



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO

**ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE miRNAs COMO
CAUSANTES DE ENFERMEDADES HEPÁTICAS**

Autor: de los Santos Sainz, Irene

Tutor: Escribano Illanes, Óscar

Convocatoria: Junio 2019

ÍNDICE

1. RESUMEN.....	2
2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES.....	2
3. OBJETIVOS.....	5
4. METODOLOGÍA.....	5
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
5.1. Ruta biosintética de miRNAs en humanos.....	6
5.2. Papel de miRNAs en el cáncer.....	7
5.3. Biomarcadores de CHC.....	10
5.4. Papel de los miRNAs en la quimiorresistencia del cáncer hepático.....	12
6. CONCLUSIONES	14
7. BIBLIOGRAFÍA	15

1. RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) maduros son pequeñas moléculas de RNA no codificante, de diecinueve a veinticinco nucleótidos de longitud. La función principal de los miRNAs es regular negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional. Algunos de los mecanismos a través de los cuales los miRNAs regulan la expresión génica son la represión traduccional, la escisión del mRNA y la desadenilación.

Esta revisión bibliográfica se centra en el carcinoma hepatocelular causado por alteración en la expresión de miRNAs. A causa de que el cáncer se debe, en parte, a la falta de herramientas para una detección precoz, es necesario el estudio tanto de los componentes de las rutas biosintéticas de los miRNAs y su desregulación, como de las vías de señalización implicadas en la alteración de la expresión de miRNAs. Dicho estudio podría dar lugar al establecimiento de nuevos biomarcadores con fines terapéuticos.

En esta revisión se muestra el papel de los miRNAs en cáncer, los miRNAs utilizados actualmente como biomarcadores del carcinoma hepatocelular y el papel de los miRNAs en la quimiorresistencia del cáncer hepático.

2. INTRODUCCIÓN Y ANTECEDENTES

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA evolutivamente conservadas de diecinueve a veinticinco nucleótidos que se expresan en el núcleo celular de eucariotas, tanto en regiones intragénicas como intergénicas ⁽¹⁾. Principalmente funcionan al unirse a secuencias diana complementarias en el RNA mensajero (mRNA) e interferir con la maquinaria de traducción, evitando o alterando la creación del producto proteico. La función principal de los miRNAs es regular negativamente la expresión génica. Los estudios de seguimiento también revelaron que, además de reprimir la traducción, la unión de miRNA a su mRNA diana también desencadenó el reclutamiento y asociación de los factores de desintegración del mRNA, lo que condujo a la desestabilización del mRNA, la degradación y la disminución resultante en los niveles de expresión.

Su descubrimiento se remonta a 1987, Ferguson et al., trabajando en el laboratorio de Robert Horvitz, descubrieron que una mutación supresora en el gen lin-14 era capaz de revertir el fenotipo de la mutación nula-lin-4 en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* ⁽²⁾. De hecho, mutaciones nulas en el gen lin-14 causaban un fenotipo exactamente opuesto de las mutaciones nulas-lin-4. Este interesante fenotipo opuesto entre defectos en los genes lin-4 y lin-14 indicaba que lin-4 podría regular negativamente a lin-14 ⁽³⁾. En 1989 Ambros y Ruvkun, clonaron el gen lin-14 y desde este momento, los dos colegas siguieron dos carreras de investigación independientes, centrándose Ambros en el gen lin-4 y Ruvkun en el gen lin-14. En junio de 1992, Ambros y Ruvnkun llegaron independientemente a la misma conclusión: los pequeños transcritos de lin-4 eran complementarios a una secuencia repetida en el 3'-UTR (UnTranslated Region: región no traducida) del gen lin-14.

En diciembre de 1993, Ambros y Ruvkun publicaron que el pequeño transcrito no codificante de proteínas lin-4 regulaba lin-14 a través de su región 3 UTR. Fue en este momento cuando acababan de descubrirse los miRNAs ^(4,5).

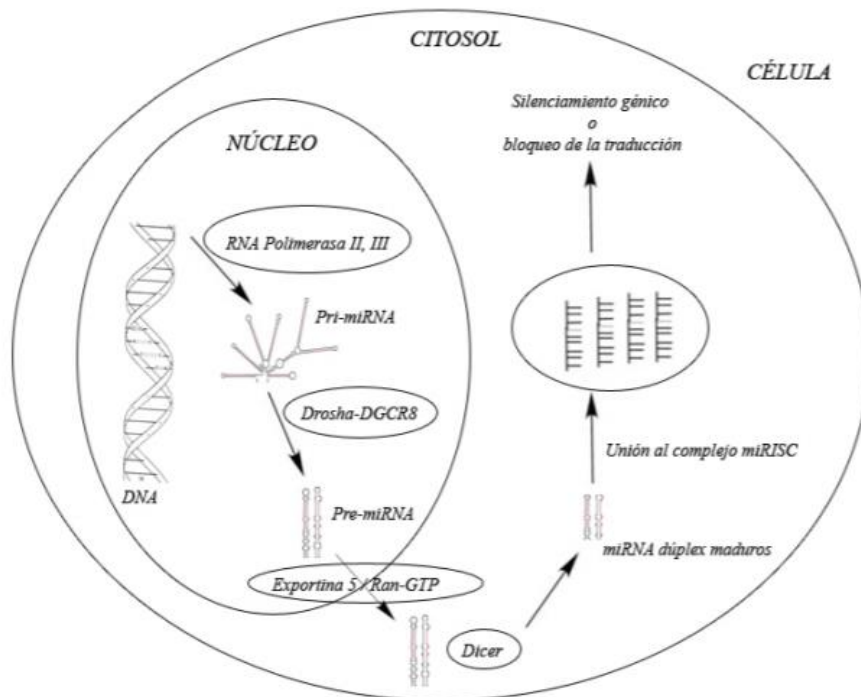


Figura 1. Biogénesis de los miRNAs: Existen evidencias de que los miRNAs son sintetizados por la RNA polimerasa II, aunque hay que considerar la posibilidad de que algunos sean transcritos por la RNA polimerasa III. Inicialmente se sintetizan como un fragmento de RNA policistrónico (Pri-miRNA), que es escindido por Drosha dando varios fragmentos de una sola hebra (Pre-miRNA). Posteriormente los pre-miRNA se exportan al citosol vía Exportina 5/Ran-GTP, donde son cortados por Dicer, dando duplex maduros de miRNA. Posteriormente son integrados por separado en el complejo de silenciamiento miRISC, y dependiendo de la complementariedad con los mRNA mensajeros darán lugar a silenciamiento génico por degradación del mensajero, o bien bloqueo de la traducción en los ribosomas ⁽¹⁾.

La función principal de los miRNAs es regular negativamente la expresión génica de diferentes maneras, entre las que se incluyen la represión traduccional, la escisión del mRNA y la desadenilación:

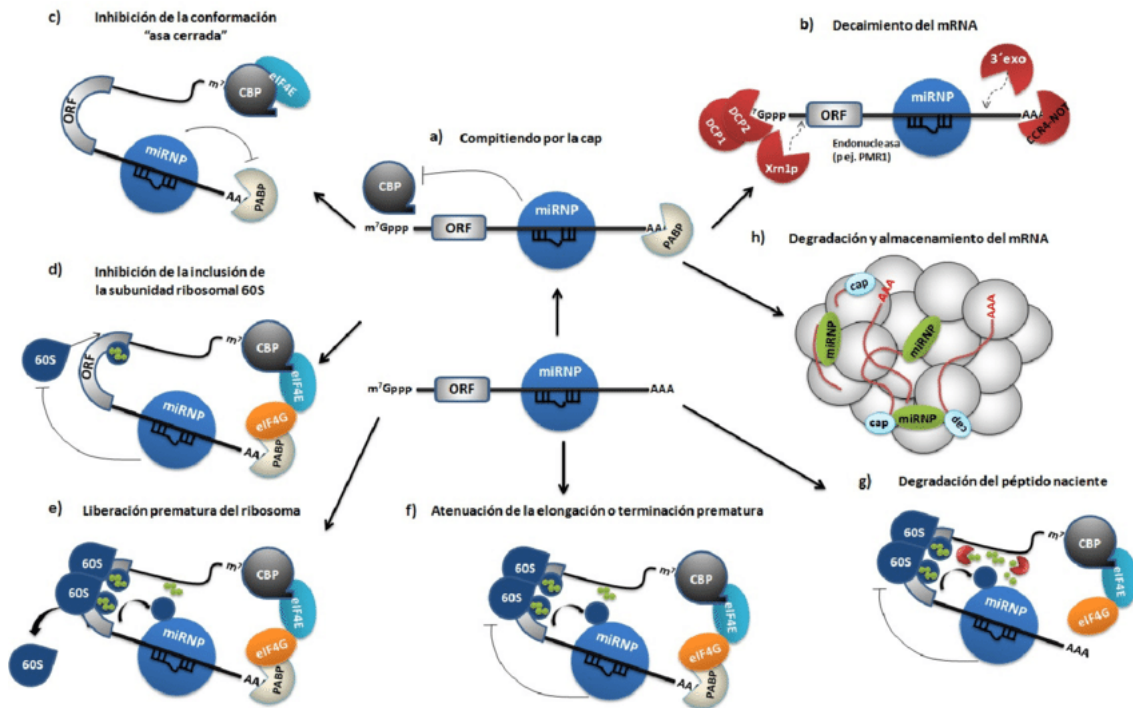


Figura 2. Los miRNAs inhiben la traducción por innumerables mecanismos. La inhibición de la expresión génica, por miRNAs, está dada por la inhibición de la traducción y/o la desestabilización de los mRNAs blanco ⁽⁶⁾.

A medida que evolucionó el estudio acerca de los miRNAs y sus funciones, también lo hizo el interés de su utilización con fines terapéuticos en enfermedades humanas, particularmente en enfermedades hepáticas ya que con algunas de éstas tiene importante relación.

Esta revisión bibliográfica se centra por una lado en el carcinoma hepatocelular (CHC) causado por la alteración en la expresión de miRNAs, y por otro lado, en el papel de los miRNAs en la quimiorresistencia del cáncer hepático enfocándose en el estudio de las vías de señalización implicadas en la eficacia antitumoral del sorafenib.

El cáncer se produce por una proliferación celular descontrolada y autónoma que destruye los tejidos, siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Esto se debe, en parte, a la falta de herramientas para una detección precoz. Determinar con precisión etapas tempranas de un tumor podría ayudar a reducir la alta mortalidad que esta enfermedad produce. En los últimos años, una gran cantidad de trabajos han estudiado el papel de los miRNAs en enfermedades humanas, y casi la mitad se centran en el área del cáncer:

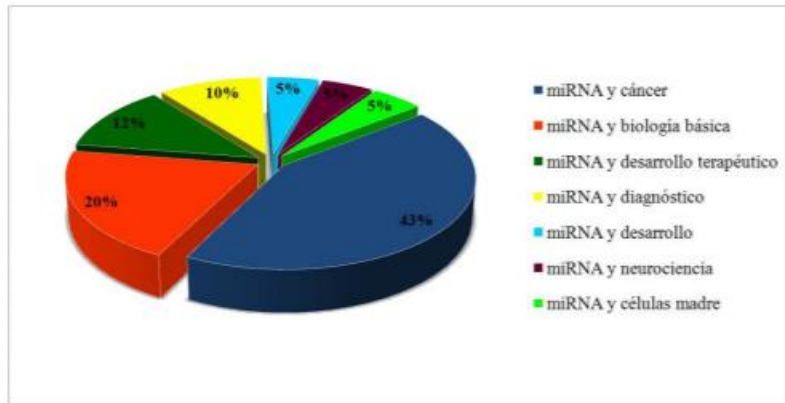


Figura 3. Estudios de miRNAs realizados, por áreas de conocimiento, desde su descubrimiento hasta la actualidad (adaptado de Trends in the microRNA Marketplace, 2008) ⁽⁷⁾.

En el contexto del cáncer, algunos miRNAs pueden actuar como oncogenes y/o como supresores de tumores. Se ha observado que la expresión aberrante de un gran número de miRNAs puede contribuir al desarrollo de cáncer. ⁽⁷⁾.

Se estima que los miRNAs regulan aproximadamente el 30% del genoma humano encargado de codificar proteínas, controlando de esta manera la expresión de genes implicados en multitud de procesos biológicos entre los que encontramos aquellos relacionados con el cáncer, como son la apoptosis, la proliferación, la diferenciación celular e incluso la metástasis ⁽⁴⁾.

La identificación de las alteraciones en estos procesos y los perfiles de expresión de miRNAs proporcionan una gran cantidad de información que cada vez cobra más importancia como herramienta diagnóstica y podría dar lugar al establecimiento de nuevos biomarcadores.

3. OBJETIVOS

Realizar una revisión bibliográfica tanto de los procesos involucrados en la biosíntesis de miRNAs como del papel de los miRNAs en el cáncer, centrándose en parte, en el papel de los miRNAs en la quimiorresistencia del cáncer hepático.

4. METODOLOGÍA

Para poder llevar a cabo este trabajo, se ha realizado una revisión bibliográfica de varios artículos de investigación actuales obtenidos en Google Académico, y sobre todo, en la base de datos MEDLINE a la cual se accede a través de PubMed. También se han revisado algunas revistas como la Revista de Educación Bioquímica (REB) y la revista de la Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud.

Entre las palabras clave utilizadas se encuentran: miRNA, oncomir, oncogénesis, biomarcador, sorafenib.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. Ruta biosintética de miRNAs en humanos

La vía canónica de biosíntesis de los miRNAs incluye varias etapas. Inicialmente, los miRNAs son transcritos por la RNA polimerasa II para generar moléculas precursoras o pri-miRNAs.

Estos transcritos primarios se autocomplementan formando estructuras en forma de tallo y bucle de aproximadamente 80 nanómetros de longitud. Posteriormente, estos pri-miRNAs son procesados en el núcleo por el complejo proteico denominado “microprocesador” para generar un precursor más pequeño conocido como pre-miRNA. Este complejo está formado por la enzima RNasa III, Drosha y de la proteína de unión a RNA de doble cadena, denominada DGCR8 en humanos. La proteína DGCR8 juega un papel importante en el reconocimiento de los sitios de corte de Drosha en el tallo de la estructura del pri-miRNA, dando origen al pre-miRNA.

Después de la etapa de procesamiento en el núcleo, los pre-miRNAs son reconocidos por el factor nuclear de exportación Exportina-5 el que junto con la proteína de unión a GTP Ran forman un complejo de transporte nuclear que conduce a los pre-miRNA a través de los poros del núcleo al citoplasma; ahí serán reconocidos y procesados por la enzima RNasa III Dicer. Esta enzima corta el tallo y bucle del pre-miRNA para generar un RNA dúplex formado por una cadena de miRNA maduro y una cadena de miRNA complementaria (miRNA/miRNA*) de alrededor de veintidós nanómetros de longitud:

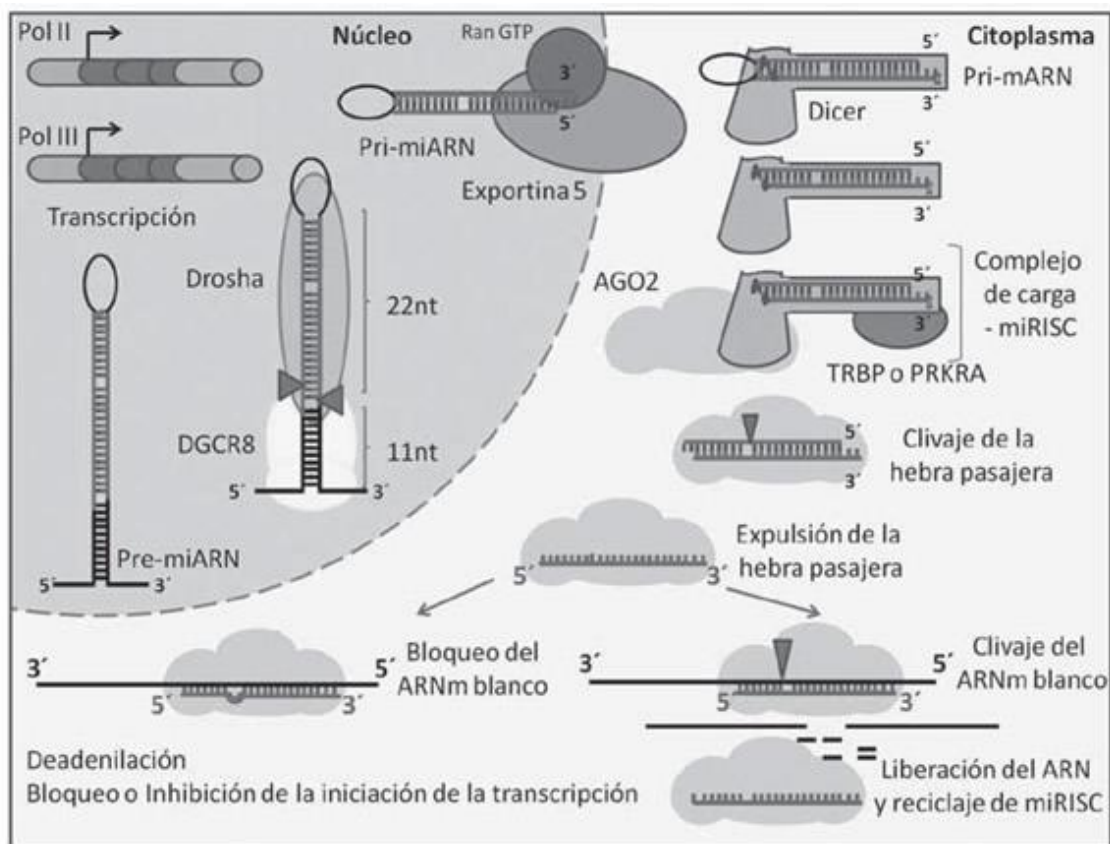


Figura 4. Vía canónica de generación de miRNAs⁽⁸⁾.

5.2. Papel de miRNAs en cáncer

Los miRNA pueden actuar como oncogenes (oncomiR) o supresores tumorales y están implicados en la pérdida de la regulación de una gran variedad de vías de señalización en el cáncer.

En 2005, Cimmino et al. demostraron que miR-15 y miR-16, los primeros dos miRNAs asociados con el cáncer, desempeñan un papel en la regulación de la apoptosis degradando al mRNA del gen anti-apoptótico BCL2⁽⁹⁾.

Desde 2005 hasta el presente, cientos de publicaciones científicas han ido estableciendo el papel de los miRNAs en tumores, así como la regulación de miRNAs por otros factores de transcripción como p53, el guardián del genoma.

En 2010, Medina et al. publicaron resultados obtenidos en ratones que sobreexpresaban miR-21 (sin otro tipo de predisposición genética), demostrando claramente que la sobreexpresión de un solo miRNA, específicamente miR-21, era suficiente para producir el desarrollo tumoral. Además, estos autores demostraron que el volumen tumoral y la supervivencia se correlacionaban con el nivel de la sobreexpresión de miR-21 mientras que los tumores regresaban cuando miR-21 se inactivaba, demostrando por primera vez una relación directa entre miRNA oncogénicos y la proliferación de células tumorales.

En el proceso metastásico, los miRNA tienen un doble papel, como promotores o inhibidores de la metástasis. El primer hallazgo sobre miRNAs que funcionan como activadores de metástasis fue descrito por Ma et al. El miR-10b regula positivamente la migración celular y la invasión in vitro y es capaz de iniciar la invasión tumoral y la metástasis in vivo. MiR-10b actúa directamente sobre HOXD10, que es un represor transcripcional de RHOC (Ras homolog gene family, member C), una pequeña proteína G clave en metástasis.

Por el contrario, otros miRNAs pueden prevenir la metástasis tumoral. Estos miRNA tienen mecanismos distintos para la supresión de metástasis: La restauración de la expresión de miR-126 suprimía significativamente el crecimiento tumoral.

Por lo tanto, no fue sorprendente que Lujambio et al. descubrieran en 2008 que la metilación del ADN asociada al silenciamiento de miRNAs supresores de tumor contribuía al desarrollo de las metástasis y que la reintroducción de miR-148a y miR34b/c en células cancerosas con inactivación epigenética inhibía su motilidad, reducía el crecimiento tumoral e inhibía la formación de metástasis en modelos de ratones xenotransplantados, con una regulación negativa por parte de los miRNA de algunos genes oncogénicos como C-MYC, E2F3, CDK6 y TGIF2^(4,5).

Centrándonos en el papel de los miRNAs en carcinoma hepatocelular (CHC), miR-122 es el miRNA más abundante en el hígado, constituyendo el 70% del total de los miRNAs hepáticos^(10,11). El miR-122 no solo es crucial para el desarrollo y la función hepática normal, incluido el metabolismo de los ácidos grasos y el colesterol, sino que también desempeña un papel fundamental en diversas enfermedades hepáticas. Además, se ha informado que este miRNA específico para el hígado está drásticamente regulado a la baja en la mayoría de los CHC⁽¹²⁻¹⁴⁾.

AKT es una proteína reguladora clave en muchos cánceres. La expresión de miR-122 se reduce considerablemente en las líneas celulares de CHC en comparación con la del hígado normal. Al mismo tiempo, el nivel de expresión de AKT3 está regulado al alza en las tres líneas celulares CHC (Hep3B2, SNU-182 y SNU-475) con poca o ninguna expresión de miR-122. Estos resultados indican que el nivel de miR-122 está correlacionado inversamente con los niveles de mRNA y proteína de AKT3 en las líneas celulares CHC. Es decir, miR-122 regula negativamente la traducción de AKT3 en líneas celulares de CHC ⁽¹⁵⁾.

Las quinasas AKT regulan diversos procesos celulares que incluyen la proliferación y supervivencia celular, el tamaño celular y la respuesta a la disponibilidad de nutrientes, así como la invasión tisular y la angiogénesis en células tanto normales como tumorales. Dado que AKT3 se expresa altamente en células SNU-182 y SNU-475, es probable que AKT3 juegue un papel esencial en la oncogénesis de estas líneas celulares. Por lo tanto, a continuación se investiga si la inhibición de AKT3 restaurando la expresión de miR-122 tendría efectos antitumorales.

La inhibición inducida por miR-122 en la migración celular se debe a la disminución del nivel de AKT3 en las células. La sobreexpresión de miR-122 en células SNU-182 regula a la baja el AKT3, que a su vez inhibe la migración celular inducida por HGF en estas células. MiR-122 regula negativamente la traducción de AKT3 en líneas celulares de CHC.

La expresión de AKT3 está correlacionada inversamente con los niveles de miR-122 en líneas celulares de CHC. La sobreexpresión de miR-122 en un subconjunto de líneas de células CHC disminuye los niveles de mRNA y proteína de AKT3 debido a que miR-122 se une directa y específicamente a la 3' UTR de AKT3, que posteriormente conduce a la inhibición de la proliferación y migración celular. Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-122 inhibe el crecimiento del tumor.

De esta manera se confirma que miR-122 es un supresor de tumor en el CHC al dirigir la expresión de AKT3 para modular la transformación de las células CHC, y que la sobreexpresión de miR-122 o la regulación negativa de AKT3 pueden resultar beneficiosas como potenciales terapéuticos para los pacientes con CHC.

En cuanto a los efectos de la sobreexpresión de miR-122 en la apoptosis / proliferación, se comprobó que la restauración de miR-122 en líneas celulares de CHC media la fosforilación y la regulación positiva del gen BAD para promover la apoptosis en células SNU-182 pero no en células que expresan endógenamente miR-122 (como las células Huh-7). La disminución de pBAD (promotor del gen BAD) y el aumento de la caspasa 3 escindida en miR-122 que sobreexpresan las células SNU-182 se debe a la disminución de AKT3 ^(10,16).

Por lo tanto, la sobreexpresión de miR-122 en células SNU-182 disminuye la migración celular y aumenta la apoptosis a través de su regulación directa de la traducción de AKT3.

En resumen en cuanto al papel de miR-122 en CHC, se concluye que funciona como un supresor de tumores en las líneas celulares humanas de CHC. Es importante destacar que la recuperación de la expresión de miR-122 suprime la migración de las células CHC y el crecimiento tumoral in vivo e induce la apoptosis por su regulación directa y específica de AKT3. MiR-122 se dirige directamente a AKT3 para regular las transformaciones celulares y la oncogénesis en líneas celulares de CHC humanas. La regulación de la expresión de AKT3 en miR-122 es necesaria y suficiente para modular la oncogénesis y la transformación celular en líneas celulares de CHC humanas ⁽¹⁰⁾.

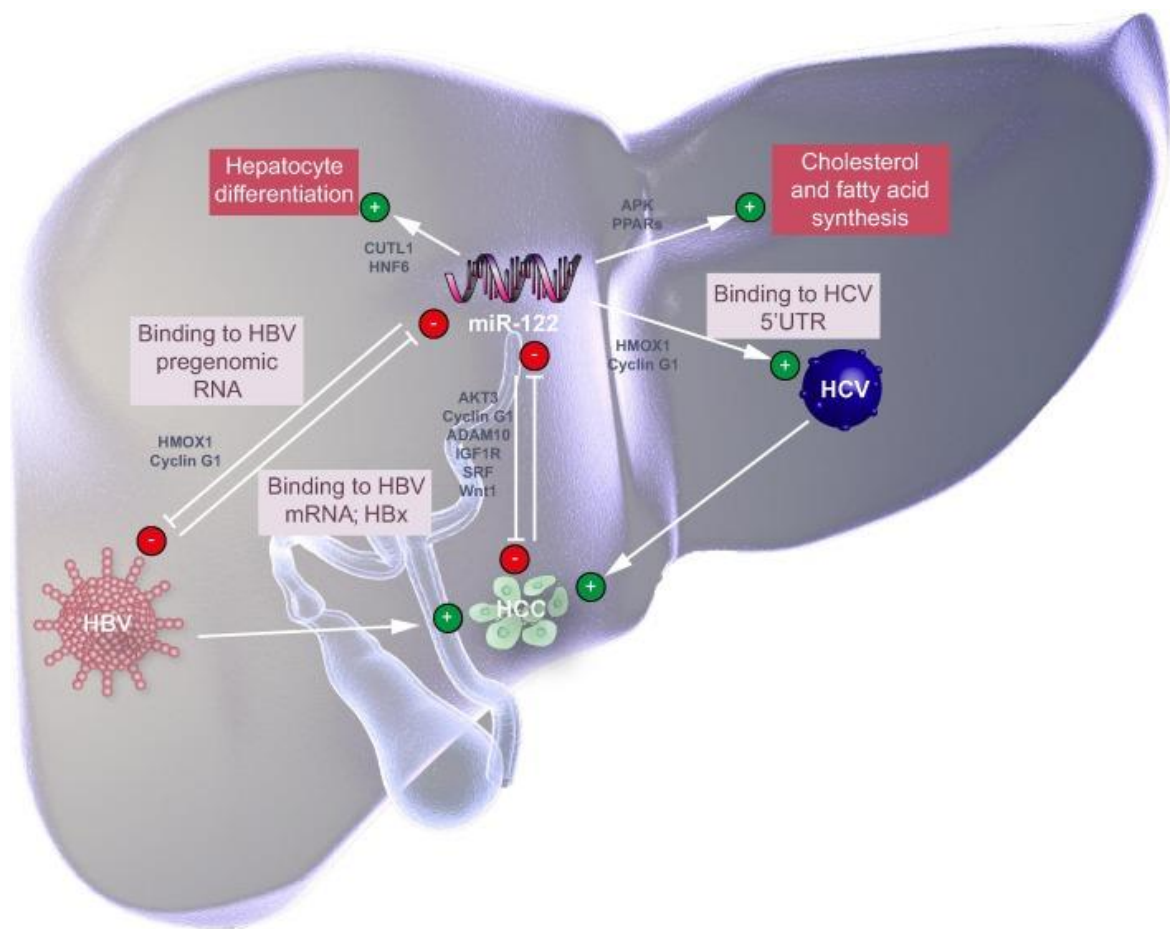


Figura 5. Esquema de actuación de miRNA-122.

5.3. Biomarcadores de CHC

Los miRNAs circulantes también se han descrito en el carcinoma hepatocelular (CHC). Este tipo de cáncer representa el 80 – 90% de cánceres malignos primarios y supone la quinta enfermedad neoplásica de mayor incidencia y la tercera causa de muerte por cáncer. A pesar de conocer los principales factores de riesgo como hepatitis B o C, consumo abusivo de alcohol o la esteatosis, la supervivencia global de los pacientes (alrededor de 6 meses) no se ha conseguido mejorar sustancialmente en las últimas dos décadas. La principal razón es el avanzado estado de la patología en el momento del diagnóstico, lo que pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección precoz en la población de riesgo y de desarrollar métodos terapéuticos innovadores ⁽¹⁷⁾.

Con el fin de desarrollar biomarcadores no invasivos para CHC, Li y colaboradores ⁽¹⁸⁾ investigaron la expresión de miRNAs en el suero de 135 pacientes con infección por virus de la hepatitis B (VHB), 48 sujetos con infección por virus de la hepatitis C (VHC), 120 pacientes con CHC y 210 controles sanos. Los hallazgos sugirieron que los miRNAs: mir-25, mir-375, let-7f podrían separar claramente los casos de HCC de los controles sanos.

Es decir, los miRNAs circulantes podrían servir como novedosos biomarcadores en la detección de precoz de HCC ⁽⁷⁾.

MiR-1246 como biomarcador:

El miR-1246 se considera un oncomiR en varios tipos de cáncer. Sin embargo, el origen y la biogénesis de miR-1246 siguen siendo controvertidos, lo que a menudo conduce a una mala interpretación de su detección y función biológica, e inevitablemente enmascara sus mecanismos de acción.

miR-1246 está altamente enriquecido en exosomas derivados de células cancerosas humanas y que se origina a partir de RNU2-1, un pequeño ARN nuclear y componente esencial del complejo U2 del spliceosome ⁽¹⁹⁾.

El miR-1246 exosomal se deriva de la degradación de RNU2-1 a través de un proceso de biogénesis de miRNA no canónico. Estos hallazgos revelan el origen de un oncomiR en células cancerosas humanas, brindando orientación para comprender la detección de miR-1246 y la función biológica ⁽²⁰⁾.

MiR-1246 regula la ruta de Wnt / β -catenina. La señalización de Wnt / β -catenina se activa en las células madre del cáncer de hígado CD133 (CSC), un subconjunto de células que se sabe que son la raíz de la recurrencia del tumor y la resistencia a la terapia en el CHC.

El miR-1246 promueve la enfermedad del cáncer, incluida la autorrenovación, la resistencia al fármaco, la tumorigenicidad y la metástasis, mediante la activación de la vía Wnt / β -catenina a través de la supresión de la expresión de AXIN2 y glucógeno sintasa quinasa 3 β (GSK3 β), dos miembros clave del complejo de destrucción de β -catenina. Clínicamente, se han identificado altos niveles de miR-1246 endógeno y circulante en muestras clínicas de CHC y se han correlacionado con un peor pronóstico.

Estos hallazgos descubren la regulación no canónica de Wnt / β -catenina en CSC de hígado mediante el eje de señalización Oct4 / miR-1246, y también proporcionan un nuevo marcador de diagnóstico así como una intervención terapéutica para el CHC ⁽²¹⁻²³⁾.

Para determinar cómo se expresó diferencialmente miR-1246 en enfermedades hepáticas, se midieron los niveles séricos de este miRNA en un total de 209 pacientes, incluyendo nefropatía crónica (n = 15), cirrosis hepática (n = 48) y pacientes con CHC (n = 121) por qPCR.⁽²⁴⁾ Los resultados mostraron que los niveles relativos de expresión de miR-1246 fueron claramente reguladas al alza en pacientes con CHC.

A continuación, para evaluar si los niveles de expresión en suero de miR-1246 podrían usarse para monitorizar la dinámica del tumor, se compararon los niveles relativos de expresión de miR-1246 entre muestras pre- y postoperatorias obtenidas de pacientes con CHC. En los casos de recurrencia tumoral temprana (ETR), los niveles de expresión de miR-1246 fueron significativamente más bajos en las muestras postoperatorias que en las preoperatorias. Estos resultados indican que en el suero, los niveles de miR-1246 reflejan con precisión el estado de CHC y podrían usarse para rastrear la dinámica del tumor en pacientes con CHC.

El presente estudio utilizó un perfil de microarrays de miRNA e identificó 15 miRNAs cuya expresión fue marcadamente aumentada en el suero de pacientes con CHC con recurrencia tumoral temprana en comparación con los pacientes con CHC sin recurrencia. Entre estos, miR-1246 fue marcadamente elevado.

En cuanto a la expresión de miR-1246, se encontró que promueve la invasividad y la rigidez, y es alta en metástasis. Además a estos hallazgos, otros resultados para exosomas derivados del cáncer refuerzan el argumento de que miR-1246 está involucrado en la progresión tumoral y metástasis, y se ha propuesto servir como biomarcador para ciertas neoplasias malignas⁽²⁵⁻²⁷⁾. Además, se ha demostrado que niveles altos de miR-1246 en plasma sirve como predictor de recurrencia de CHC después del trasplante de hígado.

Muy recientemente, en el ensayo miR avanzado de TaqMan se han producido mejoras de sensibilidad con el objetivo de analizar miRNA de baja abundancia en muestras como plasma o suero⁽²⁸⁾. En particular, el ensayo TaqMan miR-1246 convencional se ha reemplazado por el ensayo TaqMan avanzado miR-1246 (Thermo Fisher Scientific).

Se ha demostrado una correlación significativa entre la expresión de miR-1246 y recurrencia tumoral temprana (ETR) de CHC, y la capacidad del suero miR-1246 para discriminar entre los casos de CHC con y sin ETR. Además, como ya se ha explicado anteriormente, también se ha demostrado que la expresión de miR-1246 está asociada con la progresión tumoral y mal pronóstico en pacientes con CHC. Estos resultados indican que el suero miR-1246 medido por el ensayo TaqMan avanzado de miR puede usarse para predecir el pronóstico y ETR de CHC⁽²⁹⁾.

Publicaciones recientes han demostrado que los miRNAs miR-24, miR-665, miR-150 y miR-296, que estaban aumentados en suero de individuos con CHC, ofrecen una buena eficacia diagnóstica para el CHC.^(18,30-32)

En conclusión, se muestra el valor de las concentraciones séricas del miR-1246 para predecir la ETR y el pronóstico del CHC, y el miR-1246 parece utilizable como biomarcador en las evaluaciones del riesgo posoperatorio para la ETR del CHC.

5.4. Papel de los miRNAs en la quimiorresistencia del cáncer hepático

En el hígado tienen lugar el 85% de las reacciones de transmetilación y el 50% de las reacciones metabólicas de la metionina. El enzima GNMT (glicina-N-metil-transferasa) se expresa en páncreas, próstata y preferentemente en el hígado adulto y se ha visto que su expresión se ve reducida en pacientes con carcinoma hepatocelular ⁽³⁵⁾ provocando la acumulación de SAmE que a su vez causa metilaciones aberrantes que promueven el desarrollo de CHC ⁽²⁴⁾.

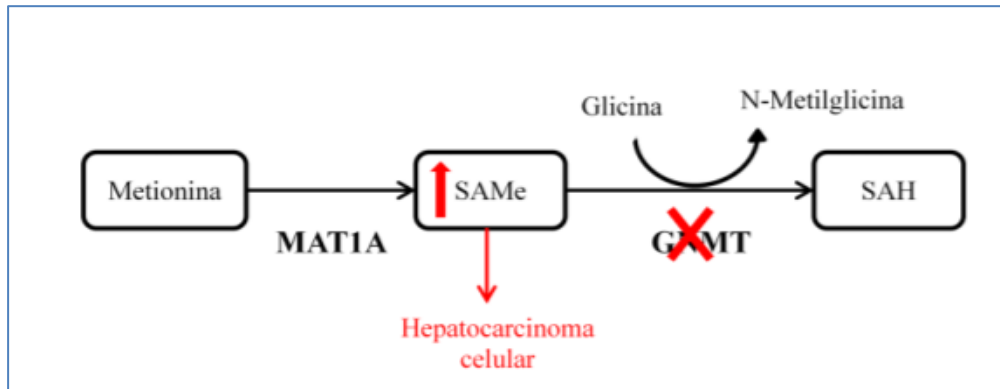


Figura 6. Esquema de la reducida expresión de la enzima GNMT en pacientes con CHC que muestra la correspondiente acumulación de SAmE responsable del desarrollo de CHC.

GNMT es un enzima muy abundante en el hígado de mamíferos, cuya función principal está relacionada con la regulación epigenética, mediante el mantenimiento del ratio SAmE/SAH. Tal y como se indica anteriormente, los niveles de expresión de GNMT se ven drásticamente disminuidos en pacientes con carcinoma hepatocelular ⁽³³⁾, y este hecho ha llevado a cabo que GNMT se considere un supresor de tumores en el desarrollo del cáncer hepático.

Se ha observado que la hipermetilación del promotor de GNMT es una de las causas de la reducción de la expresión de GNMT en algunos pacientes con CHC, pero parece que este no es el único mecanismo responsable de su regulación ⁽³⁴⁾. Los miRNAs en el hígado se han identificado con el desarrollo de hígado graso no alcohólico, cirrosis y cáncer hepático ^(35,36) y su desregulación parece conferir cierta quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer. De esta manera, la corrección de sus niveles puede sensibilizar dichas células a determinadas terapias, posicionando a los miRNAs como excelentes dianas para nuevas aproximaciones terapéuticas ⁽³⁷⁾.

Se han observado niveles de miR-518d-5p más inducidos en tejido hepático tumoral, en comparación con la región no tumoral hepática de pacientes con CHC. De forma adicional, se ha relacionado un peor pronóstico en el desarrollo de la enfermedad (supervivencia menor de 3 meses) con unos niveles incrementados del miR-518d-5p y disminuidos de GNMT. Estos resultados, han permitido validar que los niveles del GNMT/miR-518d-5p están negativamente relacionados y se ven regulados de forma diferencial en pacientes con carcinoma hepatocelular.

Una alternativa terapéutica es el sorafenib. La acción del sorafenib se centra en la reducción de la angiogénesis mediante su efecto sobre los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento derivador de plaquetas (PDGF). Este inhibidor de la cinasa ATP-competitiva se dirige al BRAF, CRAF, MAP quinasas, VEGFR y PDGFR resultando en apoptosis de células tumorales e inhibición de la angiogénesis ⁽³⁸⁾. Además de ser un potente inhibidor multiquinasa, es capaz de inhibir la actividad de proteínas como Raf quinasa, o la quinasa BCR/ABL.

Se ha observado que el sorafenib induce la muerte celular, vía estimulación de caspasas, activación de BAX y BAK, aumento en los niveles proapoptóticos de PUMA y BIM y descenso en los niveles antiapoptóticos de MCL1 y survivina ⁽³⁹⁾.

Aunque el tratamiento con sorafenib es prometedor y ha aumentado la supervivencia de los pacientes con CHC, algunos de ellos acaban desarrollando resistencia al tratamiento.

Tal y como se ha indicado anteriormente, el sorafenib es un inhibidor multiquinasa capaz de inhibir Raf quinasa, inhibiendo por tanto la ruta de señalización RAF/MEK/ERK implicada en la proliferación celular. Las células transfectadas con anti-miR-518d-5p, mostraban menores niveles de fosforilación de ERK en comparación con las células cuyos niveles de miR-518d5p eran superiores. Por tanto, las células con anti-miR-518d-5p eran más sensibles a la inhibición de Raf quinasa llevada a cabo por el sorafenib, inhibiendo así la proliferación celular ⁽⁴⁰⁾.

La modulación de la expresión del miR-518d-5p en células tumorales BCLC3 y Huh7, permitió observar que niveles superiores de miR-518d-5p otorgaban a las células una mayor viabilidad y una reducción de muerte celular, es decir, el miR-518d-5p generaba que las células fueran más resistentes a la apoptosis. Dicha variación en la sensibilidad de las células a la apoptosis, situó al miR-518d-5p como posible diana responsable de la quimiorresistencia desarrollada a algunos fármacos.

Ante la exposición a sorafenib, PUMA (modulador de apoptosis regulado por p53) actúa como un iniciador clave de la apoptosis en células tumorales ⁽⁴¹⁾. Por tanto, se compararon los niveles de PUMA, a nivel de mRNA y a nivel proteico, y los resultados mostraron que PUMA, al igual que p-53 y c-Jun, se ve inducido en las células tumorales BCLC3 transfectadas con anti-miR-518d-5p.

Aunque la expresión de PUMA está regulada directamente por p53, estudios previos habían detallado que su expresión también podía estar controlada por c-Jun ⁽⁴²⁾. De esta manera, el drástico aumento de c-Jun al bloquear miR-518d-5p, permitió plantear la hipótesis de una importante implicación de c-Jun en la apoptosis (inducida por sorafenib) mediada por el miRNA.

Con el objetivo de comprobar el papel que desempeñaba c-Jun en la resistencia al sorafenib mediada por el miR-518d-5p, se observó el efecto obtenido al silenciar el gen. La inhibición del miR-518d-5p, aumentaba significativamente la expresión de c-Jun, y la activación de la transcripción de PUMA, principal efector de la apoptosis en respuesta al sorafenib. Sin embargo, si se silenciaba c-Jun en dichas células, imitando el bloqueo llevado a cabo por el miRNA, se bloqueaba la respuesta apoptótica iniciada por sorafenib.

Estos resultados indican que los niveles de c-Jun se regulan por la presencia del miR-518d-5p, limitando con ello la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por sorafenib. Además, apoyan la hipótesis de que c-Jun actúa como mecanismo alternativo de regulación sobre PUMA.

En definitiva, el miR-518d-5p además de regular GNMT, tiene como diana la proteína c-Jun siendo capaz de modular su expresión. De esta manera, la respuesta apoptótica favorecida por niveles disminuidos del miR-518d-5p, se debe a la regulación negativa que ejerce sobre c-Jun. La corrección de los niveles del miR-518d-5p, incrementados en tejido tumoral y en pacientes con peor pronóstico de CHC, puede sensibilizar a las células tumorales a la quimioterapia con sorafenib. Todo esto posiciona al miR-518d-5p como excelente diana prometedora para nuevas aproximaciones terapéuticas⁽²⁴⁾.

6. CONCLUSIONES

La acción de los miRNAs conduce a la degradación y la disminución resultante en los niveles de expresión de mRNA evitando o alterando la creación del producto proteico.

El miR-122 es el más abundante en el hígado, constituyendo el 70% del total de los miRNAs hepáticos. Este miRNA específico para el hígado está drásticamente regulado a la baja en la mayoría de los CHC y regula negativamente la traducción de AKT3 en líneas celulares de CHC, de manera que miR-122 es un supresor de tumor en el CHC. Es importante destacar que la recuperación de la expresión de miR-122 suprime la migración de las células CHC y el crecimiento tumoral e induce la apoptosis por su regulación directa y específica de AKT3.

En cuanto al miR-1246, se considera un oncomiR en varios tipos de cáncer. La expresión de miR-1246 está asociada con la progresión tumoral y mal pronóstico en pacientes con CHC. En definitiva, los niveles séricos de miR-1246 reflejan con precisión el estado de CHC y sirven para discriminar entre los casos de CHC con y sin recurrencia tumoral temprana.

El sorafenib es un inhibidor de la cinasa ATP-competitiva, resultando en apoptosis de células tumorales e inhibición de la angiogénesis. El problema del sorafenib es que algunos pacientes con CHC acaban desarrollando resistencia al tratamiento. Una posible diana responsable de esta quimiorresistencia es el miR-518d-5p.

La respuesta apoptótica se ve favorecida por niveles disminuidos del miR-518d-5p. El miR-518d-5p se considera una buena diana terapéutica debido a que la técnica consistente en disminuir los niveles de dicho miRNA conlleva una mejor sensibilización de las células tumorales a la quimioterapia con sorafenib.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Luengo Gil G. MICRORNAS: NUEVOS MARCADORES DE INTERÉS EN ONCOLOGÍA. [citado 11 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.um.es/eubacteria/microRNA.pdf>
2. Horvitz HR, Sulston JE. ISOLATION AND GENETIC CHARACTERIZATION OF CELL-LINEAGE MUTANTS OF THE NEMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS A N D. [citado 12 de mayo de 2019]. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1214309/pdf/435.pdf>
3. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of C. elegans. Cell. abril de 1981 [citado 12 de mayo de 2019];24(1):59-69. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7237544>
4. Carrillo MG. The role of miRNAs in cancer. [citado 17 de marzo de 2019]. Disponible en: <https://repositorio.unican.es/xmlui/bitstream/handle/10902/14599/GomezCarrilloM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
5. Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: Discovery, recent applications, and next frontiers. Mutat Res Mol Mech Mutagen. 1 de diciembre de 2011 [citado 19 de abril de 2019];717(1-2):1-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21458467>
6. Ruiz R, Garrido E, Ángel Velázquez-Flores M. NUEVOS E INESPERADOS MECANISMOS DE BIOGÉNESIS Y ACCIÓN DE LOS microRNAs*. Vol. 35, Revista de Educación Bioquímica (REB). 2016 [citado 8 de marzo de 2019]. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/revedubio/reb-2016/reb163b.pdf>
7. Arroyo-Rodríguez AB, Salloum-Asfar S. MICRORNAS CIRCULANTES: ¿NUEVOS BIOMARCADORES EN CANCER?. [citado 8 de marzo de 2019]. Disponible en: https://www.um.es/eubacteria/MicroRNAs_circulantes_biomarcadores_cancer.pdf
8. Universidad Industrial de Santander. Facultad de Salud. YV. Salud UIS : revista de la Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud. Vol. 43, Revista de la Universidad Industrial de Santander. Salud. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud; 2011 [citado 11 de mayo de 2019]. 289-297 p. Disponible en: http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0121-08072011000300010#f01
9. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, Iorio M V., Ferracin M, Shimizu M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. Proc Natl Acad Sci. 27 de septiembre de 2005 [citado 11 de mayo de 2019];102(39):13944-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16166262>
10. Nassirpour R, Mehta PP, Yin M-J. miR-122 Regulates Tumorigenesis in Hepatocellular Carcinoma by Targeting AKT3. Cheng JQ, editor. PLoS One. 7 de noviembre de 2013 [citado 19 de abril de 2019];8(11):e79655. Disponible en: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0079655>
11. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. Curr Biol. 30 de abril de 2002 [citado 19 de abril de 2019];12(9):735-9. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12007417>

12. Bai S, Nasser MW, Wang B, Hsu S-H, Datta J, Kutay H, et al. MicroRNA-122 inhibits tumorigenic properties of hepatocellular carcinoma cells and sensitizes these cells to sorafenib. *J Biol Chem*. 13 de noviembre de 2009 [citado 19 de abril de 2019];284(46):32015-27. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19726678>
13. Coulouarn C, Factor VM, Andersen JB, Durkin ME, Thorgeirsson SS. Loss of miR-122 expression in liver cancer correlates with suppression of the hepatic phenotype and gain of metastatic properties. *Oncogene*. 20 de octubre de 2009 [citado 19 de abril de 2019];28(40):3526-36. Disponible en: <http://www.nature.com/articles/onc2009211>
14. Tsai W-C, Hsu PW-C, Lai T-C, Chau G-Y, Lin C-W, Chen C-M, et al. MicroRNA-122, a tumor suppressor microRNA that regulates intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 1 de mayo de 2009 [citado 19 de abril de 2019];49(5):1571-82. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/hep.22806>
15. Altomare DA, Testa JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. *Oncogene*. 14 de noviembre de 2005 [citado 12 de mayo de 2019];24(50):7455-64. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16288292>
16. Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, et al. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 17 de octubre de 1997 [citado 19 de abril de 2019];91(2):231-41. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9346240>
17. Koenig AB, Barajas JM, Guerrero MJ, Ghoshal K. A Comprehensive Analysis of Argonaute-CLIP Data Identifies Novel, Conserved and Species-Specific Targets of miR-21 in Human Liver and Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci*. 14 de marzo de 2018 [citado 11 de marzo de 2019];19(3). Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29538313>
18. Tan Y, Ge G, Pan T, Wen D, Chen L, Yu X, et al. A Serum MicroRNA Panel as Potential Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma Related with Hepatitis B Virus. Guan X-Y, editor. *PLoS One*. 19 de septiembre de 2014 [citado 7 de abril de 2019];9(9):e107986. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25238238>
19. Patel SB, Bellini M. The assembly of a spliceosomal small nuclear ribonucleoprotein particle. *Nucleic Acids Res*. 1 de noviembre de 2008 [citado 12 de mayo de 2019];36(20):6482-93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18854356>
20. Xu Y-F, Hannafon BN, Khatri U, Gin A, Ding W-Q. The origin of exosomal miR-1246 in human cancer cells. *RNA Biol*. 23 de marzo de 2019 [citado 7 de abril de 2019];1-15. Disponible en: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/15476286.2019.1585738>
21. Chai S, Ng K-Y, Tong M, Lau EY, Lee TK, Chan KW, et al. Octamer 4/microRNA-1246 signaling axis drives Wnt/ β -catenin activation in liver cancer stem cells. *Hepatology*. diciembre de 2016 [citado 7 de abril de 2019];64(6):2062-76. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27639189>
22. Clevers H, Nusse R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*. 8 de junio de 2012 [citado 20 de abril de 2019];149(6):1192-205. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22682243>
23. Visvader JE, Lindeman GJ. Cancer Stem Cells: Current Status and Evolving Complexities. *Cell Stem Cell*. 14 de junio de 2012 [citado 20 de abril de 2019];10(6):717-28. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22704512>

24. M^a D, Martínez-Chantar L. MicroRNAs en la Quimiorresistencia del Cáncer Hepático. 2017 [citado 21 de marzo de 2019]. Disponible en: https://addi.ehu.es/bitstream/handle/10810/26437/TFG_Oyarzabal_Echevarri_Ines.pdf?sequence=3&isAllowed=y
25. Zhang WC, Chin TM, Yang H, Nga ME, Lunny DP, Lim EKH, et al. Tumour-initiating cell-specific miR-1246 and miR-1290 expression converge to promote non-small cell lung cancer progression. *Nat Commun.* 21 de diciembre de 2016 [citado 20 de abril de 2019];7(1):11702. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27325363>
26. Cooks T, Pateras IS, Jenkins LM, Patel KM, Robles AI, Morris J, et al. Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nat Commun.* 22 de diciembre de 2018 [citado 20 de abril de 2019];9(1):771. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29472616>
27. Bhagirath D, Yang TL, Bucay N, Sekhon K, Majid S, Shahryari V, et al. microRNA-1246 Is an Exosomal Biomarker for Aggressive Prostate Cancer. *Cancer Res.* 1 de abril de 2018 [citado 20 de abril de 2019];78(7):1833-44. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29437039>
28. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Paviati E, Lima-Oliveira G, Gusella M, et al. Reference miRNAs for colorectal cancer: analysis and verification of current data. *Sci Rep.* 2017 [citado 20 de abril de 2019];7(1):8413. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28827728>
29. Chuma M, Toyoda H, Matsuzaki J, Saito Y, Kumada T, Tada T, et al. Circulating microRNA-1246 as a possible biomarker for early tumor recurrence of hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res.* 28 de marzo de 2019 [citado 3 de abril de 2019];hepr.13338. Disponible en: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/hepr.13338>
30. Qu Z, Wu J, Wu J, Ji A, Qiang G, Jiang Y, et al. Exosomal miR-665 as a novel minimally invasive biomarker for hepatocellular carcinoma diagnosis and prognosis. *Oncotarget.* 6 de octubre de 2017 [citado 7 de abril de 2019];8(46):80666-78. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29113334>
31. Shaheen NMH, Zayed N, Riad NM, Tamim HH, Shahin RMH, Labib DA, et al. Role of circulating miR-182 and miR-150 as biomarkers for cirrhosis and hepatocellular carcinoma post HCV infection in Egyptian patients. *Virus Res.* 15 de agosto de 2018 [citado 7 de abril de 2019];255:77-84. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30003924>
32. Motawi TK, Shaker OG, El-Maraghy SA, Senousy MA. Serum MicroRNAs as Potential Biomarkers for Early Diagnosis of Hepatitis C Virus-Related Hepatocellular Carcinoma in Egyptian Patients. Mehta AS, editor. *PLoS One.* 9 de septiembre de 2015 [citado 7 de abril de 2019];10(9):e0137706. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26352740>
33. Chen YM, Shiu JY, Tzeng SJ, Shih LS, Chen YJ, Lui WY, et al. Characterization of glycine-N-methyltransferase-gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Int J cancer.* 2 de marzo de 1998 [citado 20 de abril de 2019];75(5):787-93. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9495250>

34. Huidobro C, Toraño EG, Fernández AF, Urdinguio RG, Rodríguez RM, Ferrero C, et al. A DNA methylation signature associated with the epigenetic repression of glycine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Med.* 12 de agosto de 2013 [citado 22 de abril de 2019];91(8):939-50. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23475283>
35. Michelotti GA, Machado M V., Diehl AM. NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 1 de noviembre de 2013 [citado 22 de abril de 2019];10(11):656-65. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24080776>
36. Toffanin S, Hoshida Y, Lachenmayer A, Villanueva A, Cabellos L, Minguez B, et al. MicroRNA-Based Classification of Hepatocellular Carcinoma and Oncogenic Role of miR-517a. *Gastroenterology.* mayo de 2011 [citado 22 de abril de 2019];140(5):1618-1628.e16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21324318>
37. Jin F, Wang Y, Li M, Zhu Y, Liang H, Wang C, et al. MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. *Cell Death Dis.* 12 de enero de 2017 [citado 20 de abril de 2019];8(1):e2540-e2540. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28079894>
38. Wilhelm SM, Adnane L, Newell P, Villanueva A, Llovet JM, Lynch M. Preclinical overview of sorafenib, a multikinase inhibitor that targets both Raf and VEGF and PDGF receptor tyrosine kinase signaling. *Mol Cancer Ther.* octubre de 2008 [citado 20 de abril de 2019];7(10):3129-40. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18852116>
39. Fernando J, Sancho P, Fernández-Rodríguez CM, Lledó JL, Caja L, Campbell JS, et al. Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol.* abril de 2012 [citado 20 de abril de 2019];227(4):1319-25. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21604268>
40. Liu L, Cao Y, Chen C, Zhang X, McNabola A, Wilkie D, et al. Sorafenib Blocks the RAF/MEK/ERK Pathway, Inhibits Tumor Angiogenesis, and Induces Tumor Cell Apoptosis in Hepatocellular Carcinoma Model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 15 de diciembre de 2006 [citado 20 de abril de 2019];66(24):11851-8. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17178882>
41. Dudgeon C, Peng R, Wang P, Sebastiani A, Yu J, Zhang L. Inhibiting oncogenic signaling by sorafenib activates PUMA via GSK3 β and NF- κ B to suppress tumor cell growth. *Oncogene.* 30 de noviembre de 2012 [citado 22 de abril de 2019];31(46):4848-58. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286758>
42. Cazanave SC, Elmi NA, Akazawa Y, Bronk SF, Mott JL, Gores GJ. CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipoapoptosis. *Am J Physiol Liver Physiol.* julio de 2010 [citado 22 de abril de 2019];299(1):G236-43. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20430872>