuma
1	58	Hombre	3A	Si
2	70	Hombre	2A	Si
3	65	Mujer	2A	Si
4	71	Hombre	3A	Si
5	70	Hombre	2A	Si
6	64	Hombre	3A	Si
7	63	Hombre	3A	Si
8	58	Hombre	2A	Si

Tabla 2: Información clinicopatológica sobre las muestras de SqCC seleccionadas en el estudio.

ID	Edad	Sexo	Estadio	Fuma
1	55	Hombre	3A	Si
2	63	Hombre	3A	Si
3	74	Hombre	2B	Si
4	77	Hombre	2B	Si
5	67	Mujer	1B	Si
6	75	Hombre	2B	Si
7	76	Hombre	3A	Si
8	62	Hombre	3A	Si

A partir de estas muestras se extrajo el RNA total del tejido sano y tumoral de cada uno de los pacientes según las especificaciones del Biobanco. Posteriormente, se purificaron los pequeños RNAs de cada muestra y se secuenciaron en el NextSeq 550 de Illumina® por el Servicio de Ultrasecuenciación de la Universidad de Málaga en el Centro de Supercomputación y Bioinnovación (SCBI), generando lecturas pareadas de 1x75 nt con un total de 1 a 5 x 10⁶ lecturas por muestra.

Cuantificación de la expresión y cálculo de la expresión diferencial:

Las lecturas resultantes del secuenciador se sometieron a un preprocesamiento utilizando la herramienta SeqTrimNext¹⁷ para eliminar las lecturas con baja calidad, los adaptadores de la técnica de secuenciación, así como cualquier otro tipo de contaminante. Posteriormente, con las lecturas útiles resultantes se utilizó la herramienta Oases 2.0¹⁸ para su alineamiento sobre la versión hg38 (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=hg38>) del genoma humano y sobre la base de datos miRBase v22.1 (<http://www.mirbase.org/>), utilizando Bowtie V.1¹⁹. De cada uno de los pacientes se obtuvo los niveles de expresión de los miRNA en forma de lecturas mapeadas por millón (Reads Per Million, RPM).

Para el cálculo de la expresión diferencial de los miRNA (miDE, miRNA diferencialmente expresados), en LAC y SqCC, se utilizó la herramienta Oases, la cual usa el paquete de DESeq220 desarrollado en R. Se seleccionaron aquellos miDE que presentaban un padj <0,05 y una diferencia logarítmica de cambio de expresión mayor de 1 ($|\log FC| > 1$).

Análisis funcionales:

El análisis funcional de los datos se realizó mediante el software Ingenuity® PathwayAnalysis (IPA®) a partir de la cual se realizó un análisis de interacciones entre miRNA y sus posibles dianas (mRNA), así como la identificación de las funciones y enfermedades en las que intervienen.

RESULTADOS

Las lecturas son de buena calidad:

El resultado de la secuenciación muestra unos niveles altos de calidad, como se puede deducir a partir del porcentaje de las lecturas rechazadas, diferenciadas por tejido, durante el procesamiento. Así, el porcentaje medio más alto, un 10,72 %, lo encontramos en las muestras de tejido tumoral de LAC, mientras que el más bajo, un 5,51 %, se muestra en el tejido tumoral de SqCC (tabla 3). Por otro lado, los porcentajes medios de mapeos únicos de las lecturas al genoma de referencia, superiores en todos los casos al 67 %, además de corroborar la calidad de los datos, se muestran mayores en los tejidos sanos, lo que

nos indica una mayor variabilidad en los tejidos tumorales (tabla 3). Los datos de procesamiento de las lecturas y el mapeo de cada una de las muestras de LAC y SqCC se encuentran en la tabla suplementaria (Tabla S1).

Tabla 3: Medias del procesamiento y mapeo de las lecturas

Tejido	Totales	Útiles	% rechazadas	% únicas mapeadas
LAC normal	9002204,57	8321046,57	7,80	75,45
LAC tumoral	6302540,29	5644524,57	10,72	70,61
SqCCnormal	29243720,38	27813732,50	4,76	71,45
SqCC tumoral	24502517,25	23192666,62	5,51	67,95

Identificación de miRNA diferencialmente expresados:

A partir de la utilización del paquete DESeq2 sobre los niveles de expresión de los miRNA en forma de RPM, entre el tejido tumoral y sano de los pacientes, se han podido identificar a 82 miDE en LAC, representados en un gráfico MAplot en la figura 1A, de los cuales 44 miDE muestran sobreexpresión, mientras que 39 miDE se encuentran reprimidos. El mismo cálculo realizado sobre los pacientes intervenidos de SqCC, nos muestra 360 miDE, con 202 miDE sobreexpresados y 158 miDE reprimidos, representados de forma gráfica en forma de MAplot en la figura 1B. Los resultados completos del análisis de expresión diferencial en LAC y SqCC se encuentran en la tabla suplementaria (Tabla S2).

La comparación de los resultados de los miDE obtenidos entre LAC y SqCC generó una lista de 50 miDE comunes a ambos tipos de cáncer de pulmón, como se puede observar en la figura 1C. Los resultados de esos 50 miDE están presentados en la tabla 4.

Figura 1: Gráficos en forma de MAplot de los miDE, **A)** en LAC y **B)** en SqCC, en el eje de abscisa se represen el nivel de expresión normalizado, en el eje de ordenadas se representa los valores de LogFC. **C)** Diagrama de Venn comparando los miDE en LAC y SqCC.

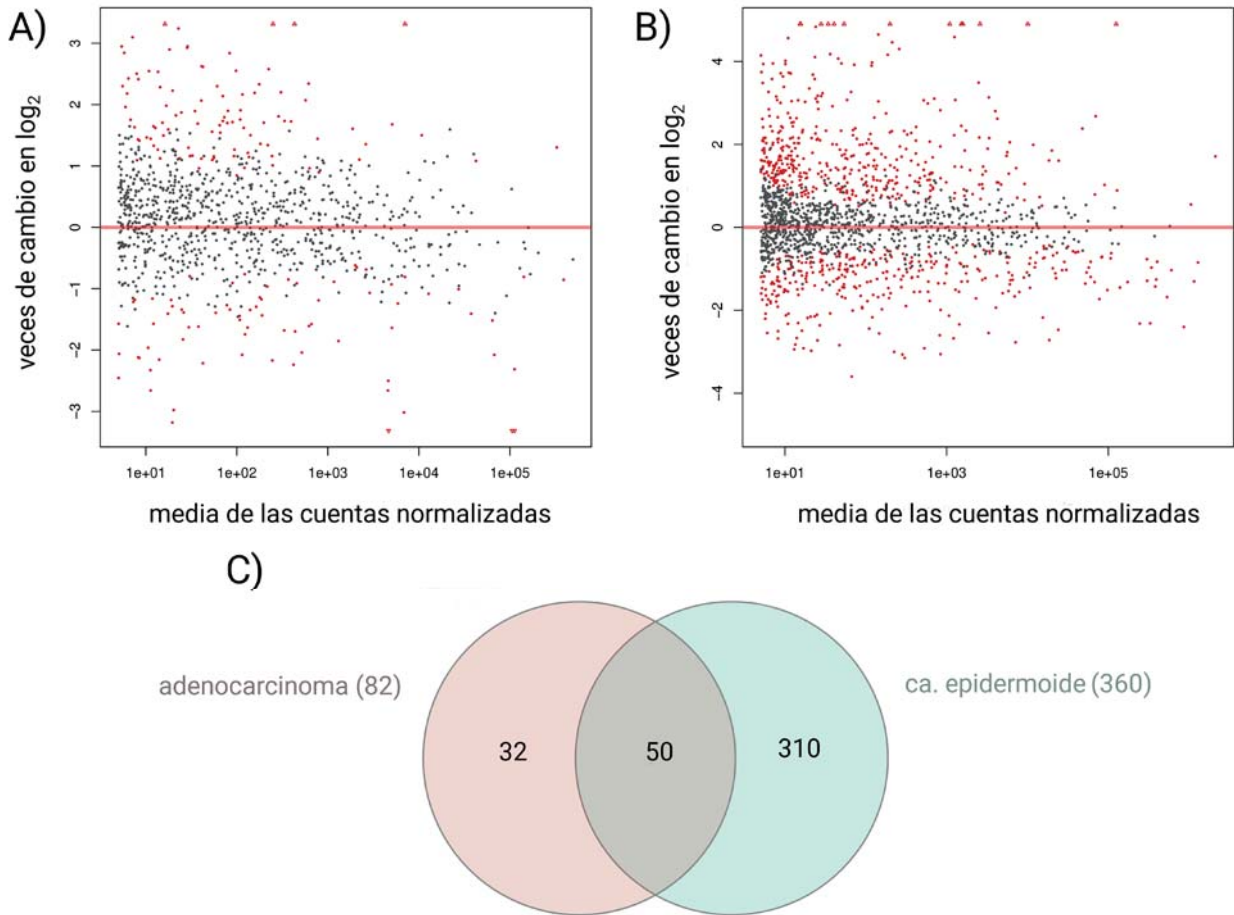


Figura 2: En **A)** se representa el primer núcleo de interacción identificado con los miDE comunes a LAC y SqCC. En **B)** se representa el segundo núcleo de interacción a partir de los miDE comunes a LAC y SqCC. Los miDE sobreexpresados se dibujan en color rojo, los miDE reprimidos se dibujan en color verde.

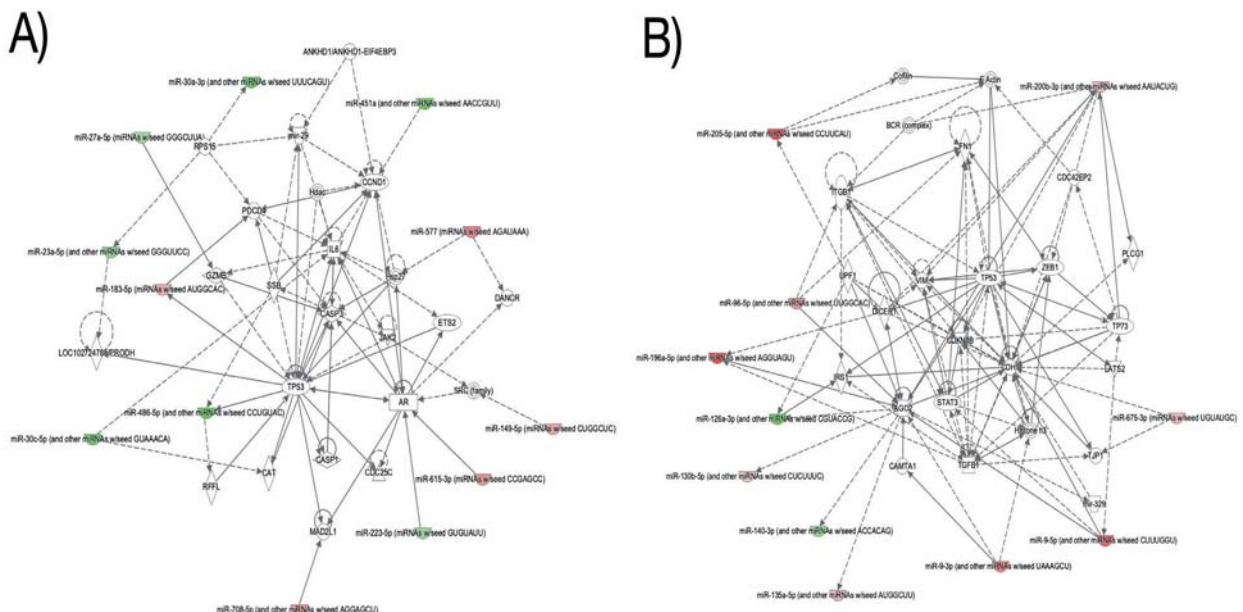


Tabla 4: Diferencias de expresión de los miDE comunes a LAC y SqCC. Con un * se marcan aquellos miDE que presentan un comportamiento distinto en LAC frente a SqCC.

ID miRNA	LogFC LAC	LogFC SqCC
hsa-miR-196a-5p	4.90797562606601	5.94293782001563
hsa-miR-9-3p	3.85271806150608	4.15847493615011
hsa-miR-9-5p	3.58023650256269	5.08867340830627
hsa-miR-205-5p	3.49290453421995	6.01715812722086
hsa-miR-891a-5p	3.24228712149021	1.94589316544587
hsa-miR-196a-3p	2.951596066579	5.20282167667181
hsa-miR-675-3p	2.94994365053353	2.0204030773365
hsa-miR-675-5p	2.89721362806859	2.75127157398873
hsa-miR-182-3p	2.84322365601418	2.91960229222104
hsa-miR-615-3p	2.62785911991676	3.06954538610507
hsa-miR-577	2.61883897417903	3.92212591160893
hsa-miR-1910-5p	2.54643223943029	4.10516820838904
hsa-miR-7974	2.53554575359865	4.46279713342865
hsa-miR-135b-5p	2.06980588645805	1.85128027561704
hsa-miR-135b-3p	1.89731619952784	1.49626528996733
hsa-miR-149-5p	1.80829513959576	2.61999381477711
hsa-miR-96-5p	1.73210595459394	3.13160021122781
hsa-miR-708-5p	1.72223830685878	2.80213180959166
hsa-miR-4488	1.70272098668199	1.44513699857184
hsa-miR-183-5p	1.6772810542918	2.37896621246989
hsa-miR-656-3p	1.6249418135169	2.12361338610488
hsa-miR-130b-5p	1.62070558971509	1.46279669360761
hsa-miR-671-5p	1.54228691360307	1.5704605538541
hsa-miR-429	1.35225563765744	1.81148183099221
hsa-miR-323a-3p	1.329856421005	1.21969375859626
hsa-miR-877-5p	1.16013409079632	1.31946085914326
hsa-miR-369-3p	1.15886624622669	2.23748745616471
hsa-miR-95-3p*	2.19376826889577	-1.22236979635807
hsa-miR-548f-5p*	-1.18574720113645	1.38246945973552
hsa-miR-140-3p	-1.23772469355919	-1.35335301701793
hsa-miR-598-3p	-1.29392050642194	-1.04512853500996
hsa-miR-1976	-1.4057212446121	-1.58765238967921
hsa-miR-23a-5p	-1.62759586986056	-1.4443065746649
hsa-miR-223-5p	-1.74186883972899	-1.29991702944061
hsa-miR-338-5p	-2.07684466641621	-2.67771293400356
hsa-miR-126-3p	-2.07754952120196	-2.40230128934915
hsa-miR-4521	-2.15449165876705	-3.00445389894296
hsa-miR-30c-2-3p	-2.17056247325789	-2.54805357336914
hsa-miR-184	-2.21374235617482	-2.91316083790035
hsa-miR-27a-5p	-2.23657814105906	-1.2150473675394
hsa-miR-30a-5p	-2.31441802100188	-2.32338942029631
hsa-miR-490-3p	-2.32810904547226	-1.70230218631255
p-hsa-miR-12	-2.45478774607851	-2.18357728330917
hsa-miR-451b	-2.65881925713155	-2.07393949300931
hsa-miR-30a-3p	-2.66094617122902	-2.46848950046377
hsa-miR-4732-3p	-2.97820711072446	-2.94588684837801
hsa-miR-516a-5p	-3.1837521383816	-2.44453369974738
hsa-miR-144-5p	-3.40416981872008	-1.34811213055203
hsa-miR-486-5p	-3.62300453691056	-2.71888632938698
hsa-miR-451a	-3.65158760391556	-2.31346458743471

Núcleos de interacción miRNA-mRNA y selección de posibles biomarcadores:

El análisis funcional de los 50 miDE comunes en LAC y SqCC, utilizando la herramienta Ingenuity® PathwayAnalysis, nos muestra dos núcleos de interacción principales miRNA-mRNA en los cuales intervienen 12 y 11 miDE respectivamente, representados en la figura 2. En el primer núcleo de interacción participan mostrando sobreexpresión los miDE miR183-5p, miR-708-5p, miR-577, miR-615-3p y miR-149-5p, mientras que interaccionan en represión los miDE miR-30a-3p, miR451a, miR-27a-5p, miR23a-5p, miR486-5p, miR-30c-5p y miR-223-5p. En el segundo núcleo de interacción identificamos sobreexpresados los miDE miR-200b-3p, miR-205-5p, miR-96-5p, miR-196a-5p, miR-130b-5p, miR-135a-5p, miR-9-3p, miR-9-5p y miR-675-3p, , mientras que solo dos, los miDE miR-126a-3p y miR-140-3p, se encuentran reprimidos.

Tanto los miRNA como lo mRNA que forman cada núcleo de interacción se recogen en la **tabla 5** donde cabe destacar que el primer núcleo de interacción se encuentra implicado en el desarrollo y proliferación celular; mientras el segundo núcleo de interacción destaca por su implicación en el desarrollo del cáncer y el movimiento celular.

Tabla 5: Tabla de los núcleos de interacción identificados con lo miDE comunes a LAC y SqCC..

Núcleo de interacción	Moléculas de miRNA	Moléculas de mRNA	Funciones y enfermedades implicadas
1	miR-149-5p ,miR-183-5p,miR-223-5p ,miR-23a-5p, miR-27a-5p, mir-29,miR-30a-3p, miR-30c-5p, miR-451a, miR-486-5p, miR-577, miR-615-3p, miR-708-5p	ANKHD1/ANKHD1-EIF4EBP3, AR ,CASP1 ,CASP3, CAT, CCND1, CDC25C, DANCR, ETS2, GZMB, Hdac, Hsp27, IL6, JAK2, LOC102724788/PRODH, MAD2L1, PDCD4, RFFL, RPS15, SRC (family) ,SSB, TP53	Ciclo celular, desarrollo celular, crecimiento y proliferación celular.
2	miR-126a-3p, miR-130b-5p, miR-135a-5p, miR-140-3p, miR-196a-5p, miR-200b-3p, miR-205-5p, mir-329,miR-675-3p, miR-9-3p, miR-9-5p, miR-96-5p	AGO2, BCR (complex), CAMTA1, CDC42EP2, CDH1, CDKN1B, Cofilin, DICER1, F Actin, FN1, Histone h3, IRS1, ITGB1, LATS2, PLCG1, STAT3, TGFB1, TJP1, TP53, TP73, UPF1, VIM, ZEB1	Cáncer, movimiento celular, anomalías y daño orgánico.

DISCUSIÓN

Tanto los bajos porcentajes de secuencias rechazadas durante el procesamiento, como los altos porcentajes de lecturas únicas mapeadas al genoma humano de referencia, nos indican dos aspectos fundamentales. El primero es la alta calidad de las muestras de secuenciación, y el segundo es una alta variabilidad de los niveles de expresión de los miRNA entre tejido tumoral y sano. Por otro lado, a partir de los resultados de expresión diferencial de miRNA calculados para cada tipo tumoral, llama poderosamente la atención el número tan elevado de miDE en SqCC, 360, con respecto a LAC, solo 82, lo que nos puede indicar un nivel más alto de desregulación en la expresión de los miRNA en SqCC que en LAC. Además, se han identificado dos miDE, el hsa-miR-95-3p y el hsa-miR-548f-5p, que se expresan de forma opuesta entre LAC y en SqCC, lo que se podría ser un carácter diferenciador entre estos dos tipos de tumor.

Con el estudio en profundidad de los núcleos de interacción miRNA-mRNA constatamos la presencia de miDE sobreexpresados mayoritariamente en el segundo núcleo de interacción, lo que nos indica la importancia de este conjunto de miDE en el desarrollo y progresión del cáncer. Es más, el miR-200b-3p ha sido descrito como posible regulador oncogénico en líneas celulares de adenocarcinoma de pulmón ²¹ . De la misma forma, el miR-205-5p es un marcador de SqCC en tejido y suero ²² . Como biomarcador de biopsias líquidas se ha encontrado al miR-196a-5p, detectándose en suero de LAC y SqCC ²³ . Por otro lado, el miR-96 ha sido identificado mediante herramientas bioinformáticas como posible biomarcador de SqCC y LAC ²⁴ . Por último, el miR-130b-5p se ha descrito como oncogén por la inhibición de la metaloproteínase-2 en SqCC y LAC ²⁵ .

Todas estas evidencias nos indican la potencialidad de estos núcleos de interacción, más en concreto, el segundo núcleo de interacción podría ser una fuente para una futura firma génica del cáncer de pulmón.

La limitación principal del presente estudio estriba en el bajo número de pacientes que forman la cohorte, debido en gran medida al alto coste económico de las técnicas de secuenciación. Sin embargo, pensamos que podría ser un punto a partir del cual comprobar si el comportamiento identificado en nuestros pacientes se mantiene en cohortes de mayor tamaño en otras bases de datos, hay que tener en cuenta la fiabilidad mostrada por las técnicas de secuenciación en otros estudios prospectivos.

CONCLUSIONES

En conclusión, en el presente trabajo se ha realizado un análisis masivo de la expresión diferencial de miRNA entre LAC y SqCC, identificando 360 miDE entre tejido tumoral y sano en SqCC, y 82 miDE en LAC. La comparación de ambos resultados muestra 50 miDE comunes a los dos tipos de cáncer en estudio. El análisis funcional de estos miDE comunes nos indica su intervención en el desarrollo del cáncer, formando dos núcleos de interacción bien diferenciados, uno implicado en el crecimiento y desarrollo celular, mientras que el otro está directamente relacionado con el cáncer y el movimiento celular. De estos miDE, 13 de ellos se encuentran sobreexpresados en tejido tumoral, postulándose como posibles biomarcadores idóneos de cáncer de pulmón dado que muchos de ellos ya han sido descritos como posibles biomarcadores tanto en tejido como en biopsias líquidas. Proponemos, para trabajos futuros, un estudio en profundidad de estos miDE, extendiendo el estudio a los fluidos extracelulares, lo que supondría un gran avance al ser una prueba no invasiva.

BIBLIOGRAFÍA

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2020. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2020; 70(1): 7–30.
2. Zhou Y, Abel GA, Hamilton W et al. Diagnosis of cancer as an emergency: a critical review of current evidence. *Nature reviews Clinical oncology*. 2017; 14(1): 45.
3. Pakkala S, Ramalingam SS. Personalized therapy for lung cancer: striking a moving target. *JCI insight*. 2018; 3(15).
4. Romay LM, González JG, Mateos LL. Cáncer de pulmón y biopsia líquida: realidades y retos en la práctica clínica. *Archivos de bronconeumología: Organo oficial de la Sociedad Española de Neumología y Cirugía Torácica SEPAR y la Asociación Latinoamericana de Tórax (ALAT)*. 2019; 55(6): 289–290.
5. Ni M, Liu X, Wu J et al. Identification of Candidate Biomarkers Correlated With the Pathogenesis and Prognosis of Non-small Cell Lung Cancer via Integrated Bioinformatics Analysis. *Frontiers in Genetics*. 2018 Oct;9:469. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2018.00469>.
6. Xiao J, Lu X, Chen X et al. Eight potential biomarkers for distinguishing between lung adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. *Oncotarget*. 2017; 8(42): 71759.
7. Ge Y, Zhang C, Xiao S et al. Identification of differentially expressed genes in cervical cancer by bioinformatics analysis. *Oncology Letters*. 2018 Jun; Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.3892/ol.2018.8953>.
8. MacFarlane LA, R Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*. 2010 Nov; 11(7):537–561. Disponible desde: <http://dx.doi.org/10.2174/138920210793175895>.
9. Inamura K, Ishikawa Y. MicroRNA In Lung Cancer: Novel Biomarkers and Potential Tools for Treatment. *J Clin Med*. 2016 Mar; 5(3).
10. Han Y, Li H. miRNAs as biomarkers and for the early detection of non-small cell lung cancer (NSCLC). *J Thorac Dis*. 2018 May; 10(5): 3.119–3.131.
11. Zhou X, Wen W, Shan X et al. A six-microRNA panel in plasma was identified as a potential biomarker for lung adenocarcinoma diagnosis. *Oncotarget*. 2017 Jan; 8(4): 6.513–6.525.
12. Syn NLX, Yong WP, Goh BC et al. Evolving landscape of tumor molecular profiling for personalized cancer therapy: a comprehensive review. *Expert Opin Drug MetabToxicol*. 2016 Aug; 12(8): 911–22.
13. Kidota T, Yoshioka Y, Fujita Y et al. Extracellular vesicles in lung cancer-From bench to bedside. *Semin Cell Dev Biol*. 2017 Mar; 67: 39–47.
14. Pan D, Chen J, Feng C et al. Preferential Localization of MUC1 Glycoprotein in Exosomes Secreted by Non-Small Cell Lung Carcinoma Cells. *Int J Mol Sci*. 2019 Jan; 20(2): 323.
15. Chen M, Xu R, Ji H et al. Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line. *Sci Rep*. 2016 Dec; 6:DOI:10.1038/srep38397.
16. Savelyeva AV, Kuligina EV, Bariakin DN et al. Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions. *Biomed Res Int*. 2017;DOI:10.1155/2017/7404912.
17. Falgueras J, Lara AJ, Fernández-Pozo N et al. SeqTrim: a high-throughput pipeline for pre-processing any type of sequence read. *BMC Bioinformatics*. 2010 Jan; 11:38.
18. Rahman RU, Gautam A, Bethune J et al. Oasis 2: improved online analysis of small RNA-seq data. *BMC Bioinformatics*. 2018 02; 19(1): 54.
19. Langmead B, Trapnell C, Pop M et al. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol*. 2009; 10(3): R25.
20. Love MI, Huber W, Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. 2014; 15(12): 550.
21. Liu K, Zhang W, Tan J et al. MiR-200b-3p Functions as an Oncogene by Targeting ABCA1 in Lung Adenocarcinoma. *Technol Cancer Res Treat*. 2019; 18: DOI: 10.1177/1533033819892590.
22. Jiang M, Zhang P, Hu G et al. Relative expressions of miR-205-5p, miR-205-3p, and miR-21 in tissues and serum of non-small cell lung cancer patients. *Mol Cell Biochem*. 2013 Nov; 383(1-2): 67–75.
23. Bao M, Pan S, Yang W et al. Serum miR-10a-5p and miR-196a-5p as non-invasive biomarkers in non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2018; 11(2): 773–780.
24. Cai T, Long J, Wang H et al. Identification and characterization of miR-96, a potential biomarker of NSCLC, through bioinformatic analysis. *Oncol Rep*. 2017 Aug; 38(2): 1.213–1.223.
25. Hirono T, Jingushi K, Nagata T et al. MicroRNA-130b functions as an oncomiRNA in non-small cell lung cancer by targeting tissue inhibitor of metalloproteinase-2. *Sci Rep*. 2019 05; 9(1): 6.956.