



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

TÍTULO: Papel de los ARNs no codificantes en el desarrollo de enfermedades hepáticas.

Autor: Yus Ezquerra, Federico

Tutor: Escribano Illanes, Óscar

Convocatoria: Junio 2020

Tabla de contenido

Resumen	3
Introducción	4
Objetivos.....	5
Material y métodos	5
Resultados y discusión	5
Biogénesis endógena de los miRNA.....	5
Importancia de los miRNAs en el establecimiento y desarrollo del cáncer por su papel regulador de la proliferación y la apoptosis	7
Papel de los miRNA en la progresión metastásica del hepatocarcinoma celular	9
MicroRNAs exosomales como mediadores clave en el desarrollo y progresión del hepatocarcinoma celular	10
Aplicaciones diagnósticas de los miRNA	12
Aplicaciones terapéuticas de los miRNA	15
Conclusión	17
Bibliografía	18

Resumen

Los miRNA son pequeñas moléculas de RNA de alrededor de 22 nucleótidos encargados de la regulación postranscripcional de la expresión génica. Como protagonistas del control de la expresión, las alteraciones que sufren tienen consecuencias fisiológicas y patológicas, entre ellas el cáncer.

En este trabajo se analiza su implicación en el desarrollo, implantación y progresión del hepatocarcinoma celular. Se estudia detalladamente el rol de miR-503 como regulador de la proliferación celular por su estrecha relación con las proteínas reguladoras del ciclo celular, así como la implicación de miR-377 en el control de la muerte programada de las células tumorales. Asimismo, se examina la implicación de ciertos miRNA, como miR-122 y miR-148a en la progresión metastásica de la enfermedad, además de investigar el papel de estas pequeñas moléculas en la comunicación celular entre los tejidos.

Por último, la revisión se enfoca desde un punto de vista clínico y se baraja la posibilidad de implementar los microRNA en el diagnóstico y el tratamiento del cáncer de hígado, como nuevas terapias génicas, exponiendo el papel de algunos de ellos como miR-21, miR-122 y miR-335-5p.

Palabras clave: Hepatocarcinoma celular, proliferación, apoptosis, miR-122...

Abstract

MiRNAs are small RNA molecules of about 22 nucleotides that are responsible for the post-transcriptional regulation of gene expression. As main characters of the control of expression the alterations they suffer have physiological and pathological consequences, including cancer.

This paper analyzes its involvement in the development, implantation and progression of cellular hepatocarcinoma. The role of miR-503 as a regulator of cell proliferation is studied in detail due to its close relationship with cell cycle regulatory proteins, as well as the implication of miR-377 in the control of programmed death of tumor cells. In addition, the involvement of certain miRNAs, such as miR-122 and miR-148a, in the metastatic progression of the disease is examined, in addition to investigating the role of these small molecules in cellular communication between tissues

Finally, the review is focused from a clinical point of view and the possibility of implementing microRNAs in the diagnosis and treatment of liver cancer is considered, as new gene therapies, exposing the role of some of them as miR-21, miR-122 and miR-335-5p.

Key words: Cellular hepatocarcinoma, proliferation, apoptosis, miR-122...

Introducción

Se conoce como RNA no codificante a las moléculas que han sido transcritas a partir de DNA pero que no tienen potencial para codificar proteínas. Son alrededor del 90% del RNA total, por lo que equivalen a la gran mayoría de este. Además de acuerdo con la última versión del genoma humano, este contiene 3200 millones de nucleótidos, de los cuales únicamente 20.000 codifican para proteínas, por lo que la gran mayoría de lo que se transcribe no transcende en forma de síntesis proteica (1). El RNA no codificante ha sido considerado como no funcional durante décadas, pero actualmente conocemos que forma parte de la mayoría de procesos celulares y las modificaciones en estos están asociadas con enfermedades, entre las que se incluye el cáncer (2).

De acuerdo con la longitud y la forma, el RNA no codificante puede subdividirse en diferentes tipos: RNA de cadena larga (lncRNA) que suele ser de más de 200 nucleótidos, RNA circular (cRNA) y RNA de cadena corta, donde encontramos a su vez diferentes formas como RNA de transferencia (tRNA), RNA ribosomal (rRNA), RNA pequeño nucleolar (snRNA) o microRNA (miRNA). Este último es la pieza clave de una red de regulación postranscripcional esencial en el desarrollo de la gran mayoría de los procesos biológicos de diferente especies, entre los que se incluyen los vertebrados (3).

Los microRNA son pequeñas moléculas de RNA endógeno no codificante de entre 18 y 25 nucleótidos y una sola hebra de nucleótidos, reguladores negativos de la transcripción. Son moléculas muy conservadas durante la evolución y actualmente se conocen más de 1900 genes que codifican para ellas (4). La primera descripción de estas moléculas data de 1993, del nematodo *Caenorhabditis elegans* y de su implicación en el desarrollo larvario de esta especie. Este descubrimiento supuso un cambio del paradigma regulatorio, y actualmente se conoce que el 60% de los genes que codifican para proteínas presentan sitios de unión para los microRNA, siendo susceptibles de su acción represora (5).

El método por el que estas moléculas ejercen su función se basa en el silenciamiento de la traducción de los mRNA. Puede ser por bloqueo de la maquinaria de traducción o por degradación del propio mRNA. En presencia del complejo silenciador RISC, los ribosomas no pueden acoplarse debido a que se bloquea la unión del factor de iniciación de la traducción (eIF4E) imposibilitando la función. Por el contrario, cuando produce la degradación del mRNA se debe a una desadenilación de la cadena poli(A) del mismo, provocada por el reclutamiento de maquinaria celular por parte de RISC. Este último método es predominante, pero está precedido temporalmente por el bloqueo de la traducción (5).

Debido a la capacidad de los miRNA de modular la expresión de genes se han relacionado estrechamente con enfermedades, y muy particularmente con el cáncer. La primera relación directa se halló en 2002, en la que se implicaba los miR-15 y miR-16 con la leucemia linfocítica crónica. Los microRNA que se relacionan con el cáncer se conocen como oncomiRs y pueden regular tanto genes supresores de tumores como oncogenes, siendo reguladores positivos o negativos de la enfermedad, respectivamente. Asimismo, se conoce que los genes que codifican para los microRNA

se encuentran regularmente en zonas de los cromosomas conocidas como 'regiones frágiles', que están muy asociadas con fallos estructurales, lo que provoca acumulación de errores (6).

Se han propuesto dos mecanismos que explican la causa por la que existe una inhibición global de los miRNA en las células cancerígenas. Una hace referencia a una biogénesis alterada de estas moléculas y la otra implica la represión transcripcional por parte de factores de transcripción oncogénicos, como MYC, que se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, que inhibiría la expresión de microRNA supresores de tumores. Pese a ello, todavía no existe una hipótesis clara pero se cree que la forma en la que los miRNA contribuyen al desarrollo de este tipo de enfermedades es muy similar a como lo hacen factores de transcripción asociados al cáncer, como el anteriormente nombrado, que están mediados por muchos factores como el micro-entorno o el tipo celular (6).

Objetivos

El objetivo de esta revisión bibliográfica es analizar el papel del ARN no codificante, mas concretamente los microRNA en el desarrollo y progresión del hepatocarcinoma celular. Asimismo, se analiza su importancia en el diagnóstico y el tratamiento de esta patología, atendiendo a los mecanismos moleculares y las rutas biológicas implicadas en ello.

Material y métodos

Para el desarrollo del trabajo se realizó una búsqueda bibliográfica basada en diferentes artículos científicos encontrados en la base de datos PubMed, así como publicaciones universitarias reflejadas en la bibliografía. Toda la información recopilada a través de las diferentes fuentes tuvo como finalidad contribuir al desarrollo de los objetivos previamente fijados.

Los términos mas utilizados en esta búsqueda fueron "microRNA", "HCC", además de los nombres de los microRNA específicos.

Resultados y discusión

Biogénesis endógena de los miRNA

Los microRNA se encuentran codificados en el genoma de diferentes formas. Pueden estar agrupados en familias conocidas como clusters, codificando un numero variable de miRNAs y que son transcritos a partir de un mismo miRNA primario y están regulados de igual forma. Otros miRNAs se encuentran en forma de intrones, llamados también miRtrones, y existen también algunos codificados en exones no codificantes para proteínas. El resto de los microRNA se codifican en sus propios genes donde su transcripción esta regulada individualmente (7).

Los miRNA son transcritos por la RNA polimerasa II, en unos precursores conocidos como pri-miRNAs. Estos pri-miRNAs se reajustan en estructuras de horquilla, las cuales contienen imperfecciones en la complementariedad de bases, formando bucles en esta

estructura. Dentro del núcleo es procesada por una endonucleasa llamada Drosha ayudada por un cofactor DGCR8 (de las siglas en inglés Di George syndrome critical región 8) encargado de la unión a la doble cadena de RNA, transformándola en una horquilla de 60-100 nucleótidos. A estas dos proteínas se le conocen como complejo microprocesador y a la estructura resultante de este proceso se conoce como pre-miRNA.

El pre-miRNA es exportado del núcleo al citoplasma por la exportina-5 (XPO5) donde será procesado por Dicer, una endonucleasa con dos dominios RNAasa III muy similar a Drosha. También se asocia con otra proteína conocida en mamíferos como TRBP. El pre-miRNA sufre una escisión en la zona cercana al bucle de las dos hebras formando el dúplex de miRNA:miRNA*, con dos cadenas de RNA complementarias.

Por ultimo, este miRNA dúplex es transferido a una proteína de la familia argonauta (AGO), que forma el complejo silenciador inducido por miRNA (miRISC). Lo hace con ayuda de proteínas chaperonas HSP70/HSP90 y con coste de energía en forma de ATP. Se selecciona una hebra de este dúplex que será la que forme el miRNA maduro, mientras que la otra se desechará. La proteína AGO cargada con el miRNA se disocia del Dicer y forma RISC, encargado de llevar a cabo el silenciamiento (8–10).

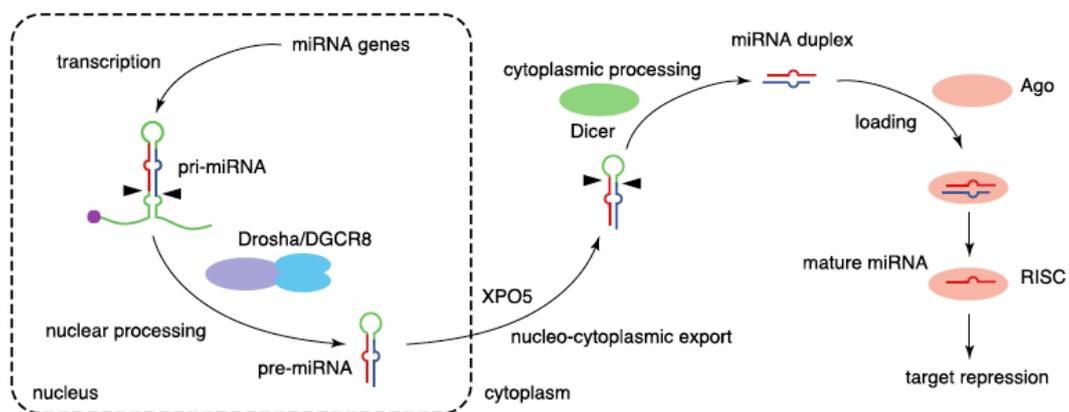


Figura 1: Ruta de biosíntesis de microRNAs (12).

La elección de la cadena que forma parte del complejo silenciador y cual es desechada dependerá de la estabilidad termodinámica del extremo 5' de cada una de ellas. Aquella que tenga menor estabilidad será seleccionada como la hebra guía. Pese a que los mecanismos moleculares no están establecidos, se cree que es porque la menor estabilidad facilita su unión con el dominio de la proteína Ago (11).

El reconocimiento de las dianas del microRNA depende principalmente de una secuencia de este comprendida entre los nucleótidos 2 y 7 del mismo. Debido a que se trata de una secuencia pequeña, un único miRNA puede tener como diana cientos de RNA mensajeros, y se ha sugerido que la selección de la diana esta influenciada por proteínas de unión a RNA (RBPs) y otras moléculas como RNA circular o RNA competitivo endógeno (RNACE), pero no está claro.

El procesamiento de los pri-miRNAs y los pre-miRNAs ocurren en cuestión de minutos o segundos, de forma más rápida que la generación de sus mRNAs. Mientras que la formación de RISC ocurre aproximadamente una hora después del inicio de la biogénesis, sugiriendo que la formación del complejo silenciador en el proceso limitante que se asegura la producción óptima de los miRNAs. La degradación de estos, además, es normalmente lenta, siendo su vida media de unas diez horas, convirtiendo a los microRNAs en los RNAs de vida más prolongada (12).

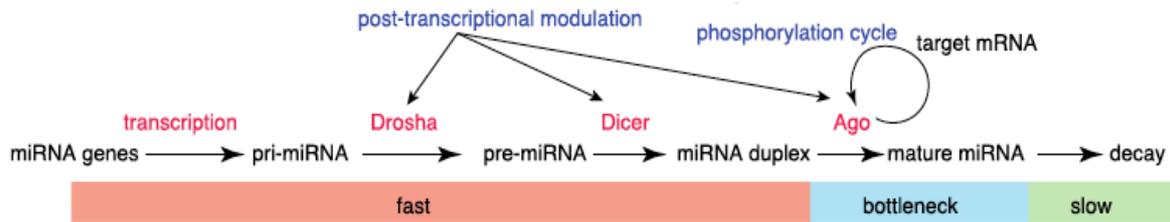


Figura 2: Dinámica de la biosíntesis de miRNA (12).

Importancia de los miRNAs en el establecimiento y desarrollo del cáncer por su papel regulador de la proliferación y la apoptosis

Existe un consenso general que afirma que una de las características propias del cáncer es la proliferación descontrolada de las células de los tejidos, en un desbalance completo entre el crecimiento y la muerte celular. La regulación de la proliferación celular y el crecimiento están regulados por la maquinaria de control del ciclo celular. Los puntos de control impiden que el ADN dañado se duplique y se transfiera a la descendencia, evitando acumulación de daño y desarrollo de posibles enfermedades, como en este caso el cáncer.

Los microRNAs participan en la regulación de gran parte del genoma, por ello tienen papel importante en la regulación del ciclo celular. Además, existen evidencias de que pueden actuar como promotores o supresores de tumores (13,14).

Uno de los microRNA que regula ciertos puntos de control del ciclo celular es el miR-503. Es conocido por ser un supresor de tumores, y en caso particular se encuentra regulado a la baja en los tejidos del cáncer de hígado. El miR-503 evita la proliferación de células HCC por arresto del ciclo celular en la fase G1/S. Los mecanismos moleculares por los que lleva a cabo este arresto tienen que ver con los genes de las proteínas relacionadas con el ciclo celular, ciclina D3 y E2F3, que son componentes indispensables de la ruta de iniciación, desde la fase G1 a la fase S de la interfase.

La progresión del ciclo celular es activada directamente por una serie de heterodímeros formados por las nombradas ciclinas y las quinasas dependientes de ciclinas (CDKs). La transición G1/S es regulada por ciclinas tipo D (D1, D2, D3) junto con las CDK4 y CDK6, que al interaccionar llevan a cabo la fosforilación de la proteína del retinoblastoma (Rb)

que libera el factor de transcripción E2F, lo que conduce a la transición de fase. La proteína Rb es supresora de tumores y desempeña un papel fundamental en el control negativo del ciclo celular.

Xiao *et al.* describieron que las dianas de miR-503 se trataban de los genes que transcribían para la ciclina D3, para el factor de transcripción E2F3 y para CDK6. MiR-503 llevaba a cabo el silenciamiento de estos genes inhibiendo la traducción de su RNA mensajero y no por la degradación de estos. Dedujeron que los niveles bajos de miRNA favorecían el paso de fase G1 a fase S por la falta de inhibición de la formación de las proteínas D3 y E2F3. Esto producía un aumento de la población celular en fase G1 de las líneas celulares con las que habían trabajado. Por último, habría que añadir que los mecanismos responsables de la disminución de la expresión de miR-503 en hepatocarcinoma son desconocidos todavía (15).

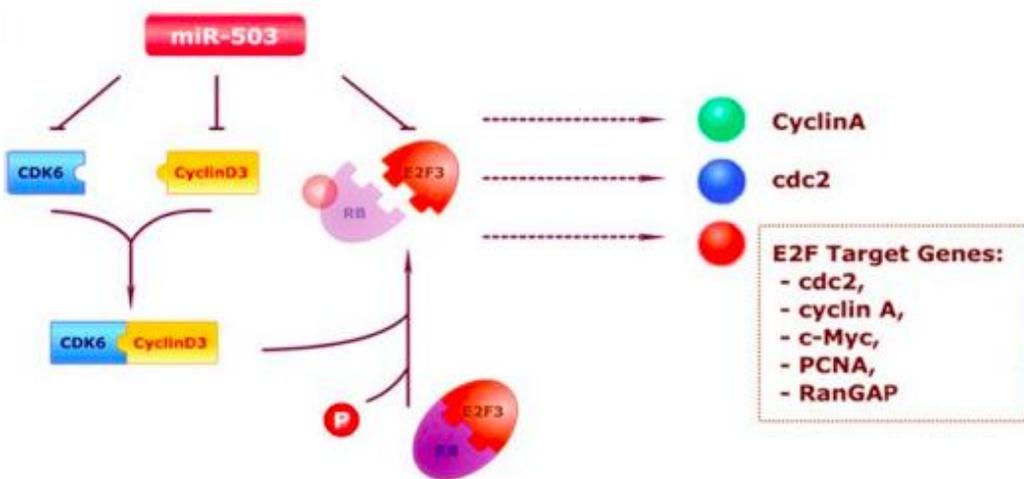


Figura 3: Mecanismo de acción de miR-503 (15).

Se conocen abundantes microRNAs que regulan diferentes puntos críticos del ciclo celular. Mir-195 y miR-200a, por ejemplo, encargados igual que miR-503 del arresto de las células en la fase G1, gracias a mecanismos similares de inhibición de la expresión de CDK6. Mir-145 por otro lado induce el arresto del ciclo en la fase G2 antes de la mitosis. En conclusión los microRNA son una pieza clave en la proliferación tumoral y en el control del ciclo celular (16,17).

Por otro lado, la apoptosis, o muerte programada, es considerada una característica esencial en lo que al mantenimiento de la homeostasis celular y tisular se refiere. El daño en el ADN induce o bien la reparación de este o bien la destrucción de la célula que lo presenta, esto ocurre en células sanas. En células tumorales, la ruta apoptótica se encuentra perturbada y puede derivar en adquisición de propiedades de inmortalidad o resistencia a los tratamientos, esta cualidad es característica del desarrollo de enfermedades como el cáncer.

Este mecanismo está regulado por el balance entre proteínas de la familia Bcl-2, entre las que se encuentran las pro-apoptóticas (Bak y Bax) y las anti-apoptóticas (Bcl-xL y Mcl-1). Se conoce además que Bcl-xL está sobreexpresada en un tercio de los hepatocarcinomas humanos y confiriéndole resistencia a la eliminación de las células cancerígenas (18).

En este caso, existe un microRNA cuya diana específica es el gen de Bcl-xL, el miR-377 y que en el caso de hepatocarcinoma celular se encuentra en niveles muy disminuidos. Lleva a cabo la regulación postranscripcional por unión a la región 3'-UTR del RNA mensajero y por inhibición de la traducción.

Para comprobar el rol de miR-377 en HCC Hongyan *et al.* compararon los niveles de expresión en hepatocitos con los niveles expresados en líneas celulares cancerígenas mediante qRT-PCR. Se encontraron con niveles sustancialmente bajos en las líneas celulares no sanas, como esperaban. Asimismo, analizaron la relación de la expresión de miR-377 con la expresión de Bcl-xL, comprobando que, al aumentar la presencia de miRNA, disminuía el mRNA y la cantidad de proteína presente de Bcl-xL. Esto conllevaba un aumento de la apoptosis de las células tumorales y por ello concluyeron que los niveles bajos miR-377 inducían una disminución de la apoptosis por la no inhibición de la proteína Bcl-xL en tejidos cancerígenos. También propusieron que el restablecimiento de los valores normales de miR-377 podría suponer una potencial diana terapéutica en el tratamiento contra el HCC (19).

Papel de los miRNA en la progresión metastásica del hepatocarcinoma celular

La metástasis es la causa principal de muerte en pacientes con cáncer. Se define como la migración de células cancerígenas desde la masa de tumor primaria y colonización de zonas alejadas, lo que incluye invasión localizada, intravasación, transporte a otros órganos, extravasación y colonización.

La transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso natural en el que las células epiteliales adquieren características mesenquimales, y se cree que juega un papel esencial en la invasión y la metástasis. Durante este proceso, disminuye la expresión de marcadores epiteliales como la E-Cadherina y aumentan los marcadores mesenquimales como N-Cadherina, vimentina o fibronectina. Las células epiteliales pierden su polaridad y su capacidad de adhesión celular y ganan propiedades migratorias. Además, se conoce que está regulado íntimamente por los microRNAs, siendo el ejemplo más claro en el cáncer la familia de miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c) que bloquea la expresión de los factores de transcripción Zeb1 y Zeb2 encargados, entre otros, del paso del fenotipo epitelial a mesenquimal (20,21).

Por otro lado, en el caso del cáncer de hígado, existen microRNAs que regulan específicamente la EMT. MiR-122 es el microRNA más abundante en el hígado, siendo el 70% del total de los microRNAs de este órgano. Está implicado en la diferenciación de los hepatocitos, en la homeostasis hepática, en el metabolismo del colesterol y de los ácidos grasos, la resistencia insulínico-hepática, y procesos patológicos como la fibrosis, la cirrosis, la inflamación y la replicación del virus de la hepatitis C. Además, existen

evidencias de que actúa como supresor de tumores, inhibiendo la proliferación, la apoptosis, la resistencia a tratamientos y la metástasis.

La expresión de este miRNA está relacionada con la presencia de factores de transcripción hepáticos, como HNF1 α , HNF3 α , HNF3 β , y más concretamente con HNF4 α , que estimulan la transcripción de miR-122 uniéndose a su promotor. Por ello, se relaciona la pérdida de expresión de estos factores de transcripción con una disminución de los niveles de miR-122 y un desarrollo más rápido y más invasivo del hepatocarcinoma (22).

Con relación a su implicación directa en la transición epitelio-mesénquima, miR-122 se une a la región 3'-UTR del gen RhoA, uno de los componentes de la ruta RhoA/Rock encargados de la reorganización del citoesqueleto y por lo tanto implicados en la invasión y metástasis celular. Además, RhoA se encuentra sobreexpresado en muchos tipos de cáncer, incluido HCC y está relacionado con fenotipos más agresivos de esta patología y mayor probabilidad de metástasis (23).

MiR-148a también se encuentra a bajos niveles en el hepatocarcinoma, pero además se ha demostrado que se encuentra en niveles todavía más bajos en los tejidos metastásicos en comparación con los no metastásicos. También existen evidencias de que una restauración de los niveles de miR-148a en los tejidos disminuyen la migración y la invasión tanto *in vitro* como *in vivo* (24).

MiR-148a, inhibe la EMT anulando la expresión de Met, uniéndose a la región 3'-UTR de este y atenuando la vía HGF (Hepatocyte Growth Factor) /Met /Snail. Met es un receptor tirosina quinasa, que suele estar sobreexpresado en diferentes tipos de malignidades incluido el cáncer. Este receptor activa el transductor de señales AKT que inhibe la fosforilación y la ubiquitinación del factor de transcripción Snail. Esto provoca una acumulación nuclear de Snail y aumenta la expresión de marcadores mesenquimales e inhibe la transcripción de E-Cadherina. MiR-148a inhibe también la hipermetilación del gen de E-Cadherina, debido a que bloquea dos DNA metiltransferasas, DNMT1 y DNMT3B (24).

En resumen, miR-148a aumenta la expresión de E-Cadherina y reduce la de marcadores mesenquimales, pudiendo revertir así el fenotipo mesenquimal que se asocia con mayor invasividad. Esto le convierte en una posible diana terapéutica en la lucha contra la metástasis del hepatocarcinoma celular.

MicroRNAs exosomales como mediadores clave en el desarrollo y progresión del hepatocarcinoma celular

Los exosomas tienen un papel vital en la mediación entre las células HCC y las células y los tejidos que le rodean. Transfieren el RNA activo (miRNA, lncRNA, tRNA, rRNA) y proteínas a células adyacentes y desencadenan rutas de señalización en estas facilitando la formación de tumores, la angiogénesis, la resistencia a tratamientos, la proliferación y la metástasis. Además, son más estables en el medio al no poder ser degradados por enzimas, por lo que son ideales como biomarcadores biológicos de la enfermedad. (25)

En el hígado los principales productores de exosomas son los hepatocitos, las células inmunológicas, tales como macrófagos, las células dendríticas, los linfocitos T/B o células NK, y las células del estroma, como células estrelladas (26).

MiR-122 es específico del hígado, como hemos comentado, con capacidad para inhibir la proliferación tumoral. Fue descubierto que este miR-122 era liberado en exosomas desde células hepáticas Huh7 hacia células HepG2 deficientes en miR-122, reprimiendo la proliferación celular de estas células tumorales. Por otro lado, vieron que las células HepG2 podían excretar factor de crecimiento insulínico tipo I (Insuline-like Growth factor, IGF-1) para reducir la expresión de miR-122 en células Huh7 y asegurar su propia proliferación y crecimiento, como forma de supervivencia. Esto confirmaba el papel clave de comunicación de los exosomas (27).

La matriz extracelular es un componente del entorno tumoral y sus características juegan un importante papel regulador en el desarrollo de la enfermedad. Fibroblastos asociados al cáncer (CAFs) y macrófagos asociados a tumores (TAMs) son componentes de la matriz extracelular muy ligados a la metástasis. El incremento de la expresión de miR-1247-3p en exosomas de HCC puede llevar a la inhibición de las β -1,4-galactosiltransferasas (B4GALT3), lo que activa la ruta β 1/NF- κ B e induce la transformación de fibroblastos sanos en CAFs. Estos CAFs secretan citoquinas inflamatorias como IL-6 e IL-8, que promueven la progresión tumoral. Además, la alta concentración de este microRNA esta ligada a una mayor probabilidad de metástasis pulmonar del hepatocarcinoma (28).

Por otro lado, se ha demostrado que miR-21 induce la diferenciación de monocitos en macrófagos asociados a tumores M2 gracias a la inhibición de la expresión de PDC4 (Programmed Cell Death 4) y la interleucina IL-12A. Asimismo estos TAMs presentan alta expresión de TGF- β 1, lo que puede derivar en EMT, promoción de la proliferación de células madre cancerígenas (Cancer Stem Cells, CSCs) y aumento de invasividad de las células del hepatocarcinoma (29). Se sugirió también que miR-21 activaba la transformación de HSC (células hematopoyéticas humanas) hacia CAFs regulando la ruta PTEN/PDK1/Akt. Esta ruta de señalización involucra funciones muy diversas, desde proliferación hasta metabolismo. Esta transformación estaría implicada en progresión tumoral del hepatocarcinoma (30).

Asimismo, los exosomas tienen un importante papel en la angiogénesis. Debido a la rápida reproducción de las células cancerígenas, a medida que el volumen tumoral aumenta la irrigación sanguínea se vuelve insuficiente quedando las células internas de las masas tumorales bajo condiciones de hipoxia. Como respuesta a estas condiciones se activan vías de creación de neovascularización, la cual esta mediada por micro RNA exosomal.

El factor 1α inducido por hipoxia (HIF- 1α) es uno de los principales reguladores en respuesta a las condiciones de hipoxia. Regula la función endotelial vía VEGF/VEGFR. En HCC bajo condiciones hipóxicas, se ha detectado un aumento de la expresión de cadenas largas no codificante de ARN (linc-RoR) que aumenta la viabilidad de las células modulando la expresión HIF- 1α (31). Asimismo, miR-155 exosomal producido como

consecuencia de la estimulación hipóxicas pueden inducir vascularización en HUVECs (células endoteliales de cordón umbilical humano) y su mayor expresión en suero de pacientes esta asociado con mayor posibilidad de recurrencia (32).

Los exosomas originados en las lesiones tumorales primarias transportan miR-103 a las células endoteliales, las cuales sufren una reducción de la expresión de múltiples factores de adhesión endoteliales como VE-Cadherina o ZO-1. Esto provoca un aumento de la permeabilidad vascular, lo que facilita el movimiento de las células tumorales (33).

También están implicados en la resistencia que desarrollan los tumores a los tratamientos, los exosomas derivados de células quimiorresistentes liberan miRNAs y transfieren fenotipos dañinos a células sensibles. Fu *et al.* demostraron que las células resistentes Bel/5-FU transfieren miR-32-5p a células sensibles, uniéndose a la región complementaria 3'-UTR de PTEN y activando la vía PI3K/Akt y STAT3 lo que aumentaba los niveles de VEGF. Además, se observaron propiedades mesenquimales acompañadas del aumento de expresión de N-Cadherina y una disminución de E-Cadherina, lo que concluyó que la resistencia se adquiría por mecanismos de EMT y angiogénesis (34).

Aplicaciones diagnósticas de los miRNA

El cáncer de hígado es el sexto cáncer más diagnosticado del mundo y fue la cuarta causa de muerte por cáncer en el 2018. Actualmente es la segunda causa de muerte por cáncer en hombres y la sexta en mujeres. Además, solo un 18% de los diagnosticados sobreviven mas de 5 años. Esto se debe a un diagnostico subóptimo de esta enfermedad, que se hace en etapas avanzadas. Esta condicionado por numerosos factores de riesgo como virus de la Hepatitis B (HBV), virus de la Hepatitis C (HCV), la exposición a aflatoxina, enfermedad de hígado graso no alcohólico y enfermedad de hígado graso alcohólico. Sobre todos, destaca la cirrosis que la presentan un 70% - 90% de los enfermos de HCC de forma previa (35)(36).

Debido a que esta patología no presenta manifestaciones claras en los primeros estadios los pacientes pierden la oportunidad de imponer un tratamiento optimo. Por ello un diagnóstico temprano es el requisito más importante para la superación del HCC. En la práctica clínica, el diagnóstico esta basado en métodos de imagen (resonancia magnética y tomografía), marcadores tumorales hepáticos (alfa-fetoproteína, AFP) y biopsias histopatológicas. Sin embargo, la sensibilidad de AFP es baja (40%-65%), los diagnósticos por imagen tienen baja sensibilidad y el análisis histopatológico también tienen limitaciones debido a su elevada invasividad ya que no pueden ser utilizadas como técnicas rutinarias. (36–38)

Las biopsias líquidas han sido propuestas en los últimos años como método novedoso de diagnóstico. Son rápidas, económicas y la invasividad es mínima. Además, pueden ser usadas para el diagnostico precoz, la monitorización y el control del pronostico de la enfermedad e incluso en un cribado poblacional mayor. Los fluidos fisiológicos pueden contener células tumorales circulantes (CTCs), DNA tumoral y exosomas. Estos últimos están presentes en sangre, orina, saliva y la mayoría de los fluidos corporales, conteniendo microRNAs entre otras moléculas diagnósticas. Además, se ha descubierto

que, en el plasma de pacientes con patologías como el cáncer, circulan el doble de exosomas que en pacientes sanos (39). Esto, añadido a que pueden transportar moléculas específicas, como los microRNA, les convierte en los marcadores diagnósticos circulantes perfectos.

Uno de estos posibles microRNA utilizados en el diagnóstico es miR-21. Está altamente implicado en el desarrollo tumoral de muchos tipos de cánceres, como el de mama, el de páncreas, el colorrectal o el de próstata, considerándose un oncomir. Promueve la proliferación, la metástasis y la resistencia a tratamiento en hepatocarcinoma celular (40).

Recientemente Jua Qu. *et al* llevaron a cabo un análisis de la sensibilidad y la especificidad de este microRNA como marcador diagnóstico. El estudio demostró que miR-21 presentaba una sensibilidad de 85.2% (73.3% - 88.4%), que era muy superior a la presentada por AFP y por las técnicas de imagen. Además, el área bajo la curva (AUC) era de 0,89 (95% CI:0,85 – 0.91), superior también al AUC de AFP (0.81).

Pese a ello existe un consenso que acepta que debe existir una combinación de parámetros de diagnóstico, debido a que aumenta su sensibilidad y su especificidad. Por ejemplo, una combinación de miR-21 y AFP tiene un AUC de 0.971 en discriminar pacientes con HCC y pacientes sanos (41). Una evaluación clínica usando múltiples factores, puede otorgar un resultado más preciso en el diagnóstico.

De acuerdo con esto, Shuo Wang *et al.* investigaron recientemente el papel de un conjunto de miRs (miRNA-96, miRNA-122 y miRNA-21) en el diagnóstico temprano de hepatocarcinoma. Se dieron cuenta que era más preciso el diagnóstico cuando utilizaban los miRNAs exosomales que los plasmáticos o el nivel de AFP. Además, gracias a esto pudieron diferenciar mejor a pacientes con HCC de pacientes cirróticos, muy importante debido al papel establecedor que tiene la cirrosis para desarrollo del hepatocarcinoma celular.

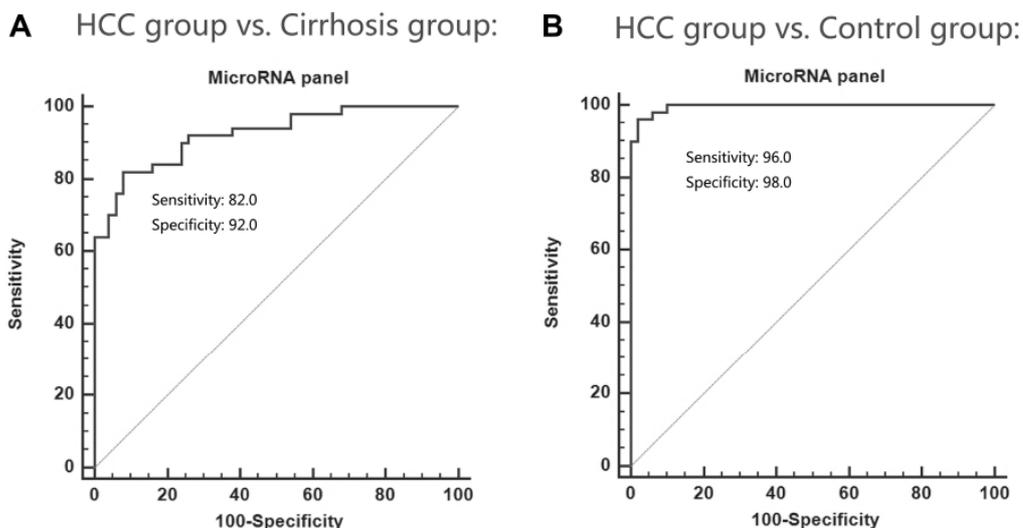


Figura 4: Curva ROC de la precisión de diferenciar pacientes HCC vs (A) Pacientes cirróticos y (B) Pacientes sanos, con el conjunto de microRNAs (42).

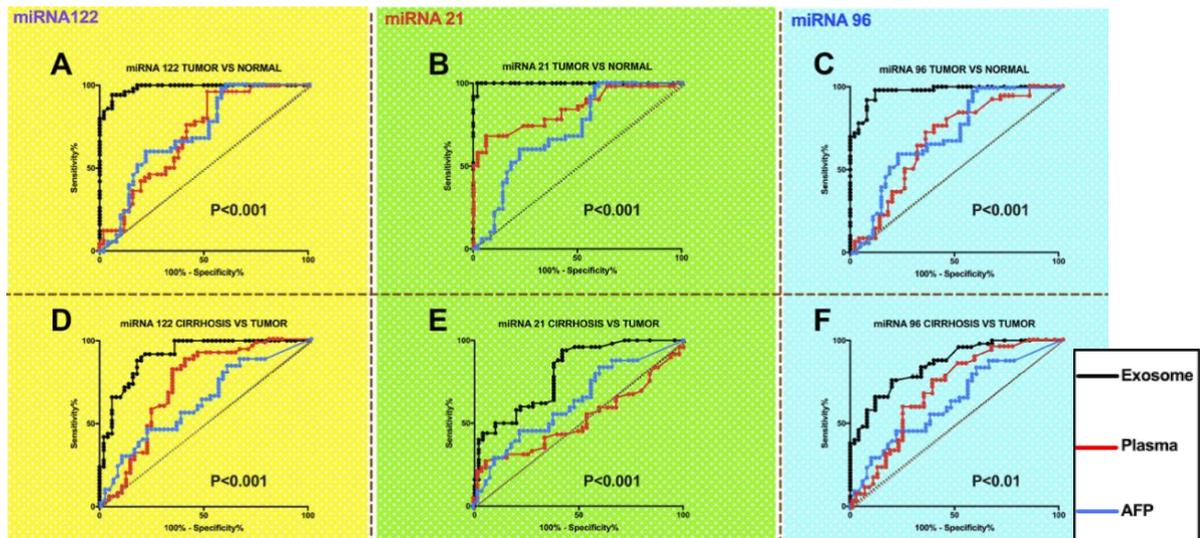


Figura 5: Comparación diagnóstica para pacientes con HCC en miRNA exosomal, miRNA plasmático y niveles de AFP de diferentes microRNAs (42).

Los resultados de este estudio concluyeron que la expresión exosomal de miR-122, miR-21 y miR-96 era mejor en términos diagnósticos de sensibilidad y especificidad que la expresión sérica de los mismos. Los valores del conjunto para diferenciar entre HCC y sujetos sanos fueron AUC 0.996, IC95%; con una sensibilidad del 96% y una especificidad del 98%. Los valores para diferenciar entre sujetos con HCC y sujetos cirróticos fueron AUC 0.924, IC95%; con una sensibilidad del 82% y una especificidad del 92%.

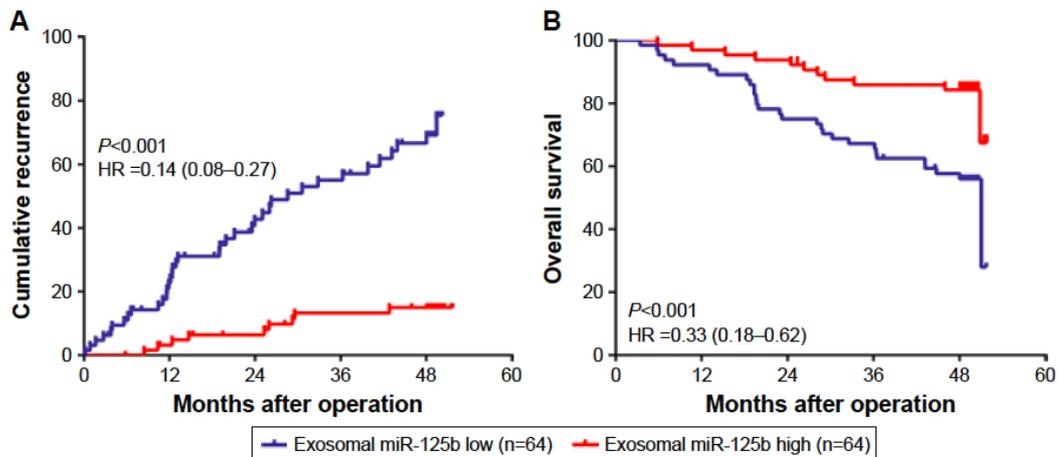
Además del valor diagnóstico, los microRNA tienen valor pronóstico en cuanto al desarrollo de la enfermedad. Los pacientes del estudio que presentaban una expresión aumentada de miR-96 y miR-21, así como los que expresaban menor nivel de miR-122 tenían peor pronóstico en el desarrollo de la enfermedad y una probabilidad mayor de recurrencia (42).

Por ello se han desarrollado estudios en los que se implica el valor pronóstico de estos microRNAs para controlar el desarrollo de la enfermedad y el tiempo de supervivencia de los individuos. Uno de estos estudios lo llevaron a cabo Liu *et al.* utilizando el microRNA-125b, conocido por ser un supresor de tumores, cuyos niveles se encuentran disminuidos en HCC. Además, los niveles séricos de este se relacionan con el número de tumores, la encapsulación y la metástasis ganglionar lo que aporta mayor relevancia clínica.

Los resultados obtenidos indicaban un área bajo la curva ROC de 0.739, con una sensibilidad de 83.0% y una especificidad de 67.9% para la predicción de la recaída; y un AUC de 0.702 con una sensibilidad de 82.5% y una especificidad de 53.4% para la supervivencia total de los pacientes, después de haber sufrido una cirugía de resección (43).

Gracias a ello se podría llevar a cabo un seguimiento de los pacientes para reconocer aquellos con peores pronósticos y mayores riesgos y poder aplicar medidas específicas. En términos generales, el análisis de los microRNA en la práctica clínica tiene que

desarrollarse más, pero muestran resultados esperanzadores y pueden convertirse en nuevas prácticas clínicas.



Estimador Kaplan-Meier de la recurrencia y la supervivencia en pacientes HCC (43).

Aplicaciones terapéuticas de los miRNA

Hay alrededor de 840.000 casos nuevos de HCC diagnosticados y al menos 780.000 de ello mueren cada año. Los tratamientos más utilizados son la resección quirúrgica, el trasplante de hígado o la administración local de radioterapia/quimioterapia. Sin embargo y como se comentaba anteriormente, la falta de diagnóstico temprano dificulta el tratamiento eficaz.

La mayoría de los pacientes son diagnosticados en etapas avanzadas de la enfermedad en las que los tratamientos son la quimioembolización transarterial (TACE) o terapias dirigidas con fármacos. Uno de estos fármacos es el sorafenib, inhibidor de Raf-kinasa y distintos receptores de tirosinas kinasas implicados en la tumorigénesis, la progresión tumoral y la vascularización. En la mayoría de tumores induce la apoptosis inhibiendo la proteína antiapoptótica Mcl-1 vía MEK/ERK (44).

Los mecanismos de resistencia tumoral de HCC a los tratamientos son complejos y están regulados por múltiples vías y factores, entre ellos los miRNAs. Existen estudios que abalan que contrarrestar la expresión de ciertos miRNAs en células resistentes a la quimioterapia puede re-sensibilizar a los tumores frente a estos. Podrían tener un papel de co-adyuvante en el tratamiento de enfermedades como el HCC (45).

Uno de estos ensayos es el practicado por Lou et al. donde utilizaban miR-122 exosomal derivado de células madre mesenquimales para transferirlo a células HepG2 y Huh7. Observaron que en modelos in vitro se apreciaba una mayor sensibilidad a los tratamientos con 5-FU y sorafenib de las muestras tratadas con miR-122 respecto a las tratadas con miR-67, utilizado como control. MiR-122 regula negativamente la expresión de genes relacionados con la quimiorresistencia como la ciclina G1 (CCNG1), la desintegrina y la metaloproteína 10 (ADAM10 y el receptor del factor de

crecimiento insulínico (IGF1R). Este tratamiento combinado aumentaba la proporción de células arrestadas entre la fase G0 y G1 del ciclo celular.

Por ello, realizaron ensayos *in vivo* en ratones a los que se les administraban dosis menores a las normales de sorafenib juntamente con miR-122, además de dosis de con miR-67 y con el vehículo a modo de control. Los ratones con terapia combinada, sorafenib + miR-122, reducían considerablemente el volumen y el peso tumoral, además de que presentaban mayor expresión de genes apoptóticos como Bax y caspasa 3. Los tratados con los controles no sufrían cambios significativos (46).

Estos resultados indicaban que el aumento de la sensibilidad de las células HCC a sorafenib se debía a la administración de miR-122 y su papel en la regulación negativa de su genes diana. Sin embargo, el tratamiento únicamente con miR-122 no reducía significativamente el tamaño tumoral. Esto se debía a la posibilidad de que sin la actividad del sorafenib la administración de miRNA era insuficiente para inhibir el crecimiento (46).

Por otro lado, los microRNA pueden ser utilizados como protagonistas del tratamiento y no como adyuvantes. En 2018, en la Universidad John Hopkins realizaron unos ensayos clínicos centrados en el miR-335-5p y su papel en el cáncer de hígado. Este estudio se basaba en capacidad de las células estrelladas de transferir en exosomas a las células HCC un miRNA terapéutico. MiR-335-5p es un inhibidor de tumores que se encuentra a niveles muy bajos en esta patología tanto en las células estrelladas como en las células epiteliales del cáncer.

Los ensayos de proliferación *in vitro* demostraron que una restauración de los niveles de miR-335-5p inhibían el crecimiento en las cuatro líneas celulares tumorales (HepG2, MHCC97L, MHCC97H y Huh7) en comparación con células a las que no se les había transferido. Además, comprobaron también que la administración de miR-335-5p en fibroblastos inhibía el crecimiento y la invasión de las células tumorales vecinas.

Por ello realizaron inyecciones intratumorales, en ratones, de miR-335-5p exosomal dos veces por semana durante cuatro semanas, así como inyecciones control. Los resultados indicaban una significativa reducción de los tumores en los ratones tratados, así como unos niveles 30 veces superiores de miR-33-5p en tejidos. Además, presentaban menor valor de ki67 (indicador de la proliferación celular) y una mayor expresión de caspasa 3.

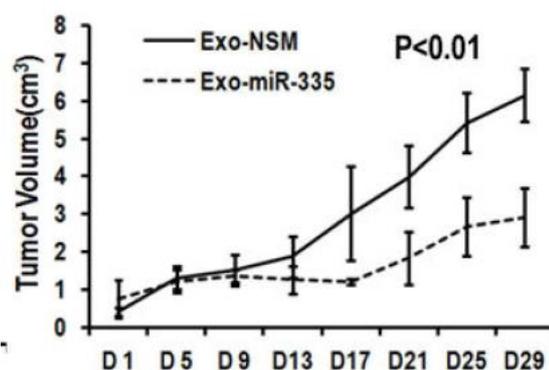


Figura 6: Relación del volumen tumoral entre ratones tratados y no tratados con miRNA (47).

Todo ello indicaba que el tratamiento *in vivo* con inyecciones intratumorales de miR podría tener aplicaciones reales en la lucha contra el cáncer de hígado (47).

El uso de miRNAs como supresores tumorales tanto en HCC como en el resto de los cánceres es un campo prometedor pero que presenta limitaciones por el momento: la forma de producción de los microRNAs, la manera de transferir el material genético, pudiendo ser en exosomas o en otro vehículo, como empaquetar el material genético de forma específica y en las cantidades adecuadas para evitar efectos adversos, como asegurarse de que las dianas lo reciben de forma adecuada y lo integran en ellas, etc. Además de que los estudios en modelos de ratones no son extrapolables a modelos humanos. Por ello son necesarios mas estudios en este campo para poder solucionar estos problemas y hacer de la terapia con microRNAs una forma real de combatir la enfermedad del cáncer.

Conclusión

Desde el descubrimiento de los miRNAs en los organismos, han emergido como reguladores del desarrollo normal de los procesos celulares. Debido a esto, cualquier perturbación puede suponer la implantación de enfermedades. Tras lo expuesto anteriormente, queda claro que están directamente relacionados con el cáncer de hígado.

Comprender los microRNA y como contribuyen al desarrollo del cáncer no solo es un ejercicio académico, sino que ofrece una oportunidad para la generación de nuevas ideas en el diagnóstico y el tratamiento. La tecnología basada en el RNA ha permitido la práctica de ensayos clínicos que eran imposibles previamente y han revelado dianas terapéuticas antes desconocidas. Sin embargo, el coste-efectividad de estas estrategias está todavía por determinar, y debe ser establecido para conocer si plantea ventajas para el tratamiento de enfermedades comparado con los métodos actualmente utilizados

Bibliografía

1. Linck-Paulus L, Hellerbrand C, Bosserhoff AK, Dietrich P. Dissimilar Appearances Are Deceptive—Common microRNAs and Therapeutic Strategies in Liver Cancer and Melanoma. *Cells*. 2 de enero de 2020;9(1):114.
2. Ding B, Lou W, Xu L, Fan W. Non-coding RNA in drug resistance of hepatocellular carcinoma. *Biosci Rep*. 31 de octubre de 2018;38(5):BSR20180915.
3. Wei L, Wang X, Lv L, Liu J, Xing H, Song Y, et al. The emerging role of microRNAs and long noncoding RNAs in drug resistance of hepatocellular carcinoma. *Mol Cancer*. diciembre de 2019;18(1):147.
4. Seal RL, Chen L, Griffiths-Jones S, Lowe TM, Mathews MB, O'Reilly D, et al. A guide to naming human non-coding RNA genes. *EMBO J* [Internet]. 16 de marzo de 2020 [citado 18 de junio de 2020];39(6). Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.15252/embj.2019103777>
5. Weiss CN, Ito K. A Macro View of MicroRNAs: The Discovery of MicroRNAs and Their Role in Hematopoiesis and Hematologic Disease. En: *International Review of Cell and Molecular Biology* [Internet]. Elsevier; 2017 [citado 18 de junio de 2020]. p. 99-175. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1937644817300485>
6. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. febrero de 2012;482(7385):347-55.
7. Bartel DP. Metazoan MicroRNAs. *Cell*. marzo de 2018;173(1):20-51.
8. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2019;20(1):21-37.
9. Rawat, Kadian, Gupta, Kumar, Chain, Kovbasnjuk, et al. MicroRNA in Pancreatic Cancer: From Biology to Therapeutic Potential. *Genes*. 25 de septiembre de 2019;10(10):752.
10. Liu N, Olson EN. MicroRNA Regulatory Networks in Cardiovascular Development. *Dev Cell*. abril de 2010;18(4):510-25.
11. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. enero de 2019;20(1):5-20.
12. Matsuyama H, Suzuki HI. Systems and Synthetic microRNA Biology: From Biogenesis to Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci*. 24 de diciembre de 2019;21(1):132.
13. Kar S. Unraveling Cell-Cycle Dynamics in Cancer. *Cell Syst*. enero de 2016;2(1):8-10.
14. Hung C-H, Chiu Y-C, Chen C-H, Hu T-H. MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma: Carcinogenesis, Progression, and Therapeutic Target. *BioMed Res Int*. 2014;2014:1-11.
15. Xiao F, zhang W, Chen L, Chen F, Xie H, Xing C, et al. MicroRNA-503 inhibits the G1/S transition by downregulating cyclin D3 and E2F3 in hepatocellular carcinoma. *J Transl Med*. 2013;11(1):195.
16. Xu T, Zhu Y, Xiong Y, Ge Y-Y, Yun J-P, Zhuang S-M. MicroRNA-195 suppresses tumorigenicity and regulates G₁/S transition of human hepatocellular carcinoma cells. *Hepatology*. julio de 2009;50(1):113-21.
17. Chen E, Xu X, Liu R, Liu T. Small but Heavy Role: MicroRNAs in Hepatocellular Carcinoma Progression. *BioMed Res Int*. 2018;2018:1-9.
18. Pistritto G, Trisciuglio D, Ceci C, Garufi A, D'Orazi G. Apoptosis as anticancer mechanism: function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging*. 27 de marzo de 2016;8(4):603-19.

19. Ge H, Zou D, Wang Y, Jiang H, Wang L. MicroRNA-377 Downregulates Bcl-xL and Increases Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Cells. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther.* 2 de enero de 2017;25(1):29-34.
20. Kim J, Yao F, Xiao Z, Sun Y, Ma L. MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer Metastasis Rev.* marzo de 2018;37(1):5-15.
21. Creighton C, Gibbons DL, Jonathan M. Kurie. The role of epithelial–mesenchymal transition programming in invasion and metastasis: a clinical perspective. *Cancer Manag Res.* julio de 2013;187.
22. Yang G, Zhang M, Zhao Y, Pan Y, Kan M, Li J, et al. HNF-4 α inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation through mir-122-adam17 pathway. Hsieh Y-H, editor. *PLOS ONE.* 25 de marzo de 2020;15(3):e0230450.
23. Wang S-C, Lin X-L, Li J, Zhang T-T, Wang H-Y, Shi J-W, et al. MicroRNA-122 Triggers Mesenchymal-Epithelial Transition and Suppresses Hepatocellular Carcinoma Cell Motility and Invasion by Targeting RhoA. Ahmad A, editor. *PLoS ONE.* 3 de julio de 2014;9(7):e101330.
24. Zhang J-P, Zeng C, Xu L, Gong J, Fang J-H, Zhuang S-M. MicroRNA-148a suppresses the epithelial–mesenchymal transition and metastasis of hepatoma cells by targeting Met/Snail signaling. *Oncogene.* julio de 2014;33(31):4069-76.
25. Sasaki R, Kanda T, Yokosuka O, Kato N, Matsuoka S, Moriyama M. Exosomes and Hepatocellular Carcinoma: From Bench to Bedside. *Int J Mol Sci.* 20 de marzo de 2019;20(6):1406.
26. Chen R, Xu X, Tao Y, Qian Z, Yu Y. Exosomes in hepatocellular carcinoma: a new horizon. *Cell Commun Signal.* diciembre de 2019;17(1):1.
27. Basu S, Bhattacharyya SN. Insulin-like growth factor-1 prevents miR-122 production in neighbouring cells to curtail its intercellular transfer to ensure proliferation of human hepatoma cells. *Nucleic Acids Res.* 17 de junio de 2014;42(11):7170-85.
28. Fang T, Lv H, Lv G, Li T, Wang C, Han Q, et al. Tumor-derived exosomal miR-1247-3p induces cancer-associated fibroblast activation to foster lung metastasis of liver cancer. *Nat Commun [Internet].* 15 de enero de 2018 [citado 17 de mayo de 2020];9. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5768693/>
29. Wang H, Lu Z, Zhao X. Tumorigenesis, diagnosis, and therapeutic potential of exosomes in liver cancer. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol.* diciembre de 2019;12(1):133.
30. Zhou Y, Ren H, Dai B, Li J, Shang L, Huang J, et al. Hepatocellular carcinoma-derived exosomal miRNA-21 contributes to tumor progression by converting hepatocyte stellate cells to cancer-associated fibroblasts. *J Exp Clin Cancer Res.* diciembre de 2018;37(1):324.
31. Takahashi K, Yan IK, Haga H, Patel T. Modulation of hypoxia-signaling pathways by extracellular linc-RoR. *J Cell Sci.* 1 de abril de 2014;127(7):1585-94.
32. Bruning U, Cerone L, Neufeld Z, Fitzpatrick SF, Cheong A, Scholz CC, et al. MicroRNA-155 Promotes Resolution of Hypoxia-Inducible Factor 1 Activity during Prolonged Hypoxia. *Mol Cell Biol.* 1 de octubre de 2011;31(19):4087-96.
33. Fang J, Zhang Z, Shang L, Luo Y, Lin Y, Yuan Y, et al. Hepatoma cell-secreted exosomal microRNA-103 increases vascular permeability and promotes metastasis by targeting junction proteins. *Hepatology.* octubre de 2018;68(4):1459-75.
34. Fu X, Liu M, Qu S, Ma J, Zhang Y, Shi T, et al. Exosomal microRNA-32-5p induces

- multidrug resistance in hepatocellular carcinoma via the PI3K/Akt pathway. *J Exp Clin Cancer Res CR* [Internet]. 12 de marzo de 2018 [citado 17 de mayo de 2020];37. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5846230/>
35. Pascual S, Miralles C, Bernabé JM, Irurzun J, Planells M. Surveillance and diagnosis of hepatocellular carcinoma: A systematic review. *World J Clin Cases*. 26 de agosto de 2019;7(16):2269-22286.
36. Shen S, Lin Y, Yuan X, Shen L, Chen J, Chen L, et al. Biomarker MicroRNAs for Diagnosis, Prognosis and Treatment of Hepatocellular Carcinoma: A Functional Survey and Comparison. *Sci Rep*. diciembre de 2016;6(1):38311.
37. Marrero JA, Kulik LM, Sirlin CB, Zhu AX, Finn RS, Abecassis MM, et al. Diagnosis, Staging, and Management of Hepatocellular Carcinoma: 2018 Practice Guidance by the American Association for the Study of Liver Diseases: Marrero et al. *Hepatology*. agosto de 2018;68(2):723-50.
38. Cozma A, Fodor A, Vulturar R, Sitar-Tăut A-V, Orășan OH, Mureșan F, et al. DNA Methylation and Micro-RNAs: The Most Recent and Relevant Biomarkers in the Early Diagnosis of Hepatocellular Carcinoma. *Medicina (Mex)*. 19 de septiembre de 2019;55(9):607.
39. Tang S, Yu S, Cheng J, Zhang Y, Huang X. The versatile roles and clinical implications of exosomal mRNAs and microRNAs in cancer. *Int J Biol Markers*. 11 de mayo de 2020;172460082092029.
40. Bautista-Sánchez D, Arriaga-Canon C, Pedroza-Torres A, De La Rosa-Velázquez IA, González-Barrios R, Contreras-Espinosa L, et al. The Promising Role of miR-21 as a Cancer Biomarker and Its Importance in RNA-Based Therapeutics. *Mol Ther - Nucleic Acids*. junio de 2020;20:409-20.
41. Qu J, Yang J, Chen M, Cui L, Wang T, Gao W, et al. MicroRNA-21 as a diagnostic marker for hepatocellular carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Pak J Med Sci* [Internet]. 16 de agosto de 2019 [citado 29 de mayo de 2020];35(5). Disponible en: <http://pjms.org.pk/index.php/pjms/article/view/685>
42. Wang S, Yang Y, Sun L, Qiao G, Song Y, Liu B. Exosomal MicroRNAs as Liquid Biopsy Biomarkers in Hepatocellular Carcinoma. *OncoTargets Ther*. marzo de 2020;Volume 13:2021-30.
43. Liu W, Hu J, Zhou K, Chen F, Wang Z, Liao B, et al. Serum exosomal miR-125b is a novel prognostic marker for hepatocellular carcinoma. *OncoTargets Ther*. agosto de 2017;Volume 10:3843-51.
44. Li S, Yao J, Xie M, Liu Y, Zheng M. Exosomal miRNAs in hepatocellular carcinoma development and clinical responses. *J Hematol OncolJ Hematol Oncol*. diciembre de 2018;11(1):54.
45. Pratama MY, Pascut D, Massi MN, Tiribelli C. The role of microRNA in the resistance to treatment of hepatocellular carcinoma. *Ann Transl Med*. octubre de 2019;7(20):577-577.
46. Lou G, Song X, Yang F, Wu S, Wang J, Chen Z, et al. Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. *J Hematol OncolJ Hematol Oncol*. diciembre de 2015;8(1):122.
47. Wang F, Li L, Piontek K, Sakaguchi M, Selaru FM. Exosome miR-335 as a novel therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma: Wang et al. *Hepatology*. marzo de 2018;67(3):940-54.