



**FACULTAD DE FARMACIA  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE**

**TRABAJO FIN DE GRADO  
TÍTULO: PAPEL DE LOS ARNs NO  
CODIFICANTES EN EL DESARROLLO DE  
ENFERMEDADES HEPÁTICAS**

Autor: Rivera Cordero, Sandra

Fecha: Julio 2020

Tutor: Óscar Escribano Illanes

1	RESUMEN.....	3
2	ABSTRACT.....	3
3	INTRODUCCIÓN.....	4
4	OBJETIVOS .....	5
5	MATERIAL Y MÉTODOS.....	5
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	5
6.1	Biogénesis miRNAs.....	5
6.2	miRNAs como nuevos biomarcadores en CHC.....	7
6.3	Carcinoma hepatocelular (CHC). .....	8
6.4	miRNAs en CHC. ....	12
6.4.1	<i>miRNAs regulados al alza en CHC.</i> .....	12
6.4.1.1	miR-21.....	12
6.4.1.2	miR-221/222.....	12
6.4.2	<i>miRNAs regulados a la baja en CHC</i> .....	13
6.4.2.1	miR-122 .....	13
6.4.2.2	miR-199 .....	14
6.4.2.3	let-7.....	15
6.5	TRATAMIENTO CON miRNAs.....	16
7	CONCLUSIONES.....	17
8	BIBLIOGRAFÍA.....	17

## **1 RESUMEN**

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA no codificante que regulan negativamente la expresión génica a nivel postranscripcional, mediante la degradación de su mRNA diana o inhibiendo la traducción del mismo. Están implicados en la regulación de diversos procesos celulares al controlar la expresión de los genes que codifican las proteínas, por lo que, la desregulación de estos miRNAs va a dar lugar a múltiples patologías, entre ellas el cáncer.

En este trabajo revisamos algunos de los miRNAs que se encuentran alterados en el carcinoma hepatocelular (CHC), como miR-21, miR-122 o miR-199. Los procesos que regulan estos miRNAs son muy complejos y todavía no se conocen bien los mecanismos por los que actúan. Por tanto, la investigación del papel que juegan los miRNAs en la patogenia del CHC podría revelar nuevos métodos, no invasivos, para el diagnóstico temprano de esta enfermedad, así como, nuevas estrategias terapéuticas.

Palabras clave: microRNA, carcinoma hepatocelular, biomarcadores, tratamiento

## **2 ABSTRACT**

microRNAs (miRNAs) are small non-coding RNA molecules that regulates negatively the postranscripcional genic expression, through mRNA target degradation or inactivating the translation. miRNAs are involved on diverse cellular processes in order to control the expression of pronteins coding genes. So, the disruption of these miRNAs is related to the ethiology of multiple diseases, among others, cancer.

On this research, we review some of the miRNAs that are modified on hepatocellular carcinoma (HCC), like miR-21, miR-122 or miR-199. The job of these miRNAs are complex and not well-known yet. Consequently, the research made about miRNAs' role on HCC pathogenesis could reveal new non-invasive early-stage diagnosis methods, and new therapeutic strategies.

Keywords: microRNAs, hepatocellular carcinoma, biomarkers, treatment

### 3 INTRODUCCIÓN

Los miRNAs son pequeños fragmentos de RNA, de 22 nucleótidos, no codificantes que participan en la regulación postranscripcional. La principal función de estos miRNAs es regular la expresión de genes mediante su unión a mRNAs por complementariedad de bases, para inducir la degradación de estos últimos y reprimir la traducción. En su procesamiento participan dos enzimas principales: Drosha a nivel del núcleo y Dicer en el citoplasma. Se ha visto que la delección de estas enzimas resulta letal en embriones de ratón y además, están involucradas en otros muchos procesos celulares (1,2).

Los miRNAs se identificaron a principios de los años 90, pero no fue hasta diez años después cuando se conoció el papel que jugaban en la regulación de los genes. El primero se encontró en *Caenorhabditis elegans* como un pequeño RNA producido por el gen *lin-4*, y se creyó que eran moléculas de RNA específicas de nematodos. Sin embargo, hoy se sabe que están presentes en prácticamente todas las células eucariotas y que algunos virus también pueden codificar miRNAs. Los miRNAs cumplen distintas funciones en la proliferación celular y desarrollo de los organismos, participando en la regulación de procesos fisiológicos tales como: diferenciación celular, remodelado de tejidos, inflamación, apoptosis, hematopoyesis, modulación de la miogénesis y carcinogénesis, entre otros (2,3,4).

Varios estudios garantizan que los miRNAs controlan la expresión de al menos el 60% de los genes que codifican proteínas, y que aproximadamente el 70% de estos miRNAs fueron descubiertos en el hígado. Dentro de los miRNAs hepáticos el miR-122 es el más importante y supone el 70% del total de miRNAs a nivel del hígado. Regula un gran número de genes implicados en el metabolismo lipídico, diferenciación celular y control del ritmo circadiano a nivel hepático (4).

Una expresión anómala de los miRNAs se asocia con diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer, donde pueden actuar como oncogenes (“*oncomirs*”) o como supresores de tumor. Muchos miRNAs se encuentran en zonas genómicas relacionadas con el cáncer o lugares frágiles, pudiendo sufrir modificaciones por amplificación, delección o traslocación en estas zonas. Conociendo su implicación en los procesos de tumorigénesis y otras enfermedades, se ha planteado su papel como potenciales dianas terapéuticas e innovadores biomarcadores para el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad (2).

El carcinoma hepatocelular (CHC) es considerado el quinto cáncer más frecuente en el mundo, teniendo una tasa de mortalidad muy ligeramente inferior a su tasa de incidencia. Se han encontrado diversos miRNAs relacionados con la regulación del desarrollo y la progresión del CHC, entre ellos tenemos: miR-21, miR-221, miR-222 que van a estar regulados al alza en pacientes con CHC; y el miR-122, miR-199 y la familia let-7, que estarán regulados a la baja en estos pacientes (5,6).

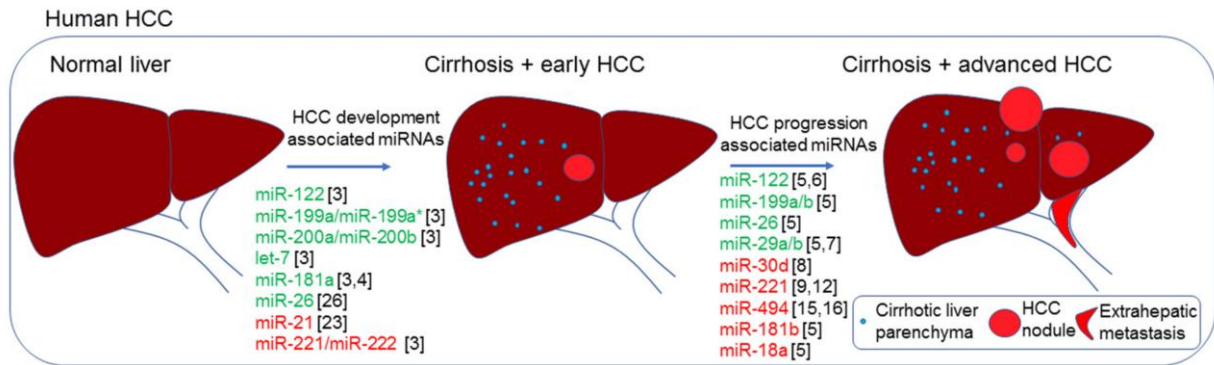


Figura 1. miRNAs desregulados en CHC en humanos (7).

El mecanismo por el que estos miRNAs regulan la expresión de genes es muy complejo, ya que un mismo miRNA puede regular varios transcritos que actúen en diferentes vías celulares, y un mismo mRNA puede estar regulado por múltiples miRNAs. Por ello, es necesario detallar la acción de cada uno de estos miRNAs y los problemas que resultan cuando se alteran sus mecanismos (2).

#### 4 OBJETIVOS

Este trabajo tiene como objetivo realizar una revisión bibliográfica de aquellos miRNAs que tienen mayor implicación en el desarrollo y progresión del carcinoma hepatocelular desde su biogénesis, mecanismo de acción y posibles alteraciones que desencadenan esta patología, así como, la posibilidad de su empleo como nuevos elementos de diagnóstico o dianas terapéuticas.

#### 5 MATERIAL Y MÉTODOS

Para este trabajo se ha realizado una búsqueda bibliográfica en bases de datos como PubMed o SciELO y se han seleccionado aquellas publicaciones escritas en lengua castellana o inglesa.

Los términos de búsqueda que se han utilizado han sido: miRNA, liver cancer, treatment, biomarkers y cada uno de los miRNA que se describen en el presente trabajo.

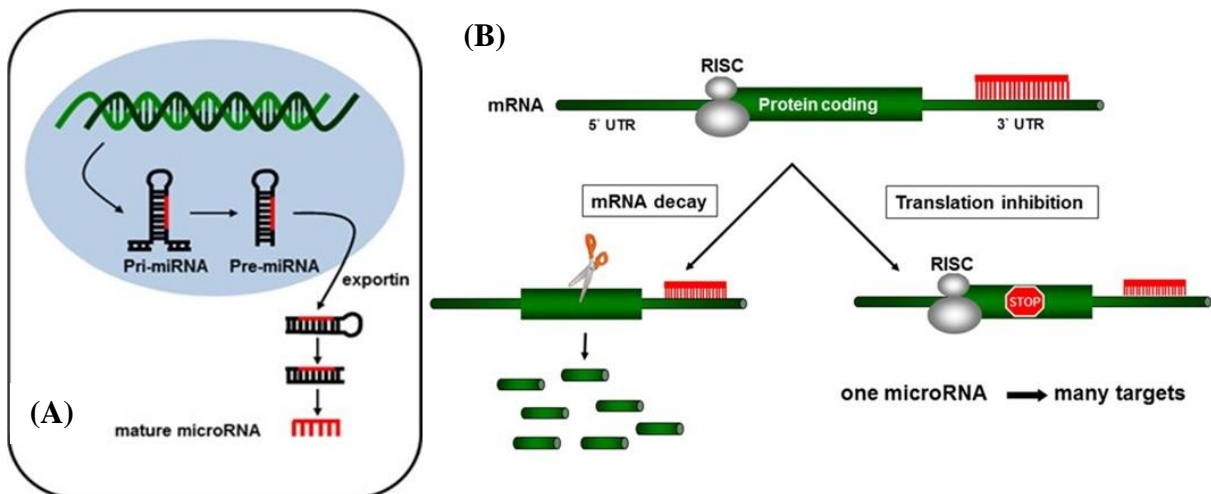
#### 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

##### 6.1 Biogénesis miRNAs.

Los genes de los miRNAs son transcritos por una enzima RNA polimerasa II a partir de una secuencia intrónica, monocistrónica o policistrónica, formándose unos precursores llamados miRNAs primarios (pri-miRNAs). Los pri-miRNA tienen la secuencia de RNA maduro (20-25 nucleótidos) contenida en una horquilla (1).

Sobre estos pri-miRNAs actúa, en el núcleo, el complejo microprocesador formado por la enzima Drosha y la región crítica del síndrome de DiGeorge en el gen 8 (DGCR8). El complejo realiza el primer corte del pri-miRNA cortando por el tallo de la horquilla y libera un pre-miRNA que es exportado al citoplasma por la proteína exportina 5 (EXP5). En el citoplasma, otro complejo procesador formado por la enzima Dicer y sus cofactores reconoce los pre-miRNAs, se une a ellos por un extremo que tiene 3 nucleótidos salientes y los corta formando un miRNA de doble cadena con una longitud de aproximadamente 22 nucleótidos (2,8).

Finalmente, el complejo formado por Dicer y el dúplex de miRNA se une a una proteína Argonauta-2 (AGO2) formando el complejo silenciador inducido por miRNAs (miRISC) que va a seleccionar una de las hebras del dúplex como cadena guía (miRNA maduro) de modo que la otra hebra, llamada cadena pasajera, se disocia y se elimina. La selección de la cadena madura viene determinada por la estabilidad termodinámica de sus extremos, siendo seleccionada aquella hebra cuyos nucleótidos terminales en 5' sean menos estables. Dependiendo del grado de complementariedad de las bases del miRNA maduro con su mRNA blanco, el complejo miRISC originará el corte y posterior degradación del mRNA o inhibirá su traducción mediante dos procesos: desadenilación o bloqueo del inicio de la traducción (2).



**Figura 2. (A)** Vía canónica de biogénesis de microRNAs: el miRNA es transcrito por la RNA polimerasa II formando el pri-miRNA, sobre el cual actúa el complejo microprocesador de Drosha en el núcleo y da lugar al pre-miRNA que es exportado al citoplasma por la EXP5. En el citoplasma Dicer reconoce el pre-miRNA y lo corta formando un dúplex de miRNA de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud. **(B)** Función de los miRNAs: el dúplex de miRNA unido a Dicer se carga en la proteína AGO2 formando el complejo miRISC que corta y degrada su mRNA diana. (8)

La vía canónica es la más común en la biogénesis de los miRNAs. Sin embargo, existen otras vías, no canónicas, en las que se prescinde de la acción de Drosha o de Dicer para su síntesis (1).

## **6.2 miRNAs como nuevos biomarcadores en CHC.**

Tradicionalmente para el diagnóstico del CHC se han utilizado técnicas invasivas, como la biopsia hepática, a pesar de que esta técnica puede desencadenar graves complicaciones en los pacientes y, además, con ella suelen detectarse fases tardías de la enfermedad. También se ha utilizado la alfa-fetoproteína (AFP) sérica junto con técnicas de imagen para el diagnóstico. Sin embargo, la especificidad y sensibilidad de esta técnica es bastante reducida y puede llevar a error, ya que alrededor de un 30% de los casos de CHC no están vinculados a la producción de AFP. Por ello, con el fin de desarrollar nuevas estrategias para el diagnóstico del CHC menos invasivas, se han realizados numerosos estudios centrados en el uso de los miRNAs como potenciales biomarcadores (6,8,9).

Los miRNAs extracelulares van a estar presentes en fluidos corporales como la sangre y la orina. En sangre, los miRNAs presentan una mayor estabilidad a la degradación en comparación con los mRNAs. Esto es así debido a que los miRNAs circulan asociados a proteínas (mayormente a la proteína AGO2), encapsulados en vesículas extracelulares (EVs), unidos a la nucleofosfomina (proteína de unión al RNA, NPM1) o unidos a lipoproteínas de alta densidad (HDL). Existen varios tipos de vesículas: exosomas, micropartículas o cuerpos apoptóticos; aunque lo más probable es que estas vesículas estén formadas por mezclas de varios componentes. Se ha visto que en personas sanas los miRNAs circulan asociados mayormente a la proteína AGO2, mientras que en individuos con patologías aún no está claro el mecanismo de circulación (9).

Hay que tener en cuenta que la compartimentación de los miRNAs en fluidos va a depender del tipo de lesión que presente el individuo. Además, se cree que las vesículas extracelulares incluyen información específica para transferirse desde los fluidos corporales a las células diana donde los mRNAs serán traducidos. Los miRNAs van a poder acceder a la circulación mediante procesos pasivos (derivados de células defectuosas en tejidos inflamados, necróticos o apoptóticos) o por mecanismos activos (mediados por microvesículas). Por lo general, se han identificado patrones únicos de miRNAs expresados en afecciones hepáticas que van variando en función de la progresión y gravedad de la enfermedad. Concretamente, las vesículas extracelulares se han descrito como probables biomarcadores no invasivos de gravedad en hepatitis C crónica o en cirrosis (8,9).

La determinación del perfil de miRNAs en sangre consta de varios pasos: toma de muestras, extracción de RNA, cuantificación y detección. A pesar de la menor sensibilidad de los miRNAs ante desigualdades en su manejo y procesamiento, se ha visto que surgen diferencias en la calidad y cantidad de miRNAs según el método de extracción utilizado. Por ello, surge la necesidad de establecer procedimientos normalizados de trabajo para la recogida de muestras. Lo mismo sucede con los métodos de detección y elaboración de perfiles de miRNAs. Entre ellos, destaca la PCR a tiempo real (qPCR), que es el más empleado en la obtención de perfiles aunque su sensibilidad supone aún un gran desafío. Por otro lado, tenemos los microarrays y la secuenciación de nueva generación que son empleados mayormente para identificar nuevos objetivos (9).

Estudios realizados en tejidos primarios de CHC han revelado que el miR-122 y el miR-199a se encuentran regulados a la baja. En contraposición a esto, los descubrimientos en suero de pacientes con CHC muestran niveles de miR-122 más elevados si se comparan con los de personas sanas y, posteriormente reducidos tras ciclos de tratamiento. Esto puede explicarse debido a la liberación a circulación de miRNAs procedentes de las células tumorales. De la misma forma podría explicarse que miR-15b, miR-21, miR-130b y miR-103 se encuentren sobreexpresados en el suero de individuos enfermos y sufran una gran disminución después de la cirugía. Además, se ha visto que el miR-15b y el miR-130 presentan una sensibilidad y especificidad muy elevadas en la detección del CHC. Otros investigadores informan de la presencia de altos niveles de miR-500 en suero de individuos enfermos, que también disminuyen significativamente tras la cirugía, y bajos valores del miR-92 que aumenta notablemente después de la extirpación del tumor. Sobre muestras de plasma se detectaron perfiles de 4 miRNAs (miR-20a, miR-320a, miR-324-3p y miR-375) con elevada especificidad y sensibilidad para discriminar las lesiones hepáticas no cancerosas del CHC (6,8).

El perfil de los miRNAs se relaciona con la estadificación de tumor TNM (tamaño de tumor, diseminación en tejido próximo, diseminación en ganglios y metástasis), el grado de invasión y la recurrencia, por lo que también se investiga el papel de los miRNAs como biomarcadores de pronóstico y recurrencia del CHC. Por ejemplo, el miR-718 con expresión reducida en los exosomas se ha relacionado con la reaparición de la enfermedad y mayor agresividad de esta tras el trasplante hepático. Valores aumentados de miR-183 y miR-17-5p en tejidos primarios después de la extirpación del tumor se relacionan con un mayor tamaño tumoral, invasión ganglionar y mayor probabilidad de metástasis a distancia. Tomando muestras de sueros se observa que el miR-221 sobreexpresado se asocia con el estadio de la enfermedad, un tamaño de tumor mayor y cirrosis. Al usar muestras obtenidas de tejido primario se advierte la relación entre el aumento de miR-372 y una menor supervivencia del paciente. Sin embargo, el patrón de expresión de miR-223 en estos tejidos, se corresponde con una mayor supervivencia del individuo después del trasplante (8,9).

Considerando que la expresión de miRNAs en suero puede verse afectada por otros trastornos que no estén relacionados con el CHC, quizás deba emplearse la combinación de varios miRNAs como biomarcadores de la enfermedad para simplificar la interpretación de los resultados. Asimismo, la circulación de los miRNAs unidos a proteínas y vesículas puede generar sesgos en el análisis y la interpretación de los resultados, por lo que serían necesarios estudios enfocados a cuantificar patrones de miRNAs unidos a HDL, AGO2 y vesículas extracelulares (9).

### **6.3 Carcinoma hepatocelular (CHC).**

El CHC es la principal forma de cáncer hepático y una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Se estima que causa en torno a 700000 muertes anuales en todo el mundo. Algunos factores de riesgo asociados a esta enfermedad son: hepatitis víricas (hepatitis B y hepatitis C), el consumo crónico de alcohol, la diabetes



mellitus y la obesidad. Son las hepatitis víricas las que se asocian a una mayor morbimortalidad al provocar un daño progresivo en el hígado de los pacientes, que deriva en cirrosis y finalmente CHC. A continuación se explican las diversas causas y mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de esta enfermedad (10).

- Anormalidades genéticas y congénitas. Cepas de ratones han demostrado tener susceptibilidad genética a la cirrosis y el CHC, sin embargo, este hecho no se ha podido confirmar aun en humanos. Si se ha relacionado la tirosinemia hereditaria con un mayor riesgo de CHC, ya que estos pacientes mostraron un rápido desarrollo de cirrosis macronodular, seguida de displasia y, por último, aparición de CHC (10).
- Mecanismos moleculares. El carcinoma puede aparecer tanto en células progenitoras hepáticas como en células maduras, lo que indica la intervención de varios mecanismos (10).

- I. Pérdida de control del ciclo celular. Es una característica común a todas las células cancerosas que lleva a un aumento de la multiplicación celular, generando hiperplasia y la formación del tumor. En situación normal las células hepáticas viven mayormente en fase G<sub>0</sub> del ciclo celular, renovándose paulatinamente. El avance por las sucesivas fases del ciclo celular está mediado por las acciones de ciclinas y quinasas dependientes de ciclinas (Cdk). Por ejemplo, la ciclina D1 es la encargada de la entrada de los hepatocitos en el ciclo celular. Pero esta entrada se puede ver dificultada por moléculas como la familia de inhibidores de la Cdk4 (p15/16/18/19), que se unen a las quinasas Cdk4/6 impidiendo la formación del complejo ciclina-Cdk. Lo mismo ocurre con otra familia de proteínas inhibidoras de la Cdk/quinasa (p21/27/57). Otra vía que controla la entrada al ciclo celular es la regulada por p16/retinoblastoma (pRb). Por tanto, alteraciones que disminuyan la expresión de los genes implicados en su síntesis o que dificulten sus funciones acabarán induciendo la formación de tumores (10).

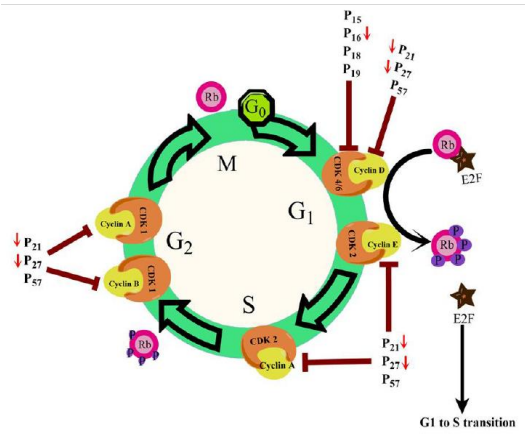


Figura 3. Papel de los inhibidores del ciclo celular en la hepatocarcinogénesis (10).

- II. Pérdida de la senescencia. La senescencia es el proceso que permite la inhibición del crecimiento de las células en respuesta al estrés y daño celular. En hepatocitos no se conoce exactamente su mecanismo, pero se cree que la senescencia controla la replicación celular mediante la disminución del segmento telomérico. La activación de la telomerasa tiene lugar durante la transformación de lesiones precancerosas en CHC. La pérdida de la senescencia asociada a los telómeros se observa con frecuencia en casos de cirrosis. La

transcriptasa inversa de la telomerasa (TERT) no es detectada en hepatocitos sanos, sin embargo, hasta un 90% de los casos de CHC muestra una reactivación de esta.

Además, se han propuesto mecanismos regulados por radicales libres, que son capaces de generar daño en el DNA. La desregulación de los procesos que controlan los daños en el DNA y la regulación del ciclo celular origina una hiperproliferación de las células hepáticas alteradas en la fase de senescencia y su consiguiente transformación a células malignas (10).

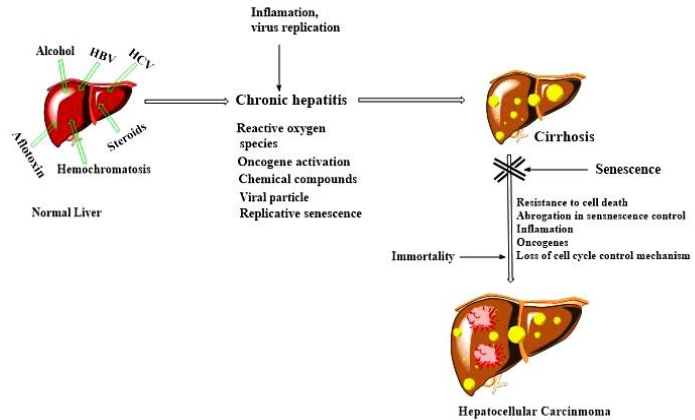


Figura 4. Desarrollo CHC (10).

III. Desregulación de la apoptosis. La apoptosis es el proceso de muerte celular programada. Una de las vías que guían la apoptosis es la vía Fas. Algunas moléculas de esta vía se encuentran alteradas en pacientes con CHC haciendo que los tejidos y células se vuelvan insensibles a su actividad. Durante la cirrosis se estimula la vía TGF $\beta$  para promover la apoptosis mediante la regulación a la baja de Bcl-2. Por otra parte puede actuar el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF2) reduciendo la división de las células por estimulación de la vía TGF $\beta$  y eliminación del IGF2. En CHC se ha detectado una pérdida de IGF2R y, por consiguiente, un aumento de la expresión de IGF2 y de la proliferación celular (10).

IV. Inflamación hepática y hepatocarcinogénesis. Está demostrado que muchas citoquinas inflamatorias, entre ellas, IL-1, IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) participan en la inflamación hepática. Destaca la IL-6, aumentada en los casos de hepatitis por VHB y VHC, hepatitis alcohólicas y esteatohepatitis no alcohólica. La IL-6 sobreexpresada genera una inflamación local en el hígado y la multiplicación de hepatocitos que lleva a la formación de hepatocitos cancerosos. Conjuntamente, la vía del factor de transcripción NF- $\kappa$ B también participa en los procesos inflamatorios. Este factor puede ser activado por las citoquinas inflamatorias, por DNA o RNA bacteriano y vírico o por polisacáridos de patógenos. El dímero formado se incorpora al DNA induciendo la transcripción de genes implicados en la respuesta inmune, la proliferación celular y la supervivencia (10).

- Eventos genéticos y epigenéticos en CHC. Muchas anomalías genéticas se acumulan en los hepatocitos alterando la expresión de determinados genes y provocando el desarrollo de cáncer. Estas alteraciones genéticas pueden provocar la activación de oncogenes o genes supresores de tumores o reprimir las funciones de estos (10).

- I. Inestabilidad cromosómica. Es uno de los sucesos más observados en CHC. Las anomalías cromosómicas van desde amplificaciones o deleciones de pequeños segmentos en los cromosomas, hasta la ganancia o eliminación de brazos cromosómicos completos. Por ejemplo, en pacientes con CHC está amplificada la región del cromosoma 8q24, que contiene oncogenes como c-Myc. También es muy común en CHC la pérdida de la región del cromosoma 1p35-36, en la cual están contenidos muchos supresores de tumores (10).
  
- II. miRNAs circulantes. Algunos miRNAs van a tener como dianas proteínas pro-apoptóticas o van a regular el ciclo celular con el fin de evitar la apoptosis de las células y garantizar su supervivencia en el entorno del tumor. Por el contrario, otros miRNAs se dirigirán a proteínas anti-apoptóticas con este mismo fin. La migración y propagación del CHC está regulada por miRNAs pro-metástasis como el miR-106b (10).

miRNAs	Validated Gene targets	Function of miRNAs	Expression of miRNAs
miR-21	PTEN, RECK, PDCD4	Anti-apoptotic activity, promotes metastasis and invasion	↑↑
miR-106b	E2F1, RhoGTPases, RhoA, RhoC	Promotes cell migration and actin stress fibre formation	↑↑
miR-17-5p	p38, MAPK pathway, E2F-1, c-MYC	Promotes malignancy and metastasis	↑↑
miR-151	RhoGDI, FAK,	Promotes tumour metastasis and invasion	↑↑
miR-122	CyclinG1, ADAM10, SRF, IGF1R, PTTG1, PBF, CUTL1, NDRG3, MDR-1	Responsible for inhibition of virus replication and cell proliferation	↓↓
miR-143	FNDC3B	Promotes tumour metastasis	↑↑
miR-210	VMP1	Promotes hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition	↑↑
miR-29	MEG3, Bcl-2, Mcl-1	Promotion of apoptosis and inhibition of tumour growth	↓↓
let-7	cMyc, p16, Bcl-xl, COLIA2	Inhibit cell growth and proliferation	↓↓
miR-26a	Cyclin D2, Cyclin E2, Cyclin E1, CDK6, IL-6	Inhibit metastasis, invasion and tumour growth	↓↓
miR-221	CDKN1B/p27, CDKN1C/p57, DDIT4, PTEN, Bmf, TIMP3, PPP2R2A	Anti-apoptotic, help in metastasis and tumour growth.	↑↑
miR-1	FoxP1, MET, HDAC4	Inhibition of cell growth and reduced replication potential	↓↓
miR-195	cyclin D1, CDK6, E2F3, LATS2, VEGF, VAV2, CDC42, IKK $\alpha$ and TAB3, TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B pathway	Inhibit metastasis, G1/S transition, angiogenesis and helps in apoptosis.	↓↓
miR-45	OCT4, IRS1, IRS2, IGF signaling, HDAC2	Inhibit cell proliferation, migration, and invasion	↓↓
miR-224	API-5, CDC42, CDH1, PAK2, BCL-2, MAPK1, PPP2R1B.	Promote cell proliferation, migration, invasion, and inhibit cell apoptosis	↑↑

**Figura 5.** Esta tabla recoge algunos miRNAs con expresión anómala y las dianas sobre las que actúan. (10)

## **6.4 miRNAs en CHC.**

### **6.4.1 miRNAs regulados al alza en CHC.**

#### **6.4.1.1 miR-21**

El gen que codifica la expresión del miR-21 se localiza en el cromosoma 17 en los seres humanos, y puede encontrarse en el interior de las células (citósol), en exosomas extracelulares y en órganos (hígado, pulmón, riñón, médula ósea, intestino, tiroides y colon). Este miRNA actúa interaccionando con la región 3' no traducida (UTR) de su diana provocando el silenciamiento de genes a nivel postranscripcional. Se sabe que alrededor de 175 genes implicados en las funciones biológicas y celulares están regulados por el miR-21 (11).

Varios estudios han encontrado una regulación al alza del miR-21 en procesos como inflamación, fibrosis y cáncer. En hígado, el miR-21 activa las células estrelladas hepáticas (CEH) y la producción de colágeno promoviendo la fibrosis hepática. La sobreexpresión en hígado del miR-21 induce la oxidación, el aumento de la síntesis de colágeno y la activación de la angiotensina por varios mecanismos: *Sprouty 1* (*spry1*)/ERK/NF- $\kappa$ B, PTEN/Akt, Smad7/Smad2/Smad3/NADPH oxidasa 4 (NOX4), proteína de muerte celular programada 4 (PDCD4)/ AP-1 (11).

El miR-21 es un oncomir sobreexpresado en masas sólidas malignas en humanos y aparece como factor de supervivencia en casos de lesión hepática y en la progresión del CHC. Estudios recientes muestran valores aumentados de miR-21 en tejidos y suero de individuos con CHC y los vinculan con la progresión del tumor. El miR-21 actúa originando la migración e invasión celular del tumor mediante un bucle de retroalimentación miR-21-PDCD4-AP-1. Además, el miR-21 es capaz de activar la proteína fosfatasa-tensina (PTEN) inhibiendo la vía de señalización de fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K)/Akt que favorece, nuevamente, la progresión de la enfermedad. Por otro lado, el miR-21 exosómico, secretado por las propias células cancerosas, actúa directamente sobre PTEN y activa la vía de la fosfoinositida dependiente de la quinasa-1 (PDK1)/Akt en las CEH, que van a secretar citoquinas angiogénicas como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento transformante- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) que promueven la progresión tumoral (11).

#### **6.4.1.2 miR-221/222**

miR-221/222 están codificados en la región 11.3 del cromosoma X y se vinculan con la regulación de oncogenes y genes supresores de tumores. El miR-221/222 participa en la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular y los procesos de apoptosis. Su expresión anómala en individuos con cáncer hepático promueve la proliferación, la invasión y la metástasis de las células tumorales. Además, preserva la supervivencia de estas células, induce quimiorresistencias y recaídas en los pacientes (12,13).

Diversos autores han demostrado la presencia de altos valores de miR-221/222 en células de CHC, que se han relacionado con la TNM y un bajo tiempo de supervivencia en los pacientes. La sobreexpresión de estos miRNAs está implicada en la aparición y desarrollo del tumor mediante la regulación de diversas moléculas, tales como el inhibidor del ciclo celular p27, la proteína supresora de tumores p53, el factor modificador de Bcl-2 (BMF), la proteína de transcripción 4 inducible por daño en el DNA (DDIT4) o el marcador c-kit. El miR-221 es capaz de inhibir la actividad de p27 y p57 originando un aumento del número de células en fase S del ciclo celular y, por consiguiente, un incremento de la división celular de las células tumorales. Por otra parte, el miR-221 inhibe la DDIT4 e interfiere en la vía mTOR promoviendo la progresión tumoral y el miR-222 juega un importante papel en la modulación de la proliferación de células HepG2 en CHC mediante la disminución de la actividad del p27 (12,13,14).

Un estudio demostró que el miR-221 inhibe la histona desacetilasa 6 (HDAC6), que tiene un importante papel como supresor tumoral. De esta forma, al inhibir la HDAC6, impulsa la proliferación de las células malignas. Se ha observado que en individuos infectados con el virus de la hepatitis B (VHB) el miR-221 actúa sobre el receptor de estrógenos alfa (ER $\alpha$ ) induciendo la proliferación de las células cancerosas en pacientes que han desarrollado CHC relacionado con este virus. Otra diana identificada para el miR-221 es el gen PHF2. El PHF2 es un gen supresor de tumores que actúa activando la proteína p53. El aumento de miR-221 en células y tejidos de CHC hace que disminuya la expresión del gen PHF2 y promueve la migración celular (13,15).

Asimismo, algunos trabajos relacionan el miR-221 con la metástasis tumoral debido a su influencia en la transición epitelial-mesénquimal (EMT, proceso que aumenta la capacidad de migración de las células tumorales) al actuar sobre el receptor de adiponectina 1 (AdipR1) y sobre la señalización de citoquinas 3 (SOCS3) (13).

## **6.4.2 miRNAs regulados a la baja en CHC**

### **6.4.2.1 miR-122**

El miR-122 es el miRNA con mayor expresión hepática y se encuentra ausente en muchos otros tejidos. En el ser humano está codificado en el cromosoma 18, en un único locus genómico. El miR-122 citosólico se encarga de la regulación de la traducción de proteínas involucradas en el metabolismo de los ácidos grasos como son CD3, aldolasa A (AldoA), BCKDK y de genes implicados en la señalización mediada por el interferón (IFN). Además, regula la homeostasis del hierro mediante la represión de la hemocromatosis y la hemojuvelina (16,17).

Se ha observado que la expresión del miR-122 está disminuida en pacientes con CHC en comparación con pacientes sanos. En situación fisiológica, los niveles de este miRNA estarían aumentados ejerciendo un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de las células malignas, ya que es capaz de impedir la proliferación y migración celular, promoviendo la apoptosis en líneas celulares de CHC. Es por ello que bajos

niveles de miR-122 se relacionan inversamente con el grado de diferenciación tumoral, el tamaño del tumor, la probabilidad de metástasis y el pronóstico general del paciente (5,18).

El miR-122 controla la vía de señalización de la vía Wnt/ $\beta$ -catenina, la vía del gen 1 de transformación tumoral de la hipófisis (PTTG1), la ciclina G1, la desintegración de la metaloproteasa 10 (ADAM10) o el factor de respuesta sérica (SRF); por lo que una baja expresión del mismo podría conducir al desarrollo de CHC. Además, se ha demostrado su papel como marcador de lesión hepática en el suero de pacientes con VHB. El miR-122 puede unirse a secuencias conservadas del virus de la hepatitis B y modular la expresión y replicación de los genes del virus, por lo que bajos niveles de miR-122 conllevarían una mayor potencia en la replicación del VHB (5,18).

Algunos miRNAs nucleares pueden suprimir la biogénesis de oncomirs. Es el caso del miR-122 que promueve la apoptosis de las células de CHC al impedir la maduración del oncomir miR-21. Esta función de supresión tumoral es posible porque el miR-122 se une a una secuencia del pri-miR-21 impidiendo su procesamiento a pre-miR-21 (17).

La sobreexpresión de miR-122 además de tener efecto en la supresión tumoral, provoca la sensibilización de las células cancerosas a la acción de la quimioterapia (16).

#### **6.4.2.2 miR-199**

El miR-199 se ha asociado a la aparición, progresión y metástasis de varios tipos de tumores como cáncer de pulmón, intestino o hígado. Su expresión anormal en el hígado se vincula a la aparición y progresión de CHC. Varios estudios coinciden en que los niveles de miR-199 se encuentran disminuidos en el CHC y que la baja expresión de miR-199a-5p revela etapas más avanzadas de la enfermedad, así como, una mayor recurrencia del cáncer tras la extirpación del tumor (5,19).

El miR-199 regula la expresión del factor de transcripción Snail, que modula la expresión de la cadherina E, influyendo en la patogénesis y metástasis del CHC. La disminución de los niveles de miR-199 provoca el aumento del factor Snail que favorece la EMT de las células tumorales y mejora la capacidad de migración de las mismas. Otras dianas del miR-199 son el factor XBP1, encargado de la diferenciación celular hepática y la formación del hígado, y la ciclina D, una proteína reguladora del ciclo celular. En condiciones fisiológicas, miR-199 se une a la región 3'UTR del XBP1 inhibiendo su acción. En CHC al estar disminuido el miR-199 aumentan los niveles del factor XBP1 y se favorece la tumorigénesis. Del mismo modo, la disminución del miR-199 suprime la actividad de la ciclina D dando lugar a la hiperproliferación de las células Hep3B2 (19,20).

Se ha observado que el miR-199a/b-5p es específico del CHC y desempeña su actividad sobre la supresión del tumor. El miR-199a/b-5p inhibe la expresión de ROCK1 a nivel postranscripcional, lo cual conlleva la supresión de las vías

ROCK1/MLC y PI3K/Akt necesarias para la progresión del tumor. Además, el miR-199a se relaciona con la progresión de la fibrosis y altos valores de este inhiben el desarrollo de mediadores proangiogénicos suprimiendo el crecimiento del tumor (5,21).

### **6.4.2.3 let-7**

let-7 fue el primer miRNA identificado en seres humanos. Es una familia de miRNAs formada por 13 miembros localizados en 9 cromosomas diferentes del genoma humano, y se les ha relacionado con la regulación del tamaño corporal de las personas, la regulación de procesos metabólicos y con la capacidad de auto-renovación de las células madre. Algunos miRNAs, como let-7, manifiestan una expresión con regulación espacio-temporal, de tal forma, que la especie madura solo está presente en ciertos momentos del desarrollo. En vertebrados, la familia let-7 está ausente en las primeras fases del desarrollo embrionario, apareciendo en las etapas tardías, cuando las células son inducidas a la diferenciación (22,23,24).

let-7 tiene un papel regulador del ciclo celular. Actúa como supresor tumoral suprimiendo la proliferación y supervivencia de los tumores mediante la regulación negativa de algunos oncomiRs e interfiriendo en el ciclo celular, la diferenciación celular y las vías implicadas en la apoptosis. En líneas celulares de CHC se ha observado que let-7 suprime la proliferación de las células malignas reprimiendo genes que participan en el ciclo celular como la ciclina D2, CDK6 y CDC25 (22,24).

Muchos autores confirman que la presencia de let-7 es reducida en el CHC, de modo que queda inhibida la represión de algunos de sus objetivos tales como RAS, HMGA2, c-Myc y JAK/STAT3, favoreciéndose la tumorigénesis. Además, bajos valores de let-7i encontrados en tejido tumoral y tejido no tumoral adyacente se han relacionado con un mal pronóstico de la enfermedad y una corta supervivencia. Otro miembro de esta familia, let-7a1, que también está disminuido en CHC pero, por el contrario, se encuentra aumentado en cirrosis hepática se ha utilizado como marcador para discriminar estas dos enfermedades con éxito. Y, se ha demostrado que su combinación con la AFP es capaz de detectar CHC inducido por el virus de la hepatitis C (VHC) (22,25).

Estudios realizados en población egipcia con VHC han sugerido que este virus promueve la disminución de la expresión de let-7a1 conduciendo a los pacientes al desarrollo de CHC. Asimismo, se ha visto que la supresión de let-7 mediada por el gen Lin-28B favorece la proliferación celular y la aparición del cáncer. El subtipo let-7f1 presenta elevados valores en etapas tempranas de CHC y disminuye en etapas avanzadas, por lo que podría utilizarse como indicador del estadio de la enfermedad (24,25).

## 6.5 TRATAMIENTO CON miRNAs

En el estudio de terapias basadas en miRNAs se han desarrollado estrategias desde dos perspectivas. Una de ellas basada en el reemplazo de miRNAs, es decir, introducir miRNAs exógenos con el fin de suplir la expresión a la baja que sufren algunos miRNAs en CHC; y otra dirigida a inhibir oncomirs. Con el fin de evitar que estos miRNAs se degraden al introducirse en el organismo, se pueden modificar o conjugar con otras moléculas para mejorar su estabilidad. Por ejemplo, se pueden incluir en partículas lipídicas estables de ácido nucleico (SNALP), en bicapas lipídicas recubiertas con polietenglicol (PEG) o en partículas similares a virus (VLP). Estas últimas no pueden emplearse en todas las aplicaciones previstas ya que son capaces de estimular la respuesta inmune del paciente (26,27,28).

Como hemos visto anteriormente, el miR-21 es un oncomir y al silenciarlo aumenta la expresión de los genes que codifican para PTEN, RECK o PDCD4, lo cual conlleva una disminución de la migración y la invasión de las células de CHC. Un estudio determinó que la degradación del miR-21 inducida con LNA-anti-miR-21 es capaz de prevenir el crecimiento de células HepG2. Otro estudio realizado en modelos de ratón sobre la terapia de reemplazo ha mostrado que el miR-6a, el miR-122 y el miR-124 son capaces de reducir la tumorigénesis y la metástasis del CHC; y por el contrario, la supresión de miR-221 aumenta la supervivencia y disminuye el tamaño del tumor (27,29).

El laboratorio Selaru ha publicado estudios sobre exosomas portadores de miRNAs, y otros autores informan de que exosomas aislados de células estelares hepáticas (LX-2), enriquecidos con miR-335-5p inyectados en xenoinjertos causan una expresión 30 veces superior de miR-335-5p en el tumor y su entorno. Esto origina una atenuación de la proliferación de las células tumorales y un aumento de la apoptosis en estas células (30).

Un nuevo medicamento (MRX34) desarrollado en un liposoma, formulado con una imitación del miR-34, ha demostrado revertir completamente el CHC en modelos de ratón y, actualmente, se encuentran en fase I de estudio en humanos. Por otra parte, hay otro fármaco (MiReven) que se halla en fase preclínica y mimetiza el miR-7. El miR-7 controla la acción de la fosfatidilinositol-3-kinasa (PI3K) reduciendo el tamaño del tumor en estudios *in vitro* e *in vivo* (31).

Muchos investigadores han propuesto el uso de miRNAs en el tratamiento del CHC combinado con otros medicamentos anticancerosos, ya que algunos miRNAs sensibilizan las células tumorales a los agentes quimioterápicos. A pesar de que hay en marcha numerosos estudios sobre miRNAs, existe controversia sobre sus posibles efectos secundarios. Algunos autores defienden que los miRNAs suponen una ventaja de tratamiento, ya que solo están alterados en las células malignas y no afectarían a las células sanas, como ocurre en el caso de la quimioterapia. Sin embargo, otros manifiestan la posible existencia de un efecto “*off targeting*”. Esto quiere decir que como un mismo miRNAs puede estar presente en multitud de células humanas, podría interactuar con otros mRNAs en esas células, a parte de su diana, y provocar la aparición de efectos adversos (28,29,32).



## **7 CONCLUSIONES**

Los miRNAs están fuertemente implicados en la regulación de la expresión génica y, por tanto, van a estar implicados en diversos procesos celulares. Por ello, es importante estudiar su papel en el inicio y progresión del CHC y se plantean como una nueva opción para el diagnóstico y tratamiento de la enfermedad.

Se necesita un mayor conocimiento de las vías celulares en las que están implicados, pero cabe destacar la importancia que tienen como biomarcadores no invasivos para el diagnóstico del CHC. Los miRNAs presentan gran estabilidad en las muestras de fluidos corporales humanos, así como, una gran sensibilidad y especificidad de diagnóstico. Sin embargo, en este campo aún queda mucho por hacer, ya que, no existen protocolos armonizados ni para la toma de muestras ni para el análisis y tratamiento de los datos obtenidos. Por tanto, para el futuro se necesitan más estudios que consigan validar el uso de los miRNAs como biomarcadores de enfermedad.

Por otra parte, debemos reseñar la gran complejidad que presentan los miRNAs expuestos en este trabajo en cuanto a los mecanismos de acción y de regulación implicados en la patogenia del CHC.

Asimismo, se plantea el uso de los miRNAs como nuevas dianas terapéuticas frente al CHC desde dos perspectivas. Una de ellas se centra en suprimir oncomirs, que están aumentados en el CHC, y otra enfocada en el reemplazo de miRNAs supresores de tumores, que se encuentran regulados a la baja en estos pacientes. En este aspecto los estudios publicados hasta ahora se encuentran todavía en fases muy tempranas, y será necesario profundizar en este tema para futuras investigaciones con el fin de solventar las carencias de los mismos.

## **8 BIBLIOGRAFÍA**

1. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):5–20.
2. Pabón-Martínez V. MicroARNs una visión molecular MicroRNA (miRNA) A molecular view. *Rev la Univ Ind Santander Salud UIS.* 2011;43(3):289–97.
3. Gebert LFR, MacRae IJ. Regulation of microRNA function in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2019;20(1):21–37.
4. Ye D, Zhang T, Lou G, Liu Y. Role of miR-223 in the pathophysiology of liver diseases. *Exp Mol Med.* 2018;50(9):128.
5. 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;19(1):261.
6. Gaihouste L, Gómez-Santos L, Ochiya T. Potential applications of miRNAs as

- diagnostic and prognostic markers in liver cancer. *Front Biosci.* 2013;18:199–223. <https://www.bioscience.org/2013/v18/af/4096/fulltext.htm>
7. Fornari F, Gramantieri L, Callegari E, Shankaraiah RC, Piscaglia F, Negrini M, et al. MicroRNAs in animal models of HCC. *Cancers (Basel).* 2019;11(12):1906.
  8. Anwar S, Lehmann U. MicroRNAs: Emerging Novel Clinical Biomarkers for Hepatocellular Carcinomas. *J Clin Med.* 2015;4(8):1631–1650.
  9. Afonso M, Rodrigues P, Simão A, Castro R. Circulating microRNAs as Potential Biomarkers in Non-Alcoholic Fatty Liver Disease and Hepatocellular Carcinoma. *J Clin Med.* 2016;5(3):30.
  10. Singh AK, Kumar R, Pandey AK. Hepatocellular Carcinoma: Causes, Mechanism of Progression and Biomarkers. *Curr Chem Genomics Transl Med.* 2018;12(1):9–26.
  11. Zhang T, Yang Z, Kusumanchi P, Han S, Liangpunsakul S. Critical Role of microRNA-21 in the Pathogenesis of Liver Diseases. *Front Med.* 2020;7:7.
  12. Xie D, Yuan P, Wang D, Jin H, Chen H. Expression and prognostic significance of miR-375 and miR-221 in liver cancer. *Oncol Lett.* 2017;14(2):2305–2309.
  13. Song Q, An Q, Niu B, Lu X, Zhang N, Cao X. Role of miR-221/222 in Tumor Development and the Underlying Mechanism. *J Oncol.* 2019;2019.
  14. Shi SQ, Ke JJ, Xu QS, Wu WQ, Wan YY. Integrated network analysis to identify the key genes, transcription factors, and microRNAs involved in hepatocellular carcinoma. *Neoplasma.* 2018;65(1):66–74.
  15. Fu Y, Liu M, Li F, Qian L, Zhang P, et al. MiR-221 Promotes Hepatocellular Carcinoma Cells Migration via Targeting PHF2. *Biomed Res Int.* 2019;2019.
  16. Jopling C. Liver-specific microRNA-122: Biogenesis and function. *RNA Biol.* 2012;9(2):137-142.
  17. Wang D, Sun X, Wei Y, Liang H, Yuan M, Jin F, et al. Nuclear miR-122 directly regulates the biogenesis of cell survival oncomiR miR-21 at the posttranscriptional level. *Nucleic Acids Res.* 2018;46(4):2012–2029.
  18. Qiao DD, Yang J, Lei XF, Mi GL, Li SL, Li K, et al. Expression of microRNA-122 and microRNA-22 in HBV-related liver cancer and the correlation with clinical features. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2017;21(4):742–747.
  19. Zhang HY, Li CH, Wang XC, Luo YQ, Cao XD, Chen JJ. MiR-199 inhibits EMT and invasion of hepatoma cells through inhibition of Snail expression. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2019;23(18):7884–7891.
  20. Lou Z, Gong YQ, Zhou X, Hu GH. Low expression of miR-199 in hepatocellular

- carcinoma contributes to tumor cell hyper-proliferation by negatively suppressing XBP1. *Oncol Lett.* 2018;16(5):6531–6539.
21. Zhan Y, Zheng N, Teng F, Bao L, Liu F, Zhang M, et al. MiR-199a/b-5p inhibits hepatocellular carcinoma progression by post-transcriptionally suppressing ROCK1. *Oncotarget.* 2017;8(40):67169–67180.
  22. Xie K, Liu J, Zhu L, Liu Y, Pan Y, Wen J, et al. A potentially functional polymorphism in the promoter region of let-7 family is associated with survival of hepatocellular carcinoma. *Cancer Epidemiol.* 2013;37(6):998–1002.
  23. Wu L, Nguyen LH, Zhou K, De Yvanka Soysa T, Li L, Miller JB, et al. Precise let-7 expression levels balance organ regeneration against tumor suppression. *Elife.* 2015;4:e09431.
  24. Nimmo RA, Slack FJ. An elegant miRror: microRNAs in stem cells, developmental timing and Cancer. *Chromosoma.* 2009;118(4):405–418.
  25. Aly DM, Gohar NAH, Abd El-Hady AA, Khairy M, Abdullatif MM. Serum microRNA let-7a-1/let-7d/let-7f and miRNA 143/145 Gene Expression Profiles as Potential Biomarkers in HCV Induced Hepatocellular Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2020;21(2):555–562.
  26. Bimonte S, Leongito M, Barbieri A, Del Vecchio V, Falco M, Giudice A, et al. The Therapeutic Targets of miRNA in Hepatic Cancer Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2016;2016.
  27. Xu J, Li J, Zheng TH, Bai L, Liu ZJ. MicroRNAs in the occurrence and development of primary hepatocellular carcinoma. *Adv Clin Exp Med.* 2016;25(5):971–975.
  28. Borel F, Konstantinova P, Jansen PLM. Diagnostic and therapeutic potential of miRNA signatures in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2012;56(6):1371–1383.
  29. Najafi Z, Sharifi M, Javadi G. Degradation of miR-21 induces apoptosis and inhibits cell proliferation in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(11):530–535.
  30. Gougelet A. Exosomal microRNAs as a potential therapeutic strategy in hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2018;10(11):785–789.
  31. Shibata C, Otsuka M, Kishikawa T, Ohno M, Yoshikawa T, Takata A, et al. Diagnostic and therapeutic application of noncoding RNAs for hepatocellular carcinoma. *World J Hepatol.* 2015;7(1):1–6.
  32. Farra R, Grassi M, Grassi G, Dapas B. Therapeutic potential of small interfering RNAs/micro interfering RNA in hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol.* 2015;21(30):8994–9001.