



**FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

TRABAJO FIN DE GRADO

**TÍTULO: Alteraciones en la expresión de
miRNAs como causantes de enfermedades hepáticas**

Autor: Muñoz Gómez, Pedro

Fecha: Julio 2019

Tutor: Escribano Illanes, Óscar

Contenido

1	Introducción	4
2	Objetivo	5
3	Material y métodos	5
4	Resultados y discusión.....	6
4.1	Biogénesis.....	6
4.2	miRNAs como biomarcadores para cribado no-invasivo.	7
4.3	miRNAs de interés en carcinoma hepatocelular	9
4.3.1	miR-122	9
4.3.2	let-7	10
4.3.3	miR-155	12
4.3.4	miR-21	12
4.4	Progresión cancerosa	13
4.4.1	Hepatitis	13
4.4.2	Fibrosis.....	14
4.4.3	Metástasis de cáncer colorrectal.....	15
5	Conclusiones.....	16
6	Bibliografía.....	17

Resumen

Los miRNAs son moléculas endógenas presentes en la mayoría de los organismos vivos y que conforman un sistema de regulación post transcripcional de la expresión génica. Se han descrito alteraciones específicas en la expresión de miRNAs en una gran mayoría de patologías, tanto agudas como crónicas. Sin embargo, el resultado global de dichas alteraciones es difícilmente predecible por lo complejo de su mecanismo de acción. El objetivo del presente trabajo es describir el papel que presentan los miRNAs en la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular. Como miRNAs especialmente implicados destacan, entre otros, miR-122 como molécula específica hepática y alterada en cáncer, *let-7* como familia de miRNAs implicada en cáncer, entre otros procesos, miR-155 como molécula de carácter inflamatorio y miR-21 como molécula implicada en diferentes tipos de cáncer. Los procesos de fibrosis, hepatitis víricas o metástasis de carcinoma colorrectal favorecen el desarrollo de carcinoma hepatocelular y los miRNAs están implicados en su regulación. Los miRNAs tienen una función relevante en el inicio y el desarrollo del carcinoma hepatocelular y se plantean como una posible alternativa adecuada para el diagnóstico y el tratamiento del mismo.

Palabras clave: Cáncer, hígado, miRNAs, biomarcadores,

Abstract

miRNAs are endogenous molecules which are present in almost all kind of organisms and form a genetic expression post transcriptional regulation system. Specific alterations of miRNA expression have been shown in many chronic and acute pathologies. However, the overall result of any alteration is hardly predictable due to the complexity of their mechanism of action. The aim of the present study was to describe the role that miRNAs play in pathophysiology, diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. As mainly implicated miRNAs we can mention, among others, miR-122 as a liver-specific molecule and altered in cancer, *let-7* as a miRNA family implciated in cancer between other pathologies, miR-155 as an inflammatory marker and miR-21 as a molecule that plays a role in different cancer types. Processes as fibrosis, viral hepatitis or colorrectal carcinoma metastasis promote hepatocellular carcinoma developement and miRNAs are implicated in its regulation. Thus,

miRNAs play a key role in start and development of hepatocellular carcinoma and they may seem to be an adequate alternative for its diagnosis and treatment.

Key words: Cancer, liver, miRNA, biomarker

1 Introducción

Los miRNAs son moléculas endógenas de ácido ribonucleico no codificantes de unos 23 nucleótidos, que tienen un papel de gran importancia en la regulación génica en animales y plantas, y que, actúan uniéndose de manera específica a moléculas de ARN mensajero codificante para proteínas por complementariedad de bases nitrogenadas, dirigiendo así un tipo de represión post transcripcional.

Los miRNAs fueron descritos por primera vez en el año 1993 como resultado de una exhaustiva investigación sobre el gen *lin-4* de *Caenorhabditis elegans*, tras esclarecerse que su función no era la de codificar la síntesis de proteínas, pese a ser un gen determinante y esencial en el desarrollo de dicho organismo. Posteriormente, se describió que existía una secuencia nucleotídica complementaria al gen *lin-4* en el gen *lin-14*, descubrimiento, a partir del cual, se planteó la posibilidad de una regulación de la expresión génica a nivel del proceso de traducción.

Los genes, anteriormente mencionados, tienen un papel fundamental en el desarrollo larvario/embrionario del organismo en el que fueron descritos, y una alteración en la expresión, tanto de los genes como de los miRNAs, llevaban a un desarrollo incompleto o alterado.

Además, posteriormente, estas moléculas fueron descritas en otros organismos tales como animales, plantas, algas verdes o incluso virus. A medida que crecía el conocimiento sobre esta familia de moléculas, la importancia de los miRNAs en el desarrollo y funcionamiento de los organismos fue quedando patente, y la comunidad científica adquirió conciencia del potencial que suponía para comprender aspectos fundamentales en Biología Molecular, así como, incluso posibles aplicaciones en diagnóstico o tratamiento de ciertas patologías.

Los miRNAs parecen ser los principales responsables de la “regulación fina” de la expresión génica, implicada en el desarrollo y la homeostasis tisular (1). Además, estudios computacionales han estimado que los miRNAs podrían regular la expresión de hasta un 60% de los genes codificantes para proteínas en humanos (2). En este contexto, los miRNAs ejercen un estrecho control de la replicación celular, por lo que, se planteó su posible papel en patologías provocadas por un control deficitario del ciclo celular, entre ellas el cáncer.

Desde su descubrimiento, en la última década del pasado siglo, el conocimiento sobre estas moléculas ha crecido exponencialmente, y, además de la regulación del desarrollo y control

del ciclo celular, se ha descrito su papel en procesos fisiológicos y fisiopatológicos de vital importancia tales como la inflamación, la apoptosis y la comunicación intercelular en general.

Se han descrito alteraciones específicas en la expresión de miRNAs en una gran mayoría de patologías, tanto agudas como crónicas. En el caso concreto del hígado, se ha demostrado que pueden ejercer casi todo tipo de papeles, teniendo efectos pro o anti-inflamatorios, así como pro o anti-fibróticos. Incluso, se ha mostrado su posible papel como oncogenes o genes supresores de tumores (3).

Sin embargo, a medida que se profundiza en el papel individual de cada uno de los miRNAs descritos, puede comprobarse que, el mecanismo global de regulación génica mediada por este sistema es extraordinariamente complejo, pudiendo actuar cada miRNA tanto positiva como negativamente sobre la expresión de varias proteínas, que a su vez, pueden ser reguladas por varios miRNAs cada una, y que, a su vez, pueden formar parte de vías de señalización que regulan varios procesos simultáneamente.

Por tanto, a la hora de describir estos procesos, es necesario describir de manera pormenorizada cada uno de los miRNAs y su acción concreta en cada situación, sobre cada diana, y las posibles consecuencias de su alteración.

2 Objetivo

El objetivo del presente trabajo es describir el papel que presentan los miRNAs en la fisiopatología, diagnóstico y tratamiento del carcinoma hepatocelular.

Para ello, se profundizará en la biogénesis y mecanismo de acción de estas moléculas en el contexto de un sistema propio de regulación génica, para, posteriormente, analizar de manera individual algunos de los miRNAs, cuya función o alteración haya demostrado tener una importancia relevante en la patología de estudio, así como, la función que desempeñan estas moléculas en las situaciones fisiopatológicas que se relacionan con el desarrollo de la patología.

3 Material y métodos

Este trabajo se basa en una revisión bibliográfica realizada en el año 2019 en la base de datos Pubmed, usando como referencias tanto revisiones científicas como trabajos experimentales.

Las citas empleadas en la redacción del trabajo fueron seleccionadas preferentemente en función de la fecha de publicación, priorizando la selección de los artículos más recientes.

Algunos de los términos empleados en la búsqueda fueron “liver cancer”, “miRNA”, así como los nombres individuales de cada una de las moléculas descritas posteriormente.

4 Resultados y discusión

4.1 Biogénesis

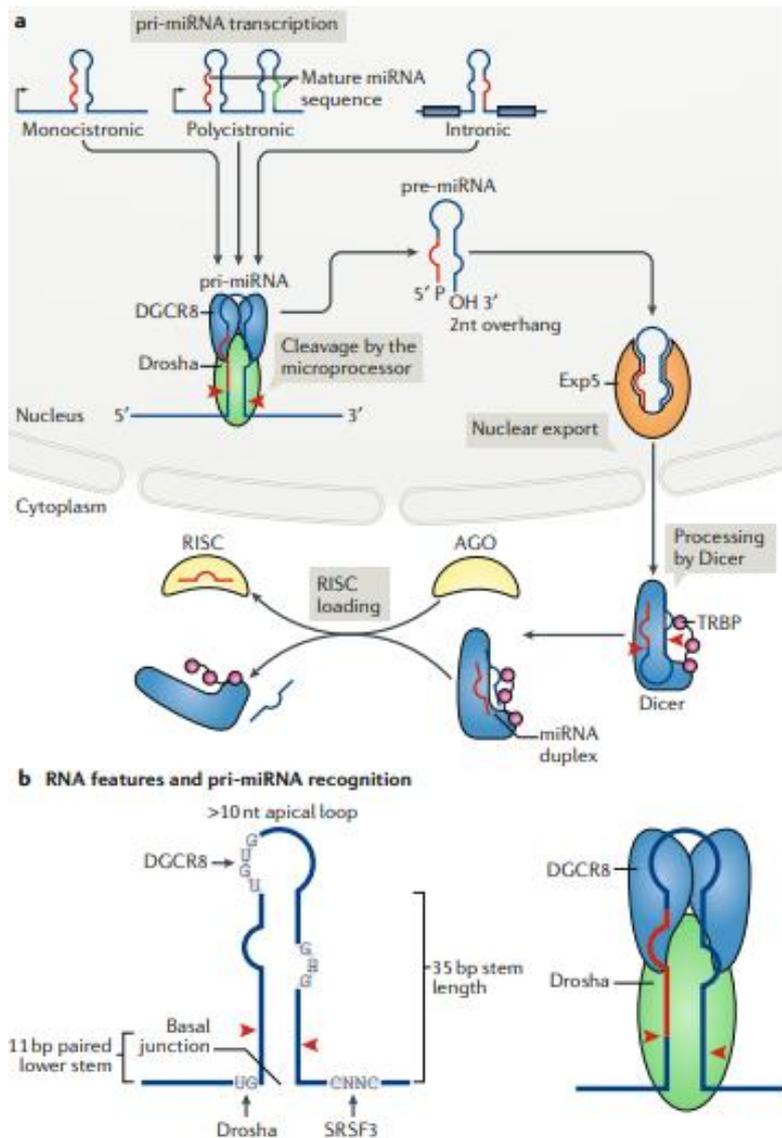


Fig. 1. Esquema del mecanismo canónico de biogénesis de los miRNAs. Ref: (4)

Los miRNAs se transcriben de manera individual o bien en grupos denominados *clusters*, incluso dentro de secuencias intrónicas de ciertos genes, en forma de un precursor denominado pri-miRNA. Los pri-miRNA son procesados posteriormente, aún en el núcleo, por un complejo proteico denominado microprocesador, que libera una secuencia de nucleótidos enrollada en forma de horquilla denominada pre-miRNA.

El microprocesador se compone de diversas proteínas asociadas tanto estructural como funcionalmente: DROSHA, una RNAsa de tipo III, la región crítica 8 DiGeorge de la proteína de unión a RNA de doble hélice (dsRBP, por sus siglas en inglés), conocida como DGCR8, además de otras proteínas auxiliares cuya función aún no ha sido completamente esclarecida.

Las horquillas de pre-miRNA son exportadas al citoplasma mediante una proteína de membrana denominada exportina 5 (Exp5), donde otra RNAsa de tipo III conocida como Dicer realiza un nuevo procesamiento, en colaboración con otra dsRBP, la proteína de unión a RNA de trans-activación adaptable (TRBP, ó TRBP2).

Como resultado de este nuevo corte en la horquilla, se liberan dos secuencias complementarias de nucleótidos: una de ellas constituye la secuencia del miRNA maduro y la otra se conoce como secuencia guía, que queda libre en el citoplasma. Ambos sentidos de expresión pueden tener función biológica, incluso diferente entre ellos.

Finalmente, en un proceso denominado carga de RISC, la secuencia madura del miRNA se asocia a una proteína de la familia Argonauta (AGO), para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC).

A pesar de que esta es la vía mejor descrita de biogénesis de miRNAs, se ha demostrado que existen mecanismos alternativos que permiten su síntesis en organismos en los que se ha bloqueado esta vía mediante ingeniería genética (4).

4.2 miRNAs como biomarcadores para cribado no-invasivo.

El estudio genético durante el diagnóstico del cáncer es una técnica relativamente rutinaria. Sin embargo, las muestras necesarias para realizar un estudio genético de las células tumorales requerían un método de obtención invasivo (biopsia), y su estabilidad estaba comprometida, siendo altamente sensibles al almacenamiento a temperatura ambiente, y requiriendo tratamientos complejos previos al análisis.

A pesar de ello, la irrupción de los miRNAs y la descripción de sus alteraciones en tejidos tumorales ha supuesto una revolución en cuanto al diagnóstico diferencial de tumores. En primer lugar, la presencia de exosomas/microvesículas que transportan miRNAs en fluidos corporales, permite una obtención de muestras no invasiva que se postula como una opción idónea para el cribado.

Hasta el momento, se han descrito 4 formas de presentación de miRNAs extracelulares: (a) encapsulados en exosomas, (b) formando un complejo con la proteína Argonauta2 (Ago2), (c) unidas a lipoproteínas de alta densidad (HDL) o (d) unidas a la proteína de unión de RNA "nucleophosmin (NMP1)". Sin embargo, no existe evidencia para negar la existencia de otras formas en las que los miRNAs puedan encontrarse en medios extracelulares como fluidos biológicos. Además, se ha planteado la posibilidad de que estas moléculas puedan liberarse de manera pasiva de las células rotas, debido a daño tisular, inflamación crónica, apoptosis o necrosis. (5)

Las características de dichas estructuras les confieren una resistencia especial a condiciones ambientales menos favorables: se ha demostrado su estabilidad durante períodos razonables de almacenamiento a temperatura ambiente y pHs no fisiológicos, además de ciclos de

congelación-descongelación repetidos, lo que permite un tratamiento más cómodo de las muestras.

La firma de miRNAs se ha propuesto como una vía adecuada para identificar el linaje celular del que proceden las células cancerosas. Este hecho puede tener una gran relevancia a la hora de clasificar ciertos tipos de neoplasias con manifestaciones similares (por ejemplo, ciertos tipos de leucemia), además de poder diferenciar si una masa tumoral supone la lesión primaria o bien una metástasis.

Además de las alteraciones en la vía de síntesis y de la regulación de la expresión individual de miRNAs que modifican las concentraciones de cada especie, en ciertos tipos de cáncer se han descrito alteraciones genéticas que alteran la función de los mismos, entre ellas mutaciones puntuales o deleciones en 3'UTR (6)

Por otra parte, aunque los miRNAs circulantes en fluidos han sido estudiados preferentemente en plasma, su presencia es significativa también en otros fluidos corporales más accesibles, incluyendo saliva u orina, lo que permite una toma de muestras aún más cómoda para el paciente.

Además, existen circunstancias fisiológicas que generan un debate relevante en cuanto a este potencial papel diagnóstico de los miRNAs: la presencia de RNAsas en fluidos genera interrogantes sobre si los niveles de miRNAs que pueden ser analizados tras la extracción de muestras son realmente representativos de los niveles fisiológicos de los mismos.

El perfil de miRNAs circulantes supone una respuesta extraordinariamente rápida a diferentes estímulos. En principio, este hecho podría resultar muy positivo por la posibilidad de una detección muy temprana de diferentes patologías o estadios. Sin embargo, los cambios resultan tan rápidos que respuestas de estrés o incluso traumas relacionados con la misma toma de muestras podrían alterar el perfil, interfiriendo con la medida y posterior interpretación.

La especificidad mostrada en el análisis de perfiles de miRNA supone un importante avance frente a las posibilidades actuales basadas en la medición de marcadores tumorales cuya especificidad y sensibilidad son limitadas.(5)

En cuanto al potencial papel de los miRNAs en el planteamiento de terapias alternativas para el cáncer, se postuló como una opción posible tras la descripción de las alteraciones ciertos miRNAs en tumores, y sus funciones. Las primeras opciones supusieron la inoculación de secuencias de nucleótidos complementarias a ciertos miRNAs que se habían detectado como sobreexpresados, de manera que sirvieran como reservorio para los mismos y atenuar la elevación en sus niveles, limitando, de esta manera, su actividad.

Sorprendentemente, después de este planteamiento, se describieron estructuras fisiológicas con esta misma función, lo que parece avalar esta propuesta.

En 2014 comenzó un ensayo clínico (MRX34), en el que se empleaba el miRNA miR-34a, descrito previamente como supresor tumoral, vehiculizado en nanopartículas, con el fin de

emular su acción fisiológica. En el ensayo se estudió su seguridad, obteniéndose un perfil positivo, pero su efectividad aún no ha sido evaluada (7)

La concentración de miRNAs circulantes en plasma es suficiente para que no se requieran técnicas de concentración para su detección y análisis. Sin embargo, las muestras sí requieren ciertos tratamientos previos al análisis: la secreción de estas moléculas por parte de las plaquetas es suficientemente elevada como para poder interferir en sus perfiles. por tanto, el procesamiento de muestras requiere la centrifugación temprana para eliminar las plaquetas.

Diversos estudios han concluido que los perfiles de miRNAs en pacientes sanos se mantienen constantes, por lo que sería posible establecer un nivel basal con el que poder comparar otras muestras para detectar posibles patologías. Sin embargo, existe cierta controversia sobre los criterios de selección de estos estudios.

Además, se ha demostrado que el perfil de expresión de miRNAs es suficientemente sensible como para variar en respuesta a patologías como la diabetes, o durante fases no sintomáticas de otras patologías, incluso en respuesta a la contaminación ambiental. A todo esto se suma la falta de estudios sobre la afectación del perfil de miRNAs circulantes en respuesta a situaciones fisiopatológicas tan comunes como son las infecciones.

Se ha planteado que la alteración en los niveles circulantes de miRNAs asociada al desarrollo del cáncer podría ser consecuencia de la propia fisiopatología del proceso, como forma de comunicación entre tejidos.

4.3 miRNAs de interés en carcinoma hepatocelular

Si bien es cierto que el sistema de regulación conformado por las interacciones de los miRNAs entre sí y con los mRNAs proteínogénicos es extraordinariamente complejo y actualmente no se ha descrito en profundidad, también lo es que ciertas moléculas han sido estudiadas más exhaustivamente y sus funciones han sido descritas con mayor detalle, lo que permite profundizar de una manera moderada y razonable en sus funciones y su posibles papeles en las patologías en las que parecen estar implicados.

En los siguientes apartados se realiza un análisis centrado en algunos de los miRNAs cuya implicación en el desarrollo del carcinoma hepatocelular presenta una mayor evidencia científica. La información disponible de cada uno se abordará individualmente con el fin de obtener la información más básica posible sobre cada uno de ellos, a pesar de que la evidencia apunta a que cada una de las funciones descritas podrían ser el resultado de una interacción compleja de un elevado número de miRNAs diferentes.

4.3.1 miR-122

Su expresión supone alrededor del 70% de la expresión global de miRNAs en el hígado. Su concentración instantánea puede ser variable, dado que su expresión parece seguir un ritmo circadiano, aunque sus niveles absolutos se mantienen estables.

Sus funciones mejor descritas son las implicadas en la regulación de los niveles de colesterol sérico, así como la homeostasis del hierro. Sin embargo, a pesar de que se han descrito algunas dianas específicas reguladas por esta molécula, los mecanismos no han sido completamente esclarecidos. (8)

La experimentación si parece ser consistente cuando se estudia el comportamiento de este miRNA en hepatocarcinoma, reflejándose siempre un descenso en sus niveles acompañando al desarrollo de la patología. En este sentido, este miRNA actuaría como supresor de tumores, siendo además el pronóstico del tumor, peor cuanto menores son los niveles de esta molécula.

Estudios in vitro parecen indicar que miR-122 podría estar implicado en la resistencia a tratamientos para el carcinoma hepatocelular, a través de mecanismos complejos (9).

La progresión del tumor requiere la generación de biomasa a través de la vía de las pentosas fosfato, cuya enzima limitante, la Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, ha resultado ser una diana directa del miR-122, lo que contribuiría, al menos en parte, a la proliferación del tejido tumoral a través de este mecanismo (10).

También parece tener una importancia especial el papel que juega miR-122 en la regulación del ciclo celular a través de la ciclina G1, una diana directa del mismo. Mediante esta interacción, los niveles de ciclina G1 descienden en la célula, lo que parece paralizar el ciclo celular. Por el contrario, con el desarrollo de HCC, niveles elevados de esta proteína han demostrado traducirse en una mayor tasa de crecimiento de las células cancerosas (11).

miR-122 también ha demostrado ser un factor necesario para la replicación del virus de la hepatitis C, causante directo de carcinoma hepatocelular (8).

4.3.2 *let-7*

let-7 es una familia de miRNAs de secuencia muy conservada entre especies que ha mostrado jugar un papel muy importante en la modulación de procesos cancerosos. La implicación de la expresión de los miRNAs que componen esta familia ha sido previamente descrita, de manera que mutaciones puntuales en regiones promotoras de la expresión de estas secuencias parece asociarse con diferentes pronósticos y supervivencias en varios tipos de cáncer (12), incluyendo el cáncer hepático (13).

Esta familia de miRNA tiene como dianas algunas proteínas fundamentales en la regulación del ciclo celular y otros procesos celulares de vital importancia, entre ellas Ras, Bcl-xl, MAPK,

c-Myc, ciclina D1 y otros oncogenes, además de regular la vía Wnt/beta-catenina implicados en HCC (14).

La expresión de los miRNAs de la familia *let-7* está sometida a un especial control por parte de la proteína Lin28, que es capaz de inhibir la biosíntesis de estos miRNAs al menos a tres niveles: inhibiendo el procesamiento por Drosha, Dicer, o bien degradación previa uridilación del pre-miRNA. A su vez, la expresión de Lin28 está epigenéticamente regulada por parte de miR-125, un miRNA que ha demostrado tener un importante papel en proliferación celular, metástasis, apoptosis, inmunidad y diferenciación celular (15).

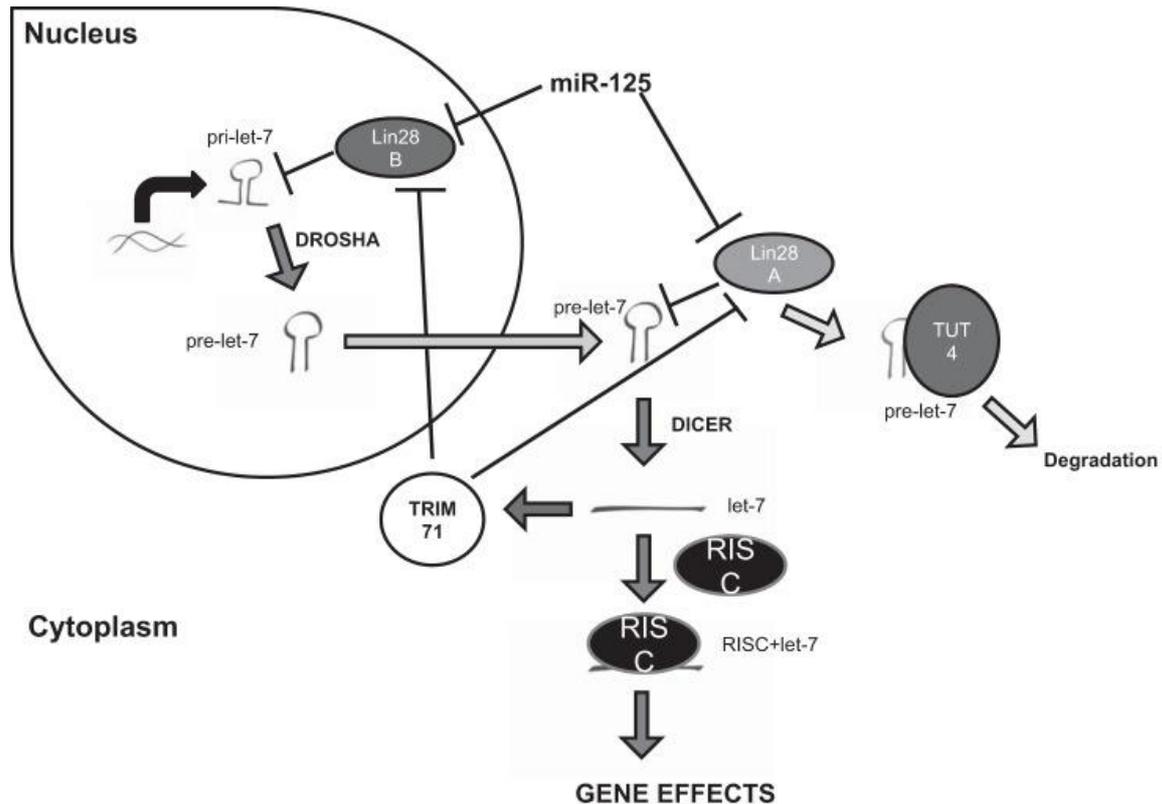


Fig. 2. Esquema del sistema de regulación de la expresión de los miRNAs de la familia *let-7* por parte de Lin28 y miR-125. Ref:(15)

A pesar de que los niveles fisiológicos de los miRNAs que conforman esta familia son muy variables a lo largo del desarrollo del organismo, su control resulta fundamental porque alteraciones permanentes en su expresión aumentan sensiblemente el riesgo de malignización del tejido (16).

Los miRNA miembros de la familia *let-7* han demostrado poder actuar bien como oncogenes o genes supresores de tumores, estando en unos casos aumentados sus niveles y en otros disminuidos en tejidos cancerosos en comparación con el tejido sano. Además, diferentes perfiles de expresión parecen corresponderse con diferentes evoluciones de la patología (17).

El papel potencial que podría desempeñar esta familia de miRNAs en el desarrollo y mantenimiento del carcinoma hepatocelular parece ser bastante importante, actuando a nivel de procesos tan importantes como la regulación del ciclo celular o la autofagia. Además,

destaca también el papel regulador que presenta *Lin-28*, que regula globalmente la expresión de todos los miembros de la familia y cuyas alteraciones parecen tener un impacto significativo sobre el desarrollo de la patología (15).

4.3.3 *miR-155*

miR-155 es una molécula cuya expresión se relaciona con estados de inflamación, lo que le confiere una importancia especial en la progresión de diferentes patologías hepáticas hasta concluir en carcinoma hepatocelular.

En hepatocitos, se ha descrito que miR-155 puede unirse a los ligandos de los receptores tipo Toll-like, interfiriendo en el proceso de inflamación mediada por este tipo de receptores (18)

Además, se ha descrito una regulación aberrante de esta molécula en diferentes tipos de cáncer. se han descrito sobre expresiones de mir-155 en linfoma de células B asociadas al virus de Eppstein-barr, patologías asociadas al virus asociado al sarcoma de Kaposi, leucemia linfocítica crónica de células B o cáncer de mama. En todas ellas, mir-22 se encuentra sobrerregulado y un descenso en sus niveles parece asociarse a un mejor pronóstico. (19)

En cuanto a su papel en el carcinoma hepatocelular, mir-155 parece comportarse como un oncomiR al ejercer una acción oncogénica. FoxO3a es un factor de transcripción cuya función antioncogénica ha sido ampliamente comprobada, desencadenando una cascada de señalización que tiene una finalidad pro-apoptótica en células alteradas. FoxO3a ha demostrado ser una diana de miR-155, que a su vez se ha mostrado consistentemente elevado en diferentes líneas de carcinoma hepatocelular. Los niveles elevados de miR-155 presentes en el tejido tumoral disminuyen la actividad de FoxO3a, con lo que se bloquea la cascada pro-apoptótica y, con ello, se permite la proliferación celular, asociándose a un peor pronóstico en patologías cancerosas (20).

Además, también ha sido demostrado que la sobreexpresión de miR-155 genera un ambiente propicio para el mantenimiento y auto-renovación de células madre cancerosas (*cancer stem cells*, CSC) en carcinoma hepatocelular, mediante, al menos, la regulación a la baja de la expresión de TP53INP1, una diana directa de miR-155 que actúa sobre P53, bloqueando su acción e inhibiendo la apoptosis y una importante vía de regulación del ciclo celular (21).

4.3.4 *miR-21*

miR-21 ha demostrado estimular la proliferación y migración de diferentes tipos de células tumorales, como glioma o cáncer gástrico, y también ha demostrado encontrarse en niveles elevados en carcinoma hepatocelular comparado con tejido sano. en cuanto a su papel en la patología, se ha demostrado que actúan a nivel de la proteína PTEN, con lo que un descenso en sus niveles conduce a un arresto del ciclo celular a nivel de G2/M, con lo que disminuyen la proliferación y migración celular (22).

La inhibición de PTEN por parte de miR-21 también tiene efectos importantes en la apoptosis. En un estudio diferencial entre las dos cadenas que conforman miR-21, se demostró que un descenso en los niveles de miR-21-3p fue capaz de aumentar la sensibilidad de las células madre de cáncer hepático aumentando la sensibilidad a la apoptosis por aumentar los niveles del ligando inductor de apoptosis relacionado con TNF (TRAIL, por sus siglas en inglés), regulado a través de la vía PI3K/Bad/Akt, actuando a nivel de PTEN (23).

4.4 Progresión cancerosa

El desarrollo del carcinoma hepatocelular habitualmente es consecuencia de una agresión continuada al tejido hepático, de la que deriva una respuesta inflamatoria crónica, un desbalance en la apoptosis, una respuesta inmune alterada, alteraciones metabólicas y depósito de fibras de colágeno (fibrosis). Se han descrito cambios en el perfil de miRNAs como consecuencia del desarrollo de patologías hepáticas en comparación con el tejido sano (24).

4.4.1 Hepatitis

La inflamación crónica es uno de los principales factores de riesgo para el desarrollo de HCC, y una de las causas principales de inflamación hepática crónica son las infecciones víricas (hepatitis). Los virus de las hepatitis B y C (HBV y HCV) han sido directamente relacionados con el desarrollo de cáncer, según mecanismos muy complejos de los cuales actualmente siguen conociéndose detalles. Recientemente se ha comenzado a describir el papel vital que juegan los miRNAs tanto en el desarrollo de la propia patología como en la modulación de la inflamación asociada y el riesgo de progresión o malignización.

El virus de la hepatitis B (HBV) es un virus DNA perteneciente a la familia *Hepadnaviridae*. Este virus se considera una causa directa de carcinoma hepatocelular, y los mecanismos descritos que pueden conducir a esta patología son directos. En primer lugar, el genoma del virus se integra directamente en los cromosomas de las células infectadas, alterando el material genético y su expresión y pudiendo provocar mutaciones. Además, la replicación viral necesariamente resulta en una alteración en la regulación del ciclo celular, por lo que puede producirse un desequilibrio entre la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores. Todo ello va acompañado de los mecanismos indirectos basados en la inflamación crónica del hígado que supone la presencia del virus, que conduce a la malignización del tejido previa fibrosis y cirrosis (25).

Tras la secuenciación y estudio pormenorizado del genoma del virus, se ha llegado a la conclusión de que además de las proteínas necesarias para la supervivencia y replicación del mismo, contiene material genético que codifica para una proteína con unas propiedades tales que han llevado a clasificar el gen que contiene su secuencia como un oncogen viral. Esta proteína se conoce como la proteína X del virus de la hepatitis B (HBV X protein, HBx). Esta proteína regula la replicación viral además de numerosos procesos moleculares de la célula hospedadora, tales como el ciclo celular, inmunidad, apoptosis o adhesión, relacionándose directamente con efectos oncogénicos.

Los miRNAs también han demostrado jugar un papel clave durante la infección por HBV. Concretamente, miR-122 parece estar directamente relacionado con la replicación viral y la tumorigénesis, dadas las características observadas en cuanto a su patrón diferencial de expresión en tejido sano comparado con canceroso, y sus importantes funciones descritas como gen supresor de tumores, descritas anteriormente. Sin embargo, existen otros microRNAs implicados directamente en este proceso, entre ellos miembros de la familia *let-7*, miR-221, miR-101 o miR-152 (26).

Además de la alteración en la expresión de los miRNAs en el organismo hospedador y sus subsecuentes efectos, recientemente ha sido descrita la presencia de este tipo de moléculas como parte del propio genoma del virus, actuando mediante mecanismos semejantes a los de sus homólogos humanos y con importantes funciones. De esta manera, HBV-miR-3 parece tener como dianas los genes del propio virus, moderando su expresión y limitando así su replicación y, por tanto, el daño causado a la célula hospedadora (27).

El virus de la hepatitis C, HCV, es un virus RNA monocatenario perteneciente a la familia *Flaviviridae*. La intervención de los miRNAs en la regulación de la replicación del HCV ha sido extensamente estudiada. La cadena de RNA que compone el genoma del virus puede ser directamente reprimida por parte de miRNAs endógenos, aunque paradójicamente parece ser aún más importante el papel positivo que tiene sobre la replicación miR-122, estableciendo en este caso una unión cooperativa que favorece la replicación viral por estabilización de la molécula que compone el genoma vírico (28).

El papel de miR-155 en la inflamación lo relaciona directamente con la patogénesis de HCV, de manera que la infección ha demostrado aumentar los niveles de esta molécula tanto in vitro como in vivo, y parece que este incremento parece favorecer la replicación del virus. Los niveles de miR-21 también aumentan durante la infección por HCV, lo que ha demostrado relacionarse con una represión de la liberación de IFN de tipo I y, por tanto, una mayor progresión de la infección, además de relacionarse con otras formas de daño hepático derivadas de la infección, como la fibrosis (29).

4.4.2 Fibrosis

La fibrosis hepática es una situación patológica que se desencadena en el tejido hepático como respuesta a agresiones continuadas, entre ellas la inflamación, y que consiste en la formación y depósito de componentes proteicos de la matriz extracelular, formando tejido cicatrizal no funcional. Si las agresiones al tejido continúan, la fibrosis puede evolucionar a cirrosis, en la cual la funcionalidad de las células hepáticas queda comprometida y la perfusión se reduce. Finalmente, la cirrosis puede evolucionar a carcinoma hepatocelular.

La formación de componentes de la matriz extracelular que provoca la fibrosis tiene lugar por parte de un tipo de células denominadas miofibroblastos. A pesar de que recientemente se ha descrito que este tipo de células puede formarse como consecuencia de la diferenciación

de diversos tipos de células, aún se considera que los principales precursores son las células estrelladas hepáticas (30).

Las células estrelladas hepáticas son un tipo de células presentes en el hígado de manera fisiológica, que presentan como característica principal la presencia de vesículas grasas en su interior con un alto contenido en vitamina A. Como respuesta a diferentes estímulos inflamatorios, las células estrelladas comienzan la diferenciación a miofibroblastos, pierden sus vesículas grasas y comienzan a secretar colágeno de tipo I y III, además de otros componentes de la matriz extracelular (31).

Como en el resto de patologías hepáticas, el papel de los miRNAs en la fibrosis hepática ha sido estudiado, obteniéndose patrones diferenciales comparando tejido sano con tejido patológico. En este contexto, se han conseguido identificar secuencias que favorecen la fibrosis y otras que la inhiben, mediante diferentes mecanismos.

Entre ellos, el papel de miR-21 en la fibrosis ha sido descrito en la inhibición de la activación de las células estrelladas hepáticas y reprimiendo la expresión del factor de crecimiento transformante beta. Esta molécula es sintetizada fundamentalmente por las mismas células estrelladas y tiene como función principal la estimulación de la producción de colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, además de inhibir la producción de moléculas que degradan esta matriz, como metaloproteasas. Además de todo ello, una elevación en los niveles del factor de crecimiento transformante parecen relacionarse con una inducción de la apoptosis en hepatocitos, lo que se relaciona con una pérdida de tejido y aumento del daño hepático (32).

La regulación parece ser compleja y otros miRNAs están implicados. Por ejemplo, miR-19a parece tener un papel antifibrótico actuando de una manera similar a miR-21 a nivel de TGF beta y la activación de las células estrelladas. En contraste, otros miRNAs como miR-221/222 parece tener un papel pro fibrótico, puesto que sus niveles se encuentran elevados en el tejido fibrótico y en células estrelladas activadas (33).

4.4.3 Metástasis de cáncer colorrectal

El hígado es el órgano al que más frecuentemente se dirige la metástasis del cáncer colorrectal, debido a que los vasos sanguíneos que irrigan la zona afectada derivan directamente en el sistema portal. Una parte importante del cáncer hepático está constituido por este tipo de metástasis, por lo que resulta crucial poder discriminar si un tumor hepático es primario o una metástasis de otro proceso tumoral porque los requerimientos en cuanto a tratamiento son completamente diferentes.

El cáncer colorrectal es uno de los más prevalentes a nivel mundial y presenta una elevada morbimortalidad, especialmente en estadios avanzados como es el caso en el que se ha producido un proceso de metástasis. El tratamiento de elección en este caso precisa necesariamente una resección quirúrgica del tejido malignizado, que podría evitarse si la patología es tratada en estadios anteriores.

La expresión de miRNAs ha demostrado alterarse, además de en procesos tumorales con respecto a tejido sano, entre tejidos tumorales de diferentes tipos entre sí. De esta manera, la expresión de miRNAs asociada a un proceso tumoral podría permitir distinguir la fuente del tumor primario y, por tanto, diferenciar la procedencia de un tumor hepático. Por otra parte, se ha planteado la posibilidad de que la alteración en la expresión de estas moléculas pueda intervenir activamente en el proceso de metástasis.

Este proceso parece ser extraordinariamente complejo, de forma que se requieren alteraciones en la expresión de varias proteínas simultáneamente, siendo reprimidas cada una de ellas por varios miRNAs a la vez, para poder observar un efecto relevante (34).

Por ello, la descripción del perfil de expresión de miRNAs tanto tisulares como circulantes podría ser de gran ayuda en el diagnóstico diferencial tanto de las patologías como de sus estadios, además de ayudar potencialmente a prever el riesgo de metástasis.

miR-21, además de encontrarse en niveles elevados en HCC, como se ha expuesto de manera extensa anteriormente, ha demostrado también presentar expresiones elevadas en tejido tumoral colorrectal. Además de su implicación en la tumorigénesis, parece tener importancia en el proceso de metástasis a través de la inhibición de la expresión de la proteína de muerte celular programada 4 (programmed cell death 4, PDCD4), que se relaciona de manera negativa con la malignización celular y la capacidad invasiva de las mismas (35).

Los niveles en suero de miR-200 y miR-141 han demostrado encontrarse elevados en pacientes con cáncer colorrectal e intervenir en el proceso de metástasis hepática. Estos miRNAs parecen afectar a nivel de la transición epitelial-mesenquimal por actuación sobre E-cadherina, además de inhibir la apoptosis (36).

mTOR es una serin/treonin proteinquinasa con implicaciones de gran importancia en la señalización celular, formando parte de la ruta PI3K-Akt-mTOR. Entre sus funciones, esta proteína estimula la reproducción celular y, por ello, se considera un proto-oncogen. Además de encontrarse sus niveles elevados en tejidos tumorales de diversas localizaciones, también se ha descrito que sus niveles están elevados en tejido metastásico comparado con el tumor de origen. miRNA-99b-5p ha demostrado inhibir el proceso de metástasis hepática del carcinoma colorrectal inhibiendo la expresión de mTOR (37).

5 Conclusiones

Con toda la información expuesta anteriormente, podemos concluir que los miRNAs se posicionan como una opción que podría tener gran relevancia tanto en el diagnóstico como en el tratamiento y en la posibilidad de describir de manera más exhaustiva la fisiopatología del carcinoma hepatocelular, así como la de otras patologías hepáticas.

Entre todo ello, es destacable resaltar su papel como biomarcadores de obtención no invasiva, dado que con técnicas relativamente sencillas se permiten obtener técnicas de diagnóstico

con una sensibilidad y especificidad adecuadas, permitiendo un manejo más cómodo de las muestras y un tiempo de espera menor para la obtención de los resultados.

Por otra parte, la mejor comprensión de las funciones que cumple cada molécula en diferentes situaciones fisiológicas y fisiopatológicas puede llevar a pensar que, además de unos biomarcadores apropiados, podrían considerarse incluso como dianas terapéuticas interesantes que abrieran una nueva opción terapéutica para una patología tan problemática como el carcinoma hepatocelular.

Sin embargo, y de una manera especial, es necesario resaltar la extraordinaria complejidad de los mecanismos de regulación y mecanismos de acción de las moléculas estudiadas en este trabajo de investigación. Sorprende el delicado equilibrio que parece guardar la expresión de estas moléculas para conseguir un estado fisiológicamente estable, dadas las complejas relaciones que existen entre la expresión y función de los miRNAs.

De esta manera debemos considerar las primeras conclusiones expuestas como frentes actualmente limitados, sobre los cuales debe efectuarse una extensa investigación que permita describir de una manera más exhaustiva las relaciones que existen sobre las funciones de cada molécula y las consecuencias que tiene la alteración del equilibrio que componen.

Por todo ello, podemos concluir que los miRNAs tienen una función relevante en el inicio y el desarrollo del carcinoma hepatocelular y se plantean como una posible alternativa adecuada para el diagnóstico y el tratamiento del mismo.

6 Bibliografía

References

1. Liu N, Olson EN. MicroRNA regulatory networks in cardiovascular development. *Dev Cell*. 2010 Apr 20;18(4):510-25.
2. Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*. 2009 Jan;19(1):92-105.
3. Schueller F, Roy S, Vucur M, Trautwein C, Luedde T, Roderburg C. The Role of miRNAs in the Pathophysiology of Liver Diseases and Toxicity. *Int J Mol Sci*. 2018 Jan 16;19(1):10.3390/ijms19010261.
4. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2019 Jan;20(1):5-20.
5. Chen X, Liang H, Zhang J, Zen K, Zhang CY. Secreted microRNAs: a new form of intercellular communication. *Trends Cell Biol*. 2012 Mar;22(3):125-32.
6. Hayes J, Peruzzi PP, Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014 Aug;20(8):460-9.

7. Ortiz-Quintero B. Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Prolif.* 2016 Jun;49(3):281-303.
8. Jopling C. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.* 2012 Feb;9(2):137-42.
9. Turato C, Fornari F, Pollutri D, Fassan M, Quarta S, Villano G, et al. MiR-122 Targets SerpinB3 and Is Involved in Sorafenib Resistance in Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Med.* 2019 Feb 1;8(2):10.3390/jcm8020171.
10. Barajas JM, Reyes R, Guerrero MJ, Jacob ST, Motiwala T, Ghoshal K. The role of miR-122 in the dysregulation of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) expression in hepatocellular cancer. *Sci Rep.* 2018 Jun 14;8(1):5.
11. Fornari F, Gramantieri L, Giovannini C, Veronese A, Ferracin M, Sabbioni S, et al. MiR-122/cyclin G1 interaction modulates p53 activity and affects doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res.* 2009 Jul 15;69(14):5761-7.
12. Wang BG, Jiang LY, Xu Q. A comprehensive evaluation for polymorphisms in let-7 family in cancer risk and prognosis: a system review and meta-analysis. *Biosci Rep.* 2018 Jul 31;38(4):10.1042/BSR20180273. Print 2018 Aug 31.
13. Sui ZY, Li J, Cheng GL, Wang SF. A single nucleotide polymorphism in the promoter region (rs10877887) of let-7 is associated with hepatocellular carcinoma in a Chinese population. *Genet Mol Res.* 2016 May 13;15(2):10.4238/gmr.15027661.
14. Jin B, Wang W, Meng XX, Du G, Li J, Zhang SZ, et al. Let-7 inhibits self-renewal of hepatocellular cancer stem-like cells through regulating the epithelial-mesenchymal transition and the Wnt signaling pathway. *BMC Cancer.* 2016 Nov 8;16(1):y.
15. McDaniel K, Hall C, Sato K, Lairmore T, Marzioni M, Glaser S, et al. Lin28 and let-7: roles and regulation in liver diseases. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2016 May 15;310(10):757.
16. Wu L, Nguyen LH, Zhou K, de Soysa TY, Li L, Miller JB, et al. Precise let-7 expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *Elife.* 2015 Oct 7;4:e09431.
17. Shi W, Zhang Z, Yang B, Guo H, Jing L, Liu T, et al. Overexpression of microRNA let-7 correlates with disease progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Medicine (Baltimore).* 2017 Aug;96(32):e7764.
18. Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, et al. Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology.* 2012 Nov;56(5):1946-57.
19. Elton TS, Selemon H, Elton SM, Parinandi NL. Regulation of the MIR155 host gene in physiological and pathological processes. *Gene.* 2013 Dec 10;532(1):1-12.

20. Liao WW, Zhang C, Liu FR, Wang WJ. Effects of miR-155 on proliferation and apoptosis by regulating FoxO3a/BIM in liver cancer cell line HCCLM3. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2018 Mar;22(5):1277-85.
21. Liu F, Kong X, Lv L, Gao J. MiR-155 targets TP53INP1 to regulate liver cancer stem cell acquisition and self-renewal. *FEBS Lett.* 2015 Feb 13;589(4):500-6.
22. Liu H, Cheng L, Cao D, Zhang H. Suppression of miR-21 Expression Inhibits Cell Proliferation and Migration of Liver Cancer Cells by Targeting Phosphatase and Tensin Homolog (PTEN). *Med Sci Monit.* 2018 May 29;24:3571-7.
23. Zhu Y, Tang H, Zhang L, Gong L, Wu G, Ni J, et al. Suppression of miR-21-3p enhances TRAIL-mediated apoptosis in liver cancer stem cells by suppressing the PI3K/Akt/Bad cascade via regulating PTEN. *Cancer Manag Res.* 2019 Jan 22;11:955-68.
24. Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2009 Apr 14;15(14):1665-72.
25. Vojtechova Z, Tachezy R. The Role of miRNAs in Virus-Mediated Oncogenesis. *Int J Mol Sci.* 2018 Apr 17;19(4):10.3390/ijms19041217.
26. Chaturvedi VK, Singh A, Dubey SK, Hetta HF, John J, Singh MP. Molecular mechanistic insight of hepatitis B virus mediated hepatocellular carcinoma. *Microb Pathog.* 2019 Mar;128:184-94.
27. Yang X, Li H, Sun H, Fan H, Hu Y, Liu M, et al. Hepatitis B Virus-Encoded MicroRNA Controls Viral Replication. *J Virol.* 2017 Apr 28;91(10):16. Print 2017 May 15.
28. Li H, Jiang JD, Peng ZG. MicroRNA-mediated interactions between host and hepatitis C virus. *World J Gastroenterol.* 2016 Jan 28;22(4):1487-96.
29. Zhu H, Geng Y, He Q, Li M. miRNAs regulate immune response and signaling during hepatitis C virus infection. *Eur J Med Res.* 2018 Apr 18;23(1):x.
30. Seki E, Brenner DA. Recent advancement of molecular mechanisms of liver fibrosis. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2015 Jul;22(7):512-8.
31. Higashi T, Friedman SL, Hoshida Y. Hepatic stellate cells as key target in liver fibrosis. *Adv Drug Deliv Rev.* 2017 Nov 1;121:27-42.
32. Zhou WC, Zhang QB, Qiao L. Pathogenesis of liver cirrhosis. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21;20(23):7312-24.
33. Elpek GO. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: An update. *World J Gastroenterol.* 2014 Jun 21;20(23):7260-76.
34. Torres S, Garcia-Palmero I, Bartolome RA, Fernandez-Acenero MJ, Molina E, Calvino E, et al. Combined miRNA profiling and proteomics demonstrates that different miRNAs target a

common set of proteins to promote colorectal cancer metastasis. *J Pathol.* 2017 May;242(1):39-51.

35. Wang D, Liu J, Huo T, Tian Y, Zhao L. The role of microRNAs in colorectal liver metastasis: Important participants and potential clinical significances. *Tumour Biol.* 2017 Jun;39(6):1010428317709640.

36. Ding M, Zhang T, Li S, Zhang Y, Qiu Y, Zhang B. Correlation analysis between liver metastasis and serum levels of miR200 and miR141 in patients with colorectal cancer. *Mol Med Rep.* 2017 Nov;16(5):7791-5.

37. Li W, Chang J, Wang S, Liu X, Peng J, Huang D, et al. miRNA-99b-5p suppresses liver metastasis of colorectal cancer by down-regulating mTOR. *Oncotarget.* 2015 Sep 15;6(27):24448-62.