



FACULTAD DE MEDICINA
UNIVERSIDAD DE CANTABRIA

GRADO EN MEDICINA

TRABAJO FIN DE GRADO

El papel de los miRNAs en el cáncer.

The role of miRNAs in cancer.

Autor: Mikel Gómez Carrillo

Director/es: D. Carlos Martínez Campa

Santander, Septiembre 2018

Resumen	3
Abstract	3
Introducción al microRNA	4
Definición	4
Historia.....	4
Biogénesis y procesamiento	6
Nomenclatura de los miRNA.....	8
MicroRNA en la enfermedad	9
MicroRNAs en cáncer	9
MicroRNAs en enfermedades cardiovasculares	11
MicroRNAs en enfermedades autoinmunes	12
MicroRNAs en enfermedades neurodegenerativas	13
Relación de los microRNAs y el cáncer	15
MicroRNA en el cáncer colorrectal	20
Introducción	20
Diagnóstico	20
Pronóstico	23
Aplicación terapéutica	24
MicroRNA en el cáncer de pulmón	25
Introducción	25
Diagnóstico	25
Pronóstico	27
Aplicación terapéutica	30
MicroRNA en el cáncer de próstata	34
Introducción	34
Diagnóstico	34
Pronóstico	35
Aplicación terapéutica	39
MicroRNA en el cáncer de mama	41
Introducción	41
Diagnóstico, pronóstico y aplicaciones terapéuticas	46
Conclusiones	51
Bibliografía	52

Resumen

Los microRNAs son pequeñas moléculas cuya existencia desconocíamos hasta finales del siglo XX y cuya función en la regulación celular supuso un antes y un después en la visión científica del papel del ADN no codificante de proteínas.

La pérdida de la regulación de los microRNAs puede desencadenar cambios en las vías de señalización celular que a su vez tiene como consecuencia la generación de importantes cambios fenotípicos. De esta manera, su papel en la activación e inhibición de oncogenes y genes de supresión tumoral abre la puerta a su utilización en el diagnóstico, pronóstico y terapia en distintos tipos de cánceres.

Su amplio abanico de actuación en todas las células del organismo dificulta su aplicación terapéutica debido al riesgo de modificar rutas de las células que no consideramos diana. Múltiples investigaciones han empezado a determinar el papel de los microRNAs en los cánceres actuales más prevalentes.

En este trabajo haremos una revisión detallada de la literatura científica con la intención de describir que son los microRNAs y cuál es su papel en el cáncer.

Palabras clave: miRNA, cáncer, oncogén, RNAm.

Abstract

MicroRNAs are small molecules whose existence we did not know until the end of the 20th century and whose function in cellular regulation supposed a before and after in the scientific vision of the role of non-protein coding DNA.

The loss of regulation of the microRNAs can trigger changes in cellular signaling pathways that eventually result in important phenotypic changes. Thus, the role of the microRNAs in the activation and inhibition of oncogenes and tumor suppression genes opens the door to its use in diagnosis, prognosis and therapy in different types of cancer.

Its wide range of action in all the cells of the organism makes its therapeutic application difficult due to the risk of modifying cell routes that we do not consider as targets; in this way, multiple investigations have begun to determine the role of the microRNAs in the most prevalent current cancers.

In this review we will make a detailed compilation of findings from many studies published in the scientific literature with the aim of describing what microRNAs are and what is their role in cancer.

Keywords: miRNA, cancer, oncogén, mRNA.

Introducción al microRNA

Definición

Los microRNA (miRNA) son una clase de RNA endógenos, pequeños (~ 19-24 nucleótidos de longitud) y evolutivamente conservados que funcionan como reguladores postranscripcionales de la expresión génica. Principalmente funcionan al unirse a secuencias diana complementarias en el RNA mensajero (RNAm) e interferir con la maquinaria de traducción, evitando o alterando la creación del producto proteico. Los estudios de seguimiento también revelaron que, además de reprimir la traducción, la unión de miRNA a su RNAm diana también desencadenó el reclutamiento y asociación de los factores de desintegración del RNAm, lo que condujo a la desestabilización del ARNm, la degradación y la disminución resultante en los niveles de expresión [1].

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

Hace dos décadas, tanto la existencia como la importancia de los miRNAs eran completamente desconocidas. Hasta entonces, la comunidad científica estaba centrada en los genes encargados de codificar proteínas. El clásico dogma de que el ADN se transcribe en RNA, que luego se traduce en proteínas, hacía que prácticamente no se prestara atención al estudio de todas las secuencias de nucleótidos no codificadoras para proteínas. Fue en el año 1993 cuando se reveló la importancia de los miRNAs. Pero para llegar al inicio de este descubrimiento deberíamos remontarnos unos 5 años atrás.

Historia

En 1987, Ferguson et al., trabajando en el laboratorio de Robert Horvitz, descubrieron que una mutación supresora en el gen *lin-14* era capaz de revertir el fenotipo de la mutación nula-*lin-4* en el nemátodo *Caenorhabditis elegans*. De hecho, mutaciones nulas en el gen *lin-14* causaban un fenotipo exactamente opuesto de las mutaciones nulas-*lin-4*. Este interesante fenotipo opuesto entre defectos en los genes *lin-4* y *lin-14* indicaba que *lin-4* podría regular negativamente a *lin-14*. En 1989 Ambros y Ruvkun, clonaron el gen *lin-14* y desde este momento, los dos colegas siguieron dos carreras de investigación independientes, centrándose Ambros en el gen *lin-4* y Ruvkun en el gen *lin-14*.

Ambros, junto con Lee y Feinbaum, determinó que el gen *lin-4* debía de estar contenido en un fragmento de 700pb, pero no pudieron encontrar los codones convencionales de

inicio y final. Aun así, introdujeron mutaciones en este fragmento, pero la función lin-4 se mantuvo sin alterar. Por lo tanto, Ambros concluyó que lin-4 no codificaba una proteína. Además, encontraron dos transcritos de lin-4 sorprendentemente pequeños de sólo 61 nt y 22 nt de longitud. Por otra parte, Ruvkun y sus colegas Wightman y Ha encontraron que lin-14 era inhibido a nivel postranscripcional. Los dos grupos compartieron sus datos que aún no estaban publicados, y en junio de 1992, Ambros y Ruvkun llegaron independientemente a la misma conclusión: los pequeños transcritos de lin-4 eran complementarios a una secuencia repetida en el 3'-UTR (UnTranslated Region: región no traducida) del gen lin-14. En diciembre de 1993, Ambros y Ruvkun publicaron en el mismo número de Cell que el pequeño transcrito no codificante de proteínas lin-4 regulaba lin-14 a través de su región 3 UTR. Fue en este momento cuando se dio a conocer a la opinión científica un nuevo mecanismo de regulación celular mediante transcritos no codificantes de proteínas: acababan de descubrirse los microRNA.

Desde entonces, han sido miles de microRNA los que se han identificado en multitud de especies, incluida la humana, y de hecho existen enormes bases de datos que contienen la información de estas secuencias de microRNA. Cabe resaltar la importancia del descubrimiento del segundo microRNA, let-7, el cual demostraba la conservación del microRNA interespecies, por lo que se podría investigar primero en especies animales para después extrapolar los descubrimientos obtenidos a los humanos [2].

M.I. Almeida et al. /Mutation Research 717 (2011) 1-8

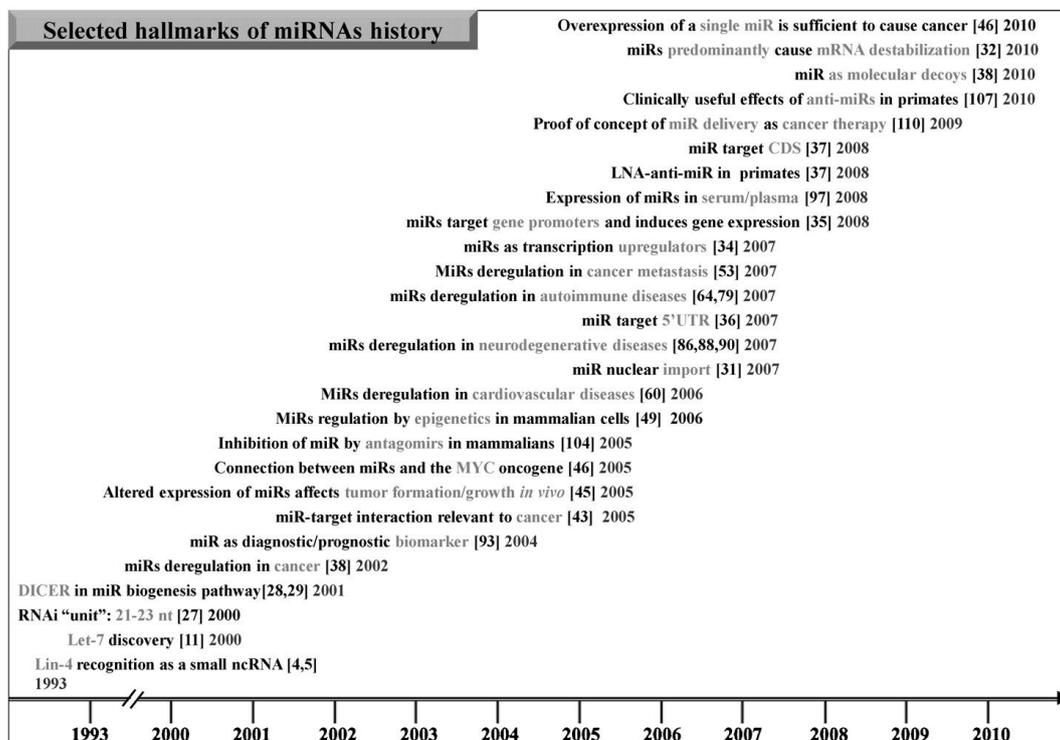


Figura 1.- Perspectiva histórica de nuestro conocimiento sobre microRNA. miR: microRNA; UTR: regiones no traducidas; CDS: secuencias codificantes; LNA: Ácido nucleico bloqueado.

Biogénesis y procesamiento

Los microRNA se transcriben inicialmente como transcritos primarios también conocidos como pri-microRNAs que poseen una caperuza en la zona 5' y una cola de poliadeninas en 3' y se procesan en el núcleo de la célula en estructuras más cortas de unos 70 nucleótidos con forma de "tallo-asa" (stem-loop) llamadas pre-microRNA. En animales este procesamiento es realizado por un complejo de naturaleza proteica llamado Microprocesador, que consta de la enzima con actividad nucleasa DROSHA y la proteína de unión a ARN de doble hélice, PASHA [10]. Los pre-microRNA resultantes son luego procesados a microRNA maduros en el citoplasma mediante la interacción con la ribonucleasa conocida como DICER, que a su vez inicia la formación del complejo RISC (RNA-induced silencing complex) [3]. Este complejo es el responsable del silenciamiento de genes que se observa debido a la expresión de los microRNA y a la interferencia de RNA mediada por siRNAs.

Existen variaciones en la ruta, por ejemplo, las plantas carecen de homólogos de DROSHA; en su lugar, son homólogos de DICER los que realizan algunos de los pasos del procesamiento [4]. La ruta también es diferente para los miRNA derivados de "tallos-asas" procedentes de secuencias intrónicas; en este caso se procesan por DICER, pero no por DROSHA [5]. Tanto la hebra sentido como la anti-sentido del DNA pueden funcionar como molde para producir miRNAs [6].

Una vez generado el pre-miRNA, DICER corta el tallo-asa (stem-loop) y se forman dos moléculas complementarias cortas, pero sólo una se integra en el complejo RISC (la antisentido), como ocurre con los siRNAs. Esta hebra se conoce como la hebra guía, que es seleccionada por la proteína Argonauta, la RNAasa catalíticamente activa en el complejo RISC, en función de la estabilidad del extremo 5' [7]. La otra hebra (la sentido), conocida como anti-guía o hebra pasajera, es degradada por el complejo RISC [8].

Después de su integración en el complejo RISC, ahora, los microRNA se emparejan de acuerdo con su secuencia de bases con la molécula de ARNm complementaria, y en animales, a diferencia con los siRNA, en la mayoría de los casos inducen la inhibición de la traducción de dicho mRNA.

Sin embargo, a pesar de que DICER es una enzima fundamental en el procesamiento de los miRNA, se ha identificado una ruta de biogénesis de estas moléculas independiente de DICER que utiliza la actividad catalítica de corte mediada por Argonauta2 (Ago2). Así, los niveles de algunos miRNA (por ejemplo: miR-451-5', miR-2190-5', miR-2190-3', y miR-735-5') no se alteran en mutaciones que causan la pérdida de función de DICER, pero disminuyen en mutaciones MZago2 (cigótico maternal) como en el caso de miR-451 (un miRNA implicado en la diferenciación de la línea eritroide) [9]. El procesamiento de pre-miR-451 requiere la actividad catalítica de Ago2 in vivo. Las mutaciones MZago2 muestran un retraso en la eritropoyesis que puede rescatarse reintroduciendo mRNAs que codifican para Ago2 silvestre en los embriones de Zebra Fish, o mediante dúplex de miR-451, pero no con Ago2 catalíticamente inactiva. Por ello, se ha sugerido que Ago2

es capaz de generar miRNA funcionales independientemente de Dicer [10]. Resultados similares se han observado en diferentes organismos [11].

No está claro cómo el complejo RISC activado localiza los mRNA complementarios en el interior de la célula. Las proteínas Argonauta, los componentes catalíticos del complejo RISC, están localizadas en zonas específicas del citoplasma denominadas P-bodies (cuerpos-P, o cuerpos citoplásmicos o cuerpos GW, porque contienen la proteína GW182), las cuales son regiones con altas tasas de degradación de mRNA [12]; también se ha detectado actividad miRNA en los cuerpos P [13]. La alteración de los mismos disminuye la eficiencia del proceso de formación de RNAs de interferencia (iRNA), lo que sugiere que los cuerpos P podrían ser un lugar crítico para el procesamiento de los mismos [14]. Sin embargo, estudios posteriores han demostrado que los cuerpos P no son imprescindibles para la formación de iRNA, ya que células carentes de los mismos pueden producir silenciamiento tanto con siRNA como con miRNA [15].

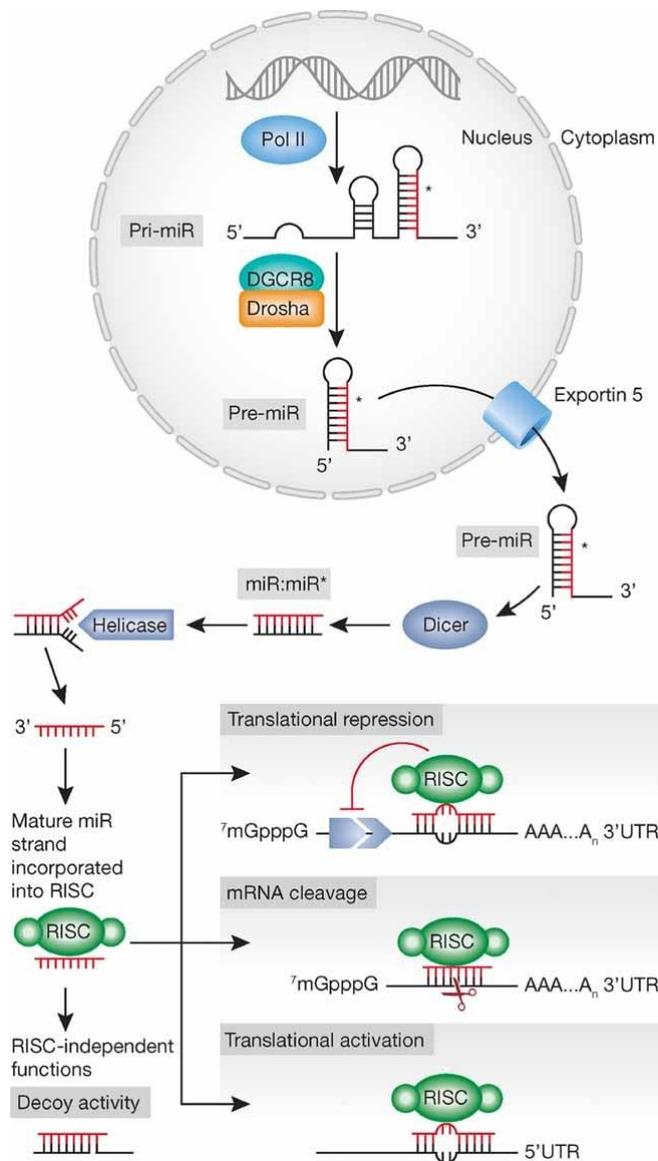


Figura 2.- Biogénesis y mecanismos de acción del microRNA [16].

Nomenclatura de los microRNA

Dado el aumento exponencial de descubrimientos y utilización de miRNAs su nomenclatura se ha convertido en la base para su clasificación. Además de distinguir los miRNA de otros RNAs, la denominación correcta de miRNA es igualmente importante para evitar redundancias o anotaciones erróneas.

Hoy en día, los miRNA maduros se nombran con el prefijo 'miR' seguido de un identificador numérico. Los miRNA animales se distinguen de los miRNA de plantas con el uso de un guion (por ejemplo, miR-14 frente a miR172). Además, los pre-miRNAs de animales se nombran con letra minúscula y cursiva (por ejemplo, *mir-14*). Los nombres de pre-miRNA de plantas diferencian el prefijo 'mir' en mayúsculas y la ausencia del guion (por ejemplo, MIR172). Los miRNA idénticos de diferentes organismos se nombran con el mismo número de identificador excepto un prefijo de tres letras que define el nombre de la especie seguido de un guion (por ejemplo, miR172 en *Triticum aestivum*: tae-miR172 y en *Hordeum vulgare*: hvu-miR172). Los sufijos con letras denotan secuencias de miRNA maduras estrechamente relacionadas expresadas de diferentes precursores o loci genómicos y que son miembros de la misma familia de miRNA (p. Ej., Tae-miR172a, tae-miR172b), y secuencias de miRNA maduras idénticas dentro de una especie se nombran con sufijos numerados después de un 'guion'. Como los genes de miRNA llevan el nombre de su producto de miRNA maduro, la similitud entre los nombres no siempre se refiere a la correspondiente secuencia. En algunos casos, varias especies de miRNA pueden cortarse a partir de un precursor común. Distintas secuencias de miRNA maduras generadas por el procesamiento secuencial del mismo precursor se distinguen con un número después de un punto (por ejemplo, alymiR774a-3p.2: y aly-miR774a-3p.1 u osa-miR159a.1 y osamiR159a.2). Sin embargo, la definición para el uso de sufijos numéricos seguido de un punto es altamente inclusiva ya que el procesamiento secuencial del mismo precursor puede dar como resultado la formación de isomiR, que tienen casi la misma secuencia del miRNA canónico conocido y otros tipos de miRNA extirpados de otra región en el precursor (RNA similar a miRNA) y, por lo tanto, tienen una secuencia divergente. En este caso, mientras que los isomiRs del miRNA canónico tendrán casi la misma secuencia y se nombrarán como miR1-3p.2, los otros miRNA cortados de las distintas partes del precursor se nombrarán como miR1-3p.3 y serán diferentes del miRNA canónico (miR1-3p.1 en este caso) y sus secuencias isomiR. Actualmente, los isomiR se consideran secuencias distintas en la base de datos de miRNAs [17].

MicroRNA en la enfermedad

MicroRNAs en cáncer

En el año 2002 se publicó el primer artículo que sugería un papel importante de los miRNA en el cáncer. En el cromosoma 13q14 fueron localizados miR -15 y miR-16, dándose la circunstancia de que se trata de una región frecuentemente eliminada en la leucemia linfocítica crónica (CLL). Calin et al. descubrieron que ambos genes eran suprimidos o regulados negativamente en más del 60% de las células B en la CLL, lo que indicaba que estos genes se comportaban como supresores tumorales.

Posteriormente, el mismo grupo descubrió que un porcentaje significativo de miRNAs se encontraban en sitios frágiles y en regiones alteradas en cánceres, incluidas las regiones de amplificación o pérdida de heterocigosidad o puntos de interrupción, lo que indicaba que los miRNAs podían desempeñar un papel relevante en la patogénesis del cáncer humano.

Microarrays de oligonucleótidos de miRNA y, más recientemente, la secuenciación profunda (secuenciación de próxima generación) han permitido el análisis de todo el miRNAoma conocido. Además, se han utilizado otros métodos como la citometría de flujo o la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa en tiempo real para evaluar la expresión de miRNAs en tumores y otras enfermedades. En la actualidad, la expresión alterada de miRNAs ha sido descrita en casi todos los tipos de cáncer.

En 2005, se publicaron los primeros trabajos que abordaron el estudio de la función biológica de los miRNAs en el cáncer. Los microRNA pueden actuar como oncogenes (oncomirs) o supresores tumorales y están implicados en la pérdida de la regulación de una gran variedad de vías de señalización en el cáncer. En marzo de 2005, Johnson et al. describieron la primera interacción miRNA-diana con relevancia para el cáncer. Los autores demostraron que en *C. elegans*, let-7 actúa sobre let-60, que codifica para el ortólogo del oncogén humano RAS. Además, mostraron que la expresión de RAS en humanos está regulada por let-7 in vitro. En efecto, la expresión de let-7 disminuye en el cáncer de pulmón en comparación con el tejido normal, y se correlaciona con el aumento de los niveles de proteína RAS detectados en muestras de tumores de pulmón. Cimmino et al. demostraron que miR-15 y miR-16, los primeros dos miRNAs asociados con el cáncer, desempeñan un papel en la regulación de la apoptosis degradando al mRNA del gen anti-apoptótico BCL2. También en 2005, He et al. estudió por primera vez la contribución de miRNAs al desarrollo de tumores *in vivo*. Al sobre expresar el grupo miR-17-22, que está regulado positivamente en el linfoma humano, observaron cómo se aceleraba la linfomagénesis en un modelo de linfoma de células B de ratón portador de oncogén c-myc. Además, O'Donnell et al. demostraron por primera vez que este factor de transcripción, c-myc, modulaba la expresión del mismo grupo de miRNAs y, en consecuencia, la expresión de E2F1. Desde 2005 hasta el presente, cientos de

publicaciones científicas han ido estableciendo el papel de los miRNAs en tumores, así como la regulación de miRNAs por otros factores de transcripción como p53, el guardián del genoma. En 2010, Medina et al. publicaron resultados obtenidos en ratones que sobreexpresaban miR-21 (sin otro tipo de predisposición genética), demostrando claramente que la sobreexpresión de un solo miRNA, específicamente miR-21, era suficiente para producir el desarrollo tumoral. Además, estos autores demostraron que el volumen tumoral y la supervivencia se correlacionaban con el nivel de la sobreexpresión de miR-21 mientras que los tumores regresaban cuando miR-21 se inactivaba, demostrando por primera vez una relación directa entre miRNA oncogénicos y la proliferación de células tumorales.

La pérdida de regulación de microRNAs puede ser causada por varios mecanismos incluyendo la eliminación, amplificación, mutación o alteración de la actividad de factores de transcripción sobre miRNAs específicos. Además, los miRNAs pueden ser controlados por mecanismos epigenéticos. En 2006, Saito et al. fueron los primeros en demostrar que la expresión de miRNAs podría ser controlada por los dos principales mecanismos epigenéticos: la metilación del ADN y la modificación (acetilación) de las histonas. Cuando trataron simultáneamente una línea celular de carcinoma de vejiga humana con 5-aza-2-desoxicitidina (un inhibidor de la metilación del ADN) y 4-fenilbutírico ácido (un inhibidor de histona deacetilasas), descubrieron que 17 de los 313 miRNAs humanos que analizaron estaban sobreexpresados. En particular, miR-127 se sobreexpresó después del tratamiento con estos fármacos lo que suprimió la expresión de una de sus dianas, BCL6. Por el contrario, la expresión de miR-127 estaba reducida en los tumores primarios de vejiga y próstata en comparación con el tejido normal. Por lo tanto, estos autores concluyeron que, en el tejido canceroso, miR-127 está sujeto a un silenciamiento epigenético lo que demuestra la existencia de una conexión entre la epigenética y los miRNAs. Por un lado, mecanismos epigenéticos controlan los miRNAs y a su vez los miRNA regulan los principales procesos clave de la epigenética. Uno de los primeros trabajos que demuestran que la metilación podría ser controlada por miRNAs fue publicado en 2004; Bao et al. encontraron que miR-165/166 son importantes para la metilación del gen PHB en *Arabidopsis*.

En pacientes con cáncer, la metástasis es la principal causa de muerte. El proceso metastásico implica múltiples pasos: motilidad celular, invasión del estroma adyacente, extravasación, diseminación sistémica (ya sea a la sangre o a la linfa), extravasación en el parénquima de tejidos distantes, y finalmente la proliferación en un nuevo sitio, dando lugar al tumor secundario. En este proceso, los miRNA tienen un doble papel, como promotores o inhibidores de la metástasis. El primer hallazgo sobre miRNAs que funcionan como activadores de metástasis fue descrito por Ma et al. El miR-10b regula positivamente la migración celular y la invasión *in vitro* y es capaz de iniciar la invasión tumoral y la metástasis *in vivo*. miR-10b actúa directamente sobre HOXD10, que es un represor transcripcional de RHOC (*Ras homolog gene family, member C*), una pequeña proteína G clave en metástasis. De acuerdo con esto, la expresión de miR-10b está elevada en aproximadamente el 50% de tumores de mama metastásicos en

comparación con tumores sin metástasis o tejidos mamarios normales. De una manera similar, Huang et al. encontraron que miR-373 humano y miR-520c estimulaban la migración e invasión de células cancerosas *in vitro* e *in vivo*.

Por el contrario, otros miRNAs pueden prevenir la metástasis tumoral. Tavazoie et al. publicaron un estudio inicial que indicaba el papel de los miRNAs como supresores de metástasis. En el cáncer de mama, pacientes con bajos niveles de expresión de miR-335, miR-126 y miR-206 tenían un tiempo medio más corto de recaída metastásica. En ratones, la restauración de su expresión en líneas celulares de cáncer de mama disminuyó el número de metástasis. Estos miRNA tienen mecanismos distintos para la supresión de metástasis: La restauración de la expresión de miR-126 suprimía significativamente el crecimiento tumoral, mientras que la restauración de los niveles de miR-335 o miR-206 alteraban la morfología celular, posiblemente relacionada con una disminución en la motilidad celular.

Por lo tanto, no fue sorprendente que Lujambio et al. descubrieran en 2008 que la metilación del ADN asociada al silenciamiento de miRNAs supresores de tumor contribuía al desarrollo de las metástasis y que la reintroducción de miR-148a y miR-34b/c en células cancerosas con inactivación epigenética inhibía su motilidad, reducía el crecimiento tumoral e inhibía la formación de metástasis en modelos de ratones xenotransplantados, con una regulación negativa por parte de los miRNA de algunos genes oncogénicos como C-MYC, E2F3, CDK6 y TGIF2.

MicroRNAs en enfermedades cardiovasculares

En 2005, Zhao et al. informaron que miR-1-1 y miR-1-2 estaban expresados específicamente en células precursoras del músculo cardíaco y esquelético y que miR-1 regulaba los cardiomiocitos ventriculares. En concreto, la sobreexpresión específica de miR-1 en ratones, actuaba sobre el corazón en desarrollo produciendo un descenso de la cantidad de cardiomiocitos ventriculares capaces de proliferar. En el mismo año, Kwon et al. encontraron en *Drosophila* que miR-1 modulaba la cardiogénesis. Posteriormente, Chen et al. en 2006 describieron que miRNA-1 promueve la miogénesis, mientras que miR-133 y miR-1 estimulaban (de vuelta al modelo de ratón) la proliferación de mioblastos. Estos tres trabajos fueron los primeros en sugerir una posible participación de los miRNAs en enfermedades cardíacas humanas. Van Rooij et al. publicaron el primer trabajo en el que se asoció los miRNAs con la insuficiencia y la hipertrofia cardíaca que se producen en respuesta al estrés y al daño, y que se caracteriza por un aumento en el tamaño de los cardiomiocitos sin cambios en el número de miocitos. Empleando microarrays, se identificaron al menos 12 miRNAs que se desregulaban en la hipertrofia cardíaca y el fallo cardíaco. Curiosamente, la sobreexpresión de miR-195 conducía a la insuficiencia cardíaca en ratones y al crecimiento hipertrófico en el cultivo de cardiomiocitos de rata. Varios estudios posteriores demostraron patrones de expresión aberrantes de miRNAs en la hipertrofia

cardíaca y analizaron sus efectos, incluido el de miR-21, el cual es uno de los miRNAs que comúnmente pierde su regulación en el cáncer, sugiriendo que muchas rutas de señalización controladas por los miRNAs están alteradas en multitud de procesos patológicos.

MicroRNAs en enfermedades autoinmunes

La psoriasis es la enfermedad crónica inflamatoria de la piel más prevalente en adultos y la primera enfermedad inflamatoria en la que se descubrió que los miRNAs estaban implicados. En 2007, Sonkoly et al. describieron como el miR-203, que se expresa en queratinocitos, presenta niveles anormalmente altos en la piel afectada por psoriasis en comparación con piel humana sana u otra enfermedad inflamatoria crónica. Curiosamente, miR-203 tiene como diana SOCS-3 (*supresor of cytokine signaling 3*). Anteriormente se había encontrado que la supresión de SOCS-3 conduce a la activación sostenida de STAT3 en respuesta a la interleuquina IL-6 y que la activación constitutiva de STAT3 en queratinocitos conduce al desarrollo espontáneo de psoriasis en ratones. El otro miRNA asociado con la psoriasis es miR-146, sobreexpresado en pacientes que presentan la enfermedad y que está ausente en queratinocitos y fibroblastos dérmicos, pero que se expresa en células inmunes. El hallazgo de niveles anormalmente altos de un miARN asociado con la inflamación no es sorprendente porque los resultados de varios estudios respaldan el papel de un sistema inmune desregulado en la psoriasis. El miR-146 tiene como dianas IRAK1 (*Interleukine-1 receptor associated kinase 1*) y TRAF6 (*TNF receptor associated factor 6*), ambos reguladores de la vía de señalización de TNF-alfa (*Tumor necrosis factor alfa*). Tratamientos que usan agentes anti-TNF tales como infliximab, etanercept y adalimumab son efectivos para la psoriasis. Esto sugiere que los estudios futuros deberían abordar tratamientos con antagomirs miR-203 y miR-146 para pacientes con psoriasis para mejorar su calidad de vida.

La artritis reumatoide (AR) es un trastorno autoinmune sistémico caracterizado por la inflamación crónica del tejido sinovial. En 2008, tres publicaciones informaron por primera vez de la asociación entre artritis reumatoide y miRNAs. Stanczyk et al. encontraron una expresión aumentada de miR-155 y miR-146 en fibroblastos sinoviales y tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide; Un mes después, Nakasa et al. confirmaron la expresión de miRNA-146 en el tejido sinovial de la AR y describió además su inducción por estimulación con TNF e IL-1. En el mismo año, Pauley et al. informaron de una mayor expresión de miR-146 en las células mononucleares de la sangre periférica en la AR, similar a los resultados encontrados en el tejido sinovial/fibroblastos. Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que miR-146 puede usarse como un biomarcador para AR. Además, otros miRNAs han sido implicados en la AR, como miR-155, miR-132, miR16, miR-346 y miR-223.

Para el lupus eritematoso (LES), un trastorno autoinmune caracterizado por la producción excesiva de una variedad de autoanticuerpos contra varios autoantígenos,

hasta el momento se han publicado pocos estudios demostrando alteraciones en los miARN. No obstante, estas moléculas podrían estar implicadas en la etiología de esta enfermedad, y la evidencia sugiere que los miARN son marcadores potenciales de diagnóstico en el LES. Dai et al. describieron por primera vez 16 miRNAs expresados de forma diferente en LES. Estos autores también fueron los primeros en describir 66 miRNAs expresados de forma diferente en pacientes con nefritis lúpica. Varios estudios en 2010 confirmaron el vínculo entre los miRNAs y la nefritis LES/lupus. Dos miRNAs (miR-21 y miR-148a) se sobreexpresan en células T CD4 + de pacientes con lupus. El miR-148a directamente inhibe la expresión de DNMT1 y miR-21 indirectamente regula negativamente la expresión de DNMT1 [*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*] al actuar sobre RASGRP1 [*DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1*], un importante gen autoinmune. Al regular negativamente a DNMT1, ambos miRNAs contribuyen a la hipometilación del ADN en células T CD4 + lúpicas. Te et al. analizaron miRNAs en pacientes con nefritis lúpica de dos grupos raciales (afroamericanos y europeoamericanos) y concluyeron que cinco miRNAs (miR-371-5P, miR-423-5P, miR-638, miR-1224-3P y miR-663) se expresaron de manera diferencial entre los diferentes grupos raciales. Recientemente, Zhao et al. demostraron en pacientes con LES que la expresión de miR-125 se reducía, y en consecuencia la expresión de su diana KLF13 (*Kruppel-like factor 13*), se incrementaba.

Aunque se necesitan más estudios con un mayor número de muestras, estos trabajos que hemos mencionado implican a los miRNAs en la patogénesis de la enfermedad inmune y sugieren que se pueden usar como posibles marcadores de diagnóstico.

MicroRNAs en enfermedades neurodegenerativas

Un número significativo de miRNAs se expresan específicamente en el sistema nervioso central y desempeñan un gran papel en el desarrollo neuronal. En consecuencia, parece natural que los miRNAs se hayan relacionado con enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer, el Parkinson y la enfermedad de Huntington, que son causadas por una muerte neuronal excesiva en el cerebro enfermo. En 2007, se dieron a conocer los primeros estudios que asocian miRNAs con enfermedades neurodegenerativas. Usando células de Purkinje, Schaefer et al. sugirieron una implicación de los miRNAs en trastornos neurodegenerativos al mostrar una neurodegeneración progresiva (degeneración cerebelar y desarrollo de ataxia) en ausencia del componente clave de biogénesis de los miRNA, DICER, que consecuentemente provoca una pérdida progresiva de estas pequeñas moléculas. Lukiw et al. encontraron que miR-9, miR-25b y miR-128 estaban sobreexpresados, y que miR-124a estaba regulado negativamente en muestras de la enfermedad de Alzheimer (región del hipocampo) en comparación con los controles, siendo personas de edades similares. En el mismo año (2007), se demostró que el miR-133b, un miARN importante para la maduración y función de las neuronas dopaminérgicas, se perdía en el tejido del

mesencéfalo en la enfermedad de Parkinson. Los perfiles de expresión de miRNAs para enfermedades neurodegenerativas son desafiantes por dos razones principales:

- 1- Algunos miRNA se expresan específicamente sólo en algunas regiones cerebrales o tipos de células cerebrales;
- 2- A diferencia del cáncer, es mucho más difícil obtener tejido sano y afectado por la enfermedad del mismo paciente, lo que a su vez hace que sea más difícil tener controles apropiados para este tipo de estudios.

Desde 2007, varios trabajos han vinculado las modificaciones de los miRNA a la regulación de proteínas involucradas en estas enfermedades. Aunque los estudios parecen indicar que los miRNAs puede participar en la iniciación o progresión de enfermedades neurodegenerativas, es necesario trabajar más para aclarar si los cambios en la expresión de miRNA contribuyen directamente a la patogénesis de enfermedades neurodegenerativas o si son eventos secundarios causados por vías que han perdido la regulación en estas enfermedades. Se cree que, en los próximos años, una mayor investigación sobre miRNAs conducirá a una nueva visión en este campo [2].

Relación de los microRNAs y el cáncer

El motivo principal por el que sabemos que los miRNA desempeñan un papel importante en el cáncer proviene de estudios funcionales utilizando células cancerosas. Un estudio anteriormente mencionado de Croce y sus colegas mostró que el clúster miR-15a / 16-1 suele estar eliminado en la leucemia linfocítica crónica (LLC), lo que clasifica a estos miRNAs como supresores tumorales. Después de la publicación de este trabajo pionero, han surgido innumerables estudios tratando de establecer el papel de los miRNA en la patogénesis del cáncer. En la siguiente sección, trataremos de hacer un resumen de los conocimientos que existen actualmente acerca del papel funcional de los miRNAs en la tumorigénesis. Comenzaremos definiendo y orientando el papel de los mismos en el cáncer tras lo que profundizaremos de manera exhaustiva en la relación entre distintos subtipos de los cánceres y los microRNAs.

1. "miRNome"

El tema más llamativo en el estudio de miRNAs y cáncer es la gran alteración de la expresión de multitud de miRNAs en células malignas en comparación con las células normales. Todos los tumores analizados han permitido establecer una firma específica de miARN, el "miRNome", que caracteriza el estado maligno y define algunas de las características clínico-patológicas de los tumores (grado, estadio, sexo, edad, agresividad, invasión vascular, índice de proliferación, etc). Los perfiles de miARN de los tejidos tumorales, los orígenes de los tejidos malignos y las diferencias en la expresión de miARN permiten establecer líneas de desarrollo. Por ejemplo, los tumores de origen epitelial presentaron una expresión de miARN diferente de los tumores malignos hematopoyéticos; Los perfiles de miRNA también pueden subdividir las muestras de la leucemia linfoblástica aguda (ALL) en tres grupos principales: uno que contiene todas las muestras positivas para TE/AML1 de t (9; 22) BCR/ABL y t (12, 21); un segundo grupo que contiene muestras de LLA de células T; y un tercer grupo que incluye la predisposición del gen MLL.

2. Regulación descendente global

A pesar de la pérdida de regulación global, la mayoría de los miARN se han encontrado reducidos en los cánceres si los comparamos con sus homólogos del tejido normal, lo cual estaría en relación con la pérdida de diferenciación de las células tumorales. De acuerdo con estas observaciones, la reducción global de los miRNAs mediante la eliminación genética de la maquinaria de procesamiento de éstos favorece la transformación celular y la tumorigénesis *in vivo*. Esto pone de relieve que la alteración de los miARN no es simplemente un efecto de la tumorigénesis, sino que tiene

un papel causal en el desarrollo del cáncer. A pesar de la reducción general de miRNAs en cánceres, varios miRNAs están regulados positivamente, por lo que probablemente desempeñan un papel oncogénico.

3. OncomiRNAs y miRNAs supresores de tumores

Los miRNAs se regulan positivamente o negativamente en tejidos malignos en comparación con la contraparte normal, y se pueden considerar como oncogenes o supresores tumorales, respectivamente. Dado que los miARN tienen una expresión tisular muy restringida, es importante observar que la aparente modulación de miARN en los tejidos cancerosos puede representar la manifestación de una población celular diferente en el tumor en comparación con el tejido normal. Por lo tanto, es esencial establecer el vínculo funcional entre el tumor y la modulación de miRNA. Muchos análisis han destacado el papel causal de gran cantidad de miRNAs en el cáncer mediante el uso de células cancerosas humanas o modelos animales genéticamente modificados. Por ejemplo, la expresión transgénica de miR-155 o miR-21 y la eliminación de miR-15a / 16-1 son suficientes para iniciar linfomagénesis en ratones. Por el contrario, la administración sistémica de miRNAs seleccionados, incluidos let-7, miR-26a, miR-34a y miR-143/145, inhibe la progresión del tumor in vivo.

4. Signos de cáncer

Los miRNA afectan a las seis características de las células malignas; algunos de los ejemplos más conocidos se recogen a continuación:

- 1) Autonomía en las señales de crecimiento (familia let-7)
- 2) Insensibilidad a las señales anti-crecimiento (grupo miR-17-92)
- 3) Evasión de la apoptosis (miR- 34a)
- 4) Potencial replicativo ilimitado (grupo miR-372/373)
- 5) Angiogénesis (miR-210)
- 6) Invasión y metástasis (miR-10b)

5. Redundancia de destino

Un tema recurrente en la biología del miRNA es su redundancia. Los miRNA son genómicamente redundantes. La redundancia también es una característica de la elección de dianas del miRNA. Los miRNAs controlan la expresión de un transcrito “uniéndose con su región de semilla” una región de respuesta a miRNA generalmente localizada en el 3'-UTR del mRNA diana. Cada miRNA está diseñado para reprimir la expresión de miles de mRNAs pero, a su vez, cada mRNA puede ser blanco de varios cientos de miRNAs.

6. Especificidad del contexto

Los miRNA no deberían describirse simplemente como oncogenes o genes supresores de tumores, a menos que se especifique el tipo de tejido o célula involucrado en su acción. De hecho, varios miRNAs se pueden considerarse como oncogenes o supresores de tumores dependiendo de los tipos de células donde se expresen. Por ejemplo, miR-221 y miR-222 pueden neutralizar a un oncogén, c-KIT, e inhiben el desarrollo de la leucemia eritroblástica, funcionando por lo tanto funcionan como supresores tumorales en células eritroblásticas, pero también actúan inhibiendo a cuatro supresores tumorales importantes: fosfatasa y tensina homóloga (PTEN), p27, p57 e inhibidor tisular de metaloproteinasas 3 (TIMP3) y, por lo tanto, en este caso, funcionan como miARN oncogénicos en diversos tumores sólidos humanos.

7. Acortamiento de 3'-UTR

Aproximadamente la mitad de los genes de los mamíferos usan procesamiento alternativo y tienen varios sitios de poliadenilación (APA) para generar múltiples isoformas de mRNAs que difieren en sus 3'-UTR. En los tejidos malignos, los 3'-UTR se acortan con frecuencia mediante la elección de un sitio de poliadenilación alternativo diferente al habitual. Esta reducción de la longitud 3'-UTR puede determinar una pérdida generalizada de la actividad inhibidora de los miRNAs, aumentando la heterogeneidad y la plasticidad de la población de células tumorales. Por ejemplo, la pérdida de la isoforma extendida de Hip2 3'-UTR en células T activadas libera de la regulación negativa mediada por miR-21 y miR-155 en esta transcripción.

8. Actividad de bucle

La participación en ciclos de retroalimentación negativos y positivos es otro mecanismo común de acción de los miRNAs en células cancerosas. Esto está bien ilustrado por miR-146a, que es transactivado por la vía de NF- κ B y se retroalimenta

negativamente en esta cascada de señalización al dirigirse a dos activadores que se encuentran por encima en la ruta como ya hemos mencionado con anterioridad, TRAF6 e IRAK1. Otro ejemplo de acción de bucle de miARN es la transactivación mediada por NF-KB sobre LIN28B, una proteína de unión a ARN, que acelera el recambio de precursores let-7. La inhibición de let-7 dependiente de Lin28B causa la regulación positiva de IL-6, un objetivo let-7, lo que a su vez estimula aún más a NF-kB.

9. "Esponja" de RNA

Se ha formulado la hipótesis de que algunos genes con sitios de unión de miRNAs conservados actúan como dianas en un tipo o condición de célula, pero como agentes secuestrantes de miRNAs ("pseudotargets") en otros tipos o condiciones de células. Recientemente se han descrito transcritos endógenos que parecen actuar como señuelos de miRNAs naturales, llamados "RNAs endógenos competitivos" (ceRNAs). El laboratorio de Pandolfi demostró, mediante el uso de un análisis informático integrado y un proceso de validación experimental, que algunos de estos ceRNAs están regulados por el mismo conjunto de miRNAs que regulan PTEN y tienen perfiles de expresión similares a PTEN. El descenso de dos ceRNAs, VAPA y CNOT6L, dio como resultado niveles reducidos de PTEN. Es importante destacar que el vínculo entre PTEN, VAPA y CNOT6L se perdió en las células que tenían un procesamiento de miRNA defectuoso, lo que indica que esta red reguladora funciona al afectar a los miRNAs que son capaces de unirse a un conjunto específico de mRNAs.

10. miRNAs circulantes

Un nuevo aspecto intrigante de la biología de los miRNAs es su presencia en numerosos fluidos corporales, que incluyen suero, plasma, saliva, orina y líquido amniótico. Los miRNAs en suero se correlacionan con la presencia de neoplasias malignas hematológicas y tumores sólidos y se ha publicado que pueden ser útiles para la detección temprana de varios tipos de cáncer, precediendo al diagnóstico por métodos convencionales. La investigación activa se centra principalmente en la comprensión del proceso de liberación y función de miRNA. Los miRNAs se secretan de las células como complejos de lipoproteínas, pequeñas vesículas membranosas conocidas como exosomas. Se ha descrito que la mayoría de los miRNAs no vesiculares están presentes en el plasma como complejos de ribonucleótidos Ago2, lo que sugiere complejos de silenciamiento inducidos por miRNAs funcionales. Aún se desconoce cómo se seleccionan los miRNAs para ser secretados. Recientemente se informó que la fracción vesicular de miRNAs interactúa con los receptores similares a Toll de las células inmunitarias para estimular la producción de citocinas inflamatorias prometastáticas e inducir los procesos inflamatorios pro-tumorales. En este escenario, los miRNAs circulantes pueden actuar como señales para la activación del receptor, una función que

es completamente independiente de su papel convencional en la regulación génica postranscripcional [18].

En esta revisión hemos tratado de recopilar la información que demuestra la relación directa entre los microRNAs y multitud de cánceres diferentes. Como ejemplos utilizaremos algunos de los cánceres más prevalentes como son el cáncer colorrectal, el pulmonar, el cáncer de próstata y el cáncer de mama. Hablaremos de las alteraciones que se producen en ellos y como estos cambios se pueden utilizar para establecer un diagnóstico, aventurar un pronóstico e incluso crear terapias que bien solas, o bien en colaboración con las actuales aumenten la supervivencia de los pacientes.

MicroRNA en el cáncer colorrectal

Introducción

El cáncer colorrectal es uno de los tumores malignos más comunes del tracto gastrointestinal en el mundo. De hecho, según los datos publicados en REDECAN en el año 2015 el cáncer más frecuente en la población española fue el cáncer de colon-recto con una incidencia de 41.441 nuevos casos globales, si bien en el hombre el más diagnosticado fue el cáncer de próstata y en la mujer el de mama [19].

A pesar de que muchos estudios intentan establecer medidas más efectivas para el diagnóstico y pronóstico del cáncer colorrectal actualmente el diagnóstico y tratamiento dependen principalmente de los resultados de las pruebas de imagen o la biopsia del tumor. Esta forma de trabajar con el cáncer colorrectal nos pone de manifiesto la dificultad para distinguir entre pacientes con bajo riesgo y pacientes con alto riesgo. Por lo tanto podríamos estar utilizando tratamientos inadecuados o innecesarios.

En la actualidad entender la patogenia biológica del CCR y descubrir nuevos biomarcadores específicos para un diagnóstico precoz se ha convertido en algo esencial. Para responder a estas demandas se ha comenzado a estudiar los microRNAs y su asociación con el cáncer colorrectal.

Diagnóstico

Varios artículos recientemente publicados indican que existe una diferencia de expresión de los microRNAs entre los tejidos normales, y los del cáncer colorrectal. En la tabla 1 vemos los microRNA asociados al cáncer colorrectal y sus dianas. Por ejemplo, miR21 es un tipo de miRNA carcinogénico, que estaría sobreexpresado en etapas avanzadas del cáncer de colon. Por otro lado, la expresión reducida de algunos microRNAs, como el miR-1 o miR-30a-5p ha sido determinada en el cáncer colorrectal, (por lo que se les ha catalogado como anticarcinogénicos).

miRNA	Forma de actuación	Gen diana
Let-7	Reducido	KRAS
miR-1	Reducido	
miR-15B	Sobreexpresado	
miR-17-92 clúster	Sobreexpresado	E2F1
miR-18a	Reducido	
miR-21	Sobreexpresado	PDCD4,RhoB
miR-22	Reducido	HIF-1alfa, VEGF
miR-24	Reducido	DHFR
miR-28-3p	Reducido	NM23-H1
miR-28-5p	Reducido	CCND1, HOXB3
miR-29a/c	Reducido	
miR-30a-5p	Sobreexpresado	DTL
miR-31	Reducido	
miR-93	Reducido	BAMBI, CCND2,CDKN1A, HDAC8, KIF23, MAP3K11,MYCN,PPARD, TLE4, ZDHHC1
miR-95	Sobreexpresado	SNX1
miR-101	Reducido	COX2
miR-122a	Reducido	APC/beta- catenin
miR-126	Reducido	PI3K
miR-133b	Reducido	MET
miR-135a/b	Sobreexpresado	APC
miR-143	Reducido	KRAS, DNMT3A, ERK5
miR-145	Reducido	OCT4, SOX2, KLF4,IRS-1
miR-148b	Reducido	CCK2R
miR-181b	Sobreexpresado	
miR-191	Sobreexpresado	
miR-192	Reducido	
miR-195	Reducido	Bcl-2
miR-200c	Sobreexpresado	
miR-203	Reducido	
miR-211	Sobreexpresado	CDKN1C/p57
miR-215	Reducido	DTL
miR-342	Reducido	DNMT1
miR-365	Reducido	CyclinD1, Bcl-2
miR-375	Reducido	
miR-451	Reducido	MIF
miR-499-5p	Sobreexpresado	FOXO4 y PDCD4
miR-675	Sobreexpresado	RB

Tabla 1.- MicroRNAs alterados en el cáncer colorrectal

miRNA plasmático

El antígeno carcinoembrionario (CEA) es el único marcador molecular en el suero o en el plasma en el cáncer colorrectal. Sin embargo, la baja especificidad y sensibilidad hacen que no sea muy útil para el diagnóstico precoz. Debido a que la carcinogénesis está estrechamente relacionada con la expresión anormal de miRNAs, diferentes tumores poseen su propio nivel aberrante específico de miRNA y algunos de estos son secretados a la sangre.

En consecuencia, algunos estudios proponen la idea de que parte de los miRNAs secretados a la sangre podrían ser biomarcadores para el diagnóstico del cáncer colorrectal. Krohl et al. utilizaron microarrays de miRNA y PCRs cuantitativas para identificar miRNA expresados diferencialmente en el cáncer colorrectal. Otros estudios demostraron que existían niveles altos de miR-17-3p y miR-92a que estaban estrechamente relacionados con el CCR y su nivel disminuyó significativamente en los pacientes tras ser sometidos a cirugía. Estos resultados confirmaban que las células del CCR podrían secretar a la sangre cantidades anormales de miRNAs. Además, la investigación reveló que la sensibilidad en el diagnóstico de CCR con miR-92a era cercana al 90% y su especificidad al 70%, y podría usarse como marcador para diferenciar el cáncer colorrectal de la enfermedad inflamatoria intestinal y otros cánceres gastrointestinales. El estudio de Huang et al., confirmaba lo expuesto anteriormente y además demostraron que el 80% de los microRNAs encontrados también estaban presentes en el suero de pacientes con cáncer de pulmón, así que solo unos pocos microRNAs parecen ser específicos del cáncer colorrectal. Este trabajo hizo que se especulara con que algunas expresiones aberrantes de miRNAs podrían deberse a otras fuentes inducidas por los tumores como por ejemplo las células inmunes. Un trabajo de Wang et al. intentó encontrar niveles de expresión diferencial entre pacientes con cáncer colorrectal y sanos, llegando a la conclusión de que miR-601 y miR-760 podrían ser marcadores potenciales para el diagnóstico precoz del CCR.

miRNA fecal

En los últimos años, las heces se han utilizado como una prueba no invasiva para el diagnóstico de CCR. La prueba de sangre oculta en heces es actualmente la prueba de cribado más ampliamente utilizada. Sin embargo, la hemorragia colorrectal irregular conduce a una baja especificidad y sensibilidad de la prueba. Muchas situaciones pueden causar sangrado gastrointestinal. Debido a esto, algunos tumores mayores de 1cm no pueden ser diagnosticados mediante la prueba de sangre oculta en heces.

Algunos estudios han descrito la recogida en las heces de células epiteliales colónicas que provenían del tumor y del intestino. En teoría deberían contener grandes cantidades de información genética y epigenética. Sin embargo el ambiente interno de las heces es muy complejo y peor que en el suero o plasma.

En 2009, Ahmed et al. intentó aislar y seleccionar biomarcadores de miRNA de cáncer colorrectal a partir de muestras fecales. En su estudio se utilizó un nuevo procedimiento de detección de microRNA fecal, que incluía la separación de heces, la extracción de miRNAs y el análisis cuantitativo de los mismos. Sus resultados revelaron que entre pacientes sanos o con una colitis ulcerativa y los pacientes con cáncer colorrectal se podían encontrar expresiones diferenciales de miRNAs. Además, la prueba también permitía diferenciar las diferentes etapas de Dukes del cáncer colorrectal. Sin embargo, probablemente debido a que el tamaño muestral del estudio era pequeño, no se

observó significación estadística de biomarcadores de miRNA del cáncer colorrectal. Ahlquist et al. especularon que las primeras células tumorales fecales en el cáncer colorrectal y la mayoría de los marcadores moleculares tumorales tenían más probabilidades de detectarse en sangre. Las pruebas de microRNA fecal aportaron resultados prometedores en el screening de lesiones precancerosas del CCR, por lo que aunque estos biomarcadores aún se encuentran en una fase inicial de investigación, parece que en un futuro próximo podrán utilizarse como biomarcadores diagnósticos.

Pronóstico

Los pacientes operados de cáncer colorrectal tienen un riesgo alto de recurrencia local posoperatoria a pesar de los avances en las técnicas quirúrgicas. Actualmente, cada vez más instituciones están utilizando microRNAs como marcadores pronósticos para pacientes con cáncer colorrectal. Algunos estudios preclínicos y clínicos han demostrado que algunos miRNAs con expresión claramente diferencial podrían usarse para el pronóstico. Por ejemplo, el miR-21 se consideró un importante marcador molecular de pronóstico. Slaby et al. encontraron que la sobreexpresión de miR-21 en pacientes con CCR estaba estrechamente relacionada con metástasis y ganglios linfáticos positivos. Posteriormente dos equipos de investigación intentaron identificar marcadores moleculares de miRNA colorrectales de distintos grupos étnicos y distintas regiones. Schetter et al, encontraron 37 miRNAs con expresiones anormales que podrían ser utilizados en el pronóstico del CCR. El resultado mostró que había 5 microRNA que estaban más altamente expresados (miR-20a, miR-21, miR-106a, miR-181b y miR-203) y que se correlacionaban con una tasa baja de supervivencia. Otros estudios revelaron que el mal pronóstico de los pacientes asiáticos con cáncer colorrectal se correlacionaba con niveles elevados de miR-21. Kulda et al confirmaron que un alto nivel de miR-21 en estadios tempranos además estaba relacionado con un intervalo libre de enfermedad más corto, pero no estaba relacionado con la supervivencia general.

Otro microRNA destacable es el miR-31 el cual es un factor importante que controla las metástasis tumorales y se expresa anormalmente en los tejidos del cáncer colorrectal. El estudio de Bandres et al. mostró que la expresión de miR-31 era significativamente mayor en pacientes en fase IV que en fase II. Wang et al. confirmaron que la expresión de miR-31 estaba estrechamente relacionada con la fase de CCR y su nivel de invasión local. En 2007, Lanza et al. demostraron la asociación de microRNA y microsatélites en múltiples tumores. Schepeler et al. analizaron 49 muestras de pacientes clínicos con CRC TNM fase II, y encontraron que miR-142-3p, miR-212, miR-151 y miR-144 podrían ensamblarse para producir la inestabilidad significativa de microsatélites tumorales (MSI). Un estudio posterior demostró que 17 miRNAs podían diferenciar el subtipo de estabilidad de microsatélites (MSS) de la metástasis de CCR y el estado de recurrencias con un 81% de precisión, un 77% de sensibilidad y un 83% de especificidad. En estos 17 miRNAs, los altos niveles de expresión de miR-320 y miR-498 estaban estrechamente

relacionados con una mayor supervivencia libre de progresión (SLP) en pacientes con CCR. Posteriormente, Earle et al demostraron que la sobreexpresión de miR-92, let-7A, miR-145 se asociaba con baja inestabilidad de microsatélites (MSI-L), mientras que los niveles de expresión elevados de miR-155, miR-223, miR-31 y miR-26b se asociaron con alta inestabilidad de microsatélites (MSI-H).

Aplicación terapéutica

En la actualidad, la terapia adyuvante basada en el medicamento fluoro-uracilo ha sido muy utilizada en el tratamiento para pacientes con CCR. Los estudios demostraron que los niveles de expresión de miR-181b y let-7g fueron relativamente bajos en pacientes con CRC que responden a la cuarta generación de medicamento con fluoro-uracilo S-1. Sin embargo, miR-181b y let-7g no permiten predecir el tiempo de supervivencia de los pacientes con CCR. Song et al. encontraron que miR-215 podría estimular la expresión del gen p53 y p21 del ciclo celular, a través de la regulación negativa de los homólogos dentados (DTL). Además, miR-215 también indujo la inhibición de la proliferación celular en la fase G2 y sensibilizó a las células HCT116 resistentes a los fármacos metotrexato (MTX) y raltitrexed (TDX). Sin embargo, el miR-215 no tuvo efecto sobre el cisplatino y la adriamicina. El estudio indicó además que las células madre de CRC tenían un alto nivel de miR-215, aunque el miR-215 estaba regulado negativamente en pacientes con CRC.

Cetuximab es un anticuerpo monoclonal para el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), que se puede usar para tratar el CCR metastásico de tipo silvestre (KRAS). Ragusa et al. demostraron que miR-146b-3p y miR-46-5p eran más abundantes en CCR metastásico mutante para KRAS que en los de KRAS de tipo silvestre. También propusieron que niveles bajos de let-7b, let-7e y altos de miR-17-3p podrían ser predictores para el tratamiento combinado con cetuximab más quimioterapia convencional.

Algunos miRNAs pueden estar involucrados en la regulación de la sensibilidad a la radiación. Por ejemplo, Svoboda et al. demostraron que la quimiorradioterapia con capecitabina (TRC) en pacientes con cáncer rectal indujo una inhibición de los niveles de miR-125b y miR-137 y una regulación positiva de miR-125b y miR-137, que se asociaron con un efecto terapéutico deficiente [20].

MicroRNA en el cáncer de pulmón

Introducción

A pesar de los rápidos avances en el desarrollo de fármacos y procedimientos quirúrgicos, el cáncer de pulmón es la principal causa de muerte por cáncer en todo el mundo tanto en hombres como en mujeres, con una estimación de 1,4 millones de muertes cada año. Se estima que aproximadamente el 15% de los pacientes con cáncer de pulmón tendrá una supervivencia de 5 años desde el momento del diagnóstico. La naturaleza alarmante de estos números se destaca aún más por el hecho de que la muerte por cáncer de pulmón es mayor que los siguientes tres cánceres más comunes combinados, incluidos el cáncer de colon, mama y próstata. Esto se debe en gran parte al hecho de que el cáncer de pulmón generalmente no se diagnostica hasta una etapa avanzada. El Gold standard para la clasificación del cáncer de pulmón era la histopatología de rutina; sin embargo, tenía muchas limitaciones. Este problema se magnifica aún más en los casos en que hay una pequeña cantidad de muestra para el diagnóstico, que dificulta la obtención de un número adecuado de células tumorales con la arquitectura tisular deseada. Aunque la inmunohistoquímica logró una mayor precisión de clasificación, tenía limitaciones, que varían desde incoherencias técnicas, heterogeneidad tumoral, hasta falta de especificidad y sensibilidad de cada marcador individual. Esto destaca la necesidad de una herramienta de detección y diagnóstico más fiable y no invasiva para el cáncer de pulmón, los microRNAs [21]. Los miARN implicados en el cáncer de pulmón tienen la capacidad de regular la tumorigénesis, la supervivencia, la angiogénesis y la migración e invasión del tumor [22].

Diagnostico

Recientemente, muchas investigaciones han demostrado la pérdida de regulación global de miRNAs en el cáncer de pulmón. Sin embargo, sigue habiendo una falta de consenso entre estos estudios, tal vez debido a las diferencias en el tipo de muestra, la preparación y el método de identificación y análisis de miRNA. A pesar de los problemas de reproducibilidad, los perfiles de miRNA de los tejidos pueden servir como indicadores y herramientas importantes para clasificar los subtipos de cáncer de pulmón y distinguir los tumores pulmonares primarios de los metastásicos (Tabla 2). Por ejemplo, la expresión de miR-205 distingue de manera única al NSCLC (cáncer de pulmón de células no pequeñas) escamoso del no escamoso, incluso en tumores poco diferenciados. Esto es de particular relevancia clínica ya que el cribado de miR-205 proporciona un mecanismo para distinguir el tipo histológico en pacientes que tienen tejido limitado disponible para el diagnóstico o en los casos en que el grado de diferenciación y heterogeneidad impide el diagnóstico. Distintos patrones de miRNAs también pueden definir el tejido de origen. Los miRNAs miR-182 y miR-126 tienen

niveles característicamente opuestos en tumor primario frente a metástasis de pulmón de diferentes órganos. Además, miR-592 y miR-522 permiten diferenciar los tumores pulmonares primarios de la metástasis del cáncer de colon en el pulmón.

Sin embargo, el verdadero potencial de los miRNAs reside en su presencia y estabilidad en los fluidos biológicos. Los miRNAs circulantes pueden reflejar el tumor de origen y, por lo tanto, sirven como nuevos biomarcadores no invasivos para el diagnóstico precoz del cáncer de pulmón y la estratificación del riesgo de los pacientes. Un análisis retrospectivo de miRNA en plasma de pacientes inscritos en el ensayo MILD aleatorizado (Detección pulmonar italiana multicéntrica) reveló un rendimiento diagnóstico significativo para la detección temprana del cáncer de pulmón. Para su análisis, los investigadores desarrollaron un algoritmo clasificador de patrón de miRNAs (MSC) específico que permite clasificar a los pacientes en riesgo bajo, intermedio y alto de cáncer basándose en un valor de relación de corte predefinido de 24 miRNA identificados a partir de un grupo de prueba anterior. Luego, se examinó a cada grupo para detectar la presencia de cáncer de pulmón, la muerte y el estadio tumoral. El rendimiento diagnóstico se comparó entre los grupos de riesgo MSC y LDCT. Los grupos de riesgo de MSC se asociaron con tasas de supervivencia a 3 años significativamente diferentes y tenían sensibilidad y especificidad similares a las LDCT. Sin embargo, las combinaciones de las dos técnicas dieron como resultado una reducción de cinco veces de la tasa de falsos positivos LDCT. Por lo tanto, los autores concluyeron que MSC podría complementar el cribado LDCT. Además, un pequeño conjunto de miRNAs plasmáticos permiten diferenciar entre el cáncer de pulmón y los nódulos benignos, ofreciendo a los médicos un enfoque no invasivo para identificar los cánceres de pulmón tempranos y evitar la cirugía innecesaria en pacientes con nódulos benignos. La aplicabilidad clínica de estos miRNAs debe validarse en una cohorte mayor, pero refuerza el uso de miRNAs circulantes para el diagnóstico y la estratificación del riesgo de pacientes con sospecha de cáncer de pulmón.

microRNA	Diagnostico
miR-205	Cáncer de pulmón vs Normal Adenocarcinoma vs Escamoso
miR-21	Cáncer de pulmón vs Normal Adenocarcinoma vs Escamoso
miR-7	Cáncer de pulmón vs Normal
miR-200	Cáncer primario vs Metástasis
miR-126	Cáncer primario vs Metástasis

Tabla 2.- MicroRNAs como biomarcadores diagnósticos para el cáncer de pulmón

Pronóstico

Los cánceres de pulmón, incluso cuando se diagnostican en una etapa temprana, tienen una alta incidencia de recurrencia en comparación con los cánceres de mama o próstata. Este hecho se debe a la heterogeneidad molecular que existe entre los tumores en etapa inicial. Las quimioterapias preoperatorias y adyuvantes solamente proporcionan beneficios modestos para los pacientes y presentan muchos efectos secundarios, por lo que se necesitan biomarcadores para predecir qué pacientes pueden beneficiarse más de las terapias adicionales.

Los miRNAs se asocian con mutaciones de genes relacionados con el inicio del cáncer de pulmón, incluyendo EGFR, ALK y Ras, así como los supresores de tumores PTEN y p53, controlando de esta manera numerosas vías biológicas que dirigen el comportamiento del tumor (Tabla 3). Desafortunadamente, los avances en terapias dirigidas como el inhibidor de la tirosina quinasa EGFR son solo efectivos en pacientes que albergan mutaciones específicas y los tumores a menudo desarrollan multitud de alteraciones génicas que resultan en un tumor más agresivo y resistente a la terapia. En la era moderna de la terapia personalizada, la identificación de miRNAs que predicen la agresividad tumoral y la respuesta a la terapia podrían usarse para definir mejor el pronóstico y guiar al médico para determinar el enfoque terapéutico personalizado óptimo.

miRNAs supresores de tumor

La familia let-7 de miRNAs, la primera identificada en humanos, está implicada en el cáncer de pulmón inducido por Ras. Los niveles bajos de let-7 están asociados con un mal pronóstico.

Además, la expresión de let-7 se correlaciona con la respuesta a la quimioterapia y se ha relacionado con la resistencia. Del mismo modo, miR-34 y miR-449 están menos expresados en el cáncer de pulmón y se encuentran bajo el control transcripcional de p53 o E2F1, respectivamente. Están implicados en el control del ciclo celular, la apoptosis y la invasión/migración a través de numerosas dianas, como CDK4, CDK6, MET, MYC y SIRT1. Otros grupos de miRNAs de E2F incluyen la familia miR 15/16 cuyas dianas incluyen ciclina D1, D2 y E1.

La expresión de miR-128 está significativamente disminuida en NSCLC que se correlaciona con el estadio patológico y la metástasis. Además, miR-128 regula EGFR y la pérdida de heterocigosidad de miR-128 se correlaciona con la respuesta clínica al

inhibidor de la tirosina quinasa (TKI). Otras dianas de miR-128 incluyen VEGF y S6K1, por lo que la pérdida de miR-128 promueve la proliferación y la angiogénesis.

La pérdida de miembros de la familia de miR-29 da como resultados patrones de metilación aberrante a través de la inducción de la metiltransferasa de ADN (DNMT) 3A y 3B y la re-expresión restaura los patrones normales de metilación del ADN que inhiben la formación de tumores en modelos animales. EL producto del oncogén c-myc suprime la expresión de miR-29 contribuyendo a la metilación y la pérdida del promotor de FHIT en las células del cáncer de pulmón y los tumores de pacientes con baja expresión de miR-29 presentan un mal pronóstico. Además, la expresión de miR-29 se correlaciona inversamente con la supervivencia y, a través de su interacción con ID1, puede ser predictiva de la actividad de los inhibidores de Src.

Tras el daño al DNA, mir-34 esta inducido por p53. También está regulado por la metilación y, por lo tanto, se silencia en varios tipos de cáncer, incluido el cáncer de pulmón. Tanto los niveles de expresión, como el estado de metilación de miR-34 tienen valor pronóstico en el cáncer de pulmón. La pérdida de expresión de miR-34 promueve la proliferación y la supervivencia a través de multitud de genes diana SNAIL, Met, MYC, HDAC1 y BCL-2. La restauración de la expresión de miR-34 previene el inicio y la progresión del cáncer en modelos de ratón con cáncer de pulmón y sensibiliza las células de cáncer de pulmón a la radiación.

El EGFR está sobre-expresado en más de la mitad de NSCLC y, en consecuencia, es un objetivo para enfoques terapéuticos dirigidos, tales como anticuerpos e inhibidores de tirosina cinasa (TKI). El EGFR es una diana de miR-7.

La familia miR-200 ha sido implicada en la transición epitelio-mesenquimal (EMT) a través de sus dianas, ZEB1 y ZEB2 y E-cadherina. Debido a que la transición EMT es crítica para la metástasis y la invasión y está asociada con la quimiorresistencia no es sorprendente que algunos de los miARN implicados en este proceso, incluyendo miembros de la familia miR-200, sean considerados como marcadores de pronóstico en el cáncer de pulmón.

Claramente, los miRNAs supresores tumorales controlan una amplia variedad de procesos tumorogénicos desde la proliferación y la supervivencia hasta la metástasis, lo que proporciona una base sólida para el desarrollo de estrategias terapéuticas que restablecen su expresión.

miRNAs oncogénicos

Se han identificado varios miRNAs que funcionan como oncogenes (oncomiR). La alta expresión de miR-21 se correlaciona con una pobre supervivencia, recurrencia y resistencia en cánceres de pulmón. Los niveles de miR-21 son más altos en el plasma de pacientes con una mutación de EGFR que los pacientes sanos o sin una mutación. Los pacientes con una mayor expresión de miR-21 tuvieron una mejora significativa en la supervivencia global después de la terapia adyuvante con gefitinib en comparación con aquellos con baja expresión. Además, los niveles séricos de miR-21 de estos pacientes fueron significativamente más altos que el valor inicial en el momento de la resistencia a EGFR-TKI sugiriendo que miR-21 puede servir como un biomarcador de resistencia adquirida. PTEN y PCD4 son dos objetivos validados de miR-21 implicados en resistencia a quimioterapia.

La pérdida de regulación de los miRNAs suprime los agonistas de PI3K/Akt PHLPP1 y PHLPP2 que inducen la proliferación y el crecimiento del tumor pulmonar. En el cáncer de ovario, miR-141 ha sido implicado en la resistencia al cisplatino a través de la supresión de KEAP1 y la inducción de la transición EMT. Los miRNAs miR-221 y miR-222 suprimen PTEN y TIMP3 por lo que promueven la proliferación y la supervivencia y están implicados en la resistencia a TRAIL en el cáncer de pulmón. Además, EGFR y MET regulan la expresión de estos dos miRNA y tienen un papel importante en EMT y la resistencia a gefitinib a través de la inducción de BIM y PKCε. Estos estudios demuestran el potencial de miR-221 y miR-222 para servir como marcadores de respuesta terapéutica y como dianas terapéuticas potenciales para sensibilizar a los tumores a la terapia de TKI.

Los estudios anteriores demuestran que las alteraciones en la expresión de miRNA pueden dictar la respuesta de las células a la terapia y, por lo tanto, podrían ser biomarcadores tempranos de resistencia. Actualmente se están llevando a cabo numerosos ensayos clínicos para evaluar los perfiles de miRNA que pueden estratificar a los pacientes que reciben una variedad de terapias, predecir recurrencias o metástasis o utilizarse para la vigilancia después del tratamiento. Es imperativo que la investigación continúe caracterizando los miRNAs que predicen la superación de la resistencia con el fin de mejorar las opciones y los resultados para los pacientes.

microRNA	Expresión	Dianas	Proceso biológico	Resistencia/Sensibilidad
Let-7	Infra	RAS,HMGA2	Supervivencia, proliferación	Quimioresistencia, predicción de la quimioterapia
miR-128	Infra	EGFR,VEGF-C, S6K1	Angiogénesis, supervivencia, proliferación	TKI
miR-29	Infra	DNMT3A, DNMT3B,CDC42, MCL-1,CDK6,ID1	Ciclo celular, apoptosis	Predicción de la quimioterapia
miR-7		BCL2. EGFR,IRS2	Apoptosis, supervivencia, proliferación	TKI, Radiosensibilidad
miR-200	Infra	ZEB1,ZEB2, E-Cadherinas	EMT	Resistencia a fármacos y radiosensibilidad
miR-21	Supra	PTEN,PDCD4.EPH A4, TIMPS, BCL2	Proliferación, apoptosis, migración/ invasión	Doxorrubicina, TKI
miR-34	Infra	c-Myc, Met,BCL-2, SIRT1, HDAC, SNAIL1	Ciclo celular, apoptosis	5-FU,taxol, doxorrubicina
miR - 221/222	Supra	PTEN,TIMP3,p27, PUMA	Migración y apoptosis	TKI,TRAIL
miR-141	Supra	MET, PHLPP1/2	EMT, proliferación	TKI, resistencia al platino

Tabla3.- Lista de genes que controlan procesos biológicos clave que impulsan la malignidad y la respuesta terapéutica en el cáncer de pulmón

Aplicación terapéutica

Además de servir como herramientas de diagnóstico y pronóstico para facilitar la toma de decisiones clínicas, los miRNA tienen el potencial de constituirse como tratamiento por sí mismos. La reciente aplicación de miRNAs como objetivos directos en humanos es un signo alentador de su potencial como tratamiento para muchas enfermedades. Los resultados iniciales de estos estudios basados en humanos parecen indicar resultados prometedores ante la perspectiva de desarrollar terapias dirigidas a los miRNAs. Sin embargo, se deben superar varios obstáculos antes de que los miRNAs realmente se empleen en clínica. Estos problemas incluyen determinar los mejores métodos para la administración, mejorar nuestra comprensión de la farmacocinética

óptima, lograr la especificidad celular y minimizar los efectos indeseados y la toxicidad. Actualmente, existen dos estrategias principales para utilizar miRNAs como agentes terapéuticos en el cáncer de pulmón, ya sea restaurando la función miRNA de supresores de tumores o inhibiendo la función de miRNAs oncogénicos (Figura 3).

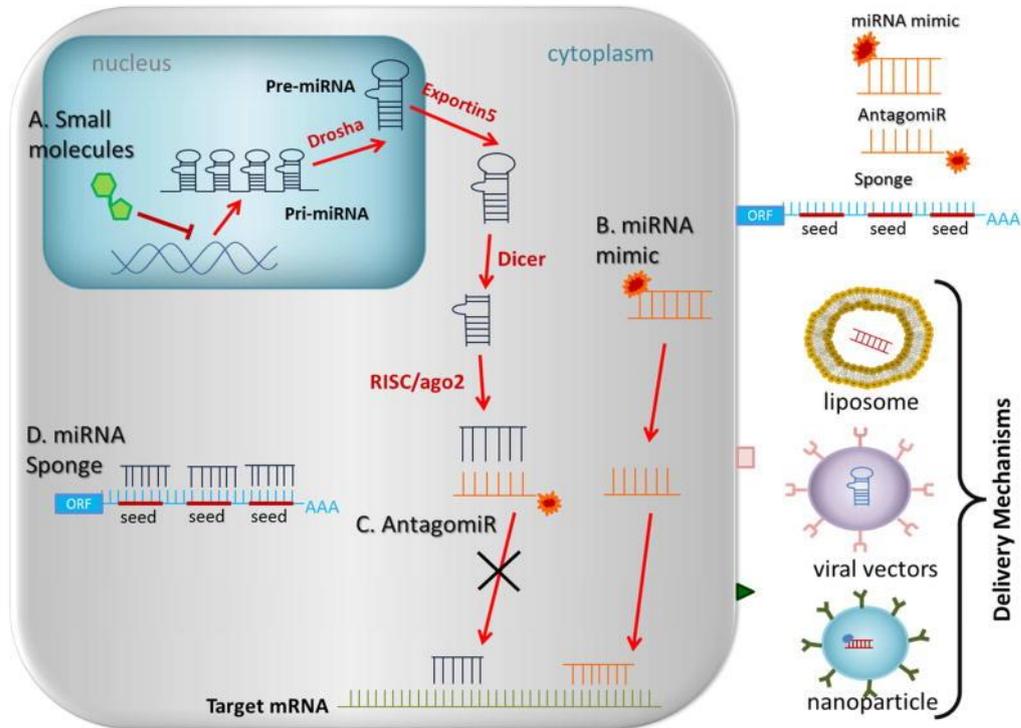


Figura 3.- Enfoques a la terapéutica de miARN

(Los liposomas, los vectores virales y las nanopartículas facilitan la entrada de imitadores de miRNA, esponjas y antagonistas en la célula cancerosa. A) Pequeñas moléculas que se dirigen a la metilación del ARNm silenciado epigenético inverso de miRNAs. B) Los miméticos de MiRNA actúan como miRNAs endógenos que restauran la función de miRNA. C) Los AntagomiR tienen secuencias complementarias a su miARN endógeno objetivo inhibiendo así su función. D) Las esponjas de MiRNA contienen múltiples secuencias de semilla que sequestran el objetivo miARN endógeno que impide su función.)

Estrategia 1. Restableciendo la función del miRNA

Existen varios métodos empleados para restaurar la actividad y la función de los miRNA supresores de tumores, incluido el suministro de vectores de oligonucleótidos de miRNA o productos farmacéuticos dirigidos a la expresión global de miRNA. La expresión de los miRNAs está regulada por factores de transcripción tales como c-myc y p53, así como a través de la modificación epigenética a través de la metilación. Por lo tanto, los agentes hipometilantes como la decitabina o la 5-azacitidina también pueden aplicarse al silenciamiento epigenético inverso de los miRNA, sin embargo, debido a que estos agentes se dirigen a toda la metilación, parece improbable que los efectos sean específicos sobre los miRNAs. Estos agentes están aprobados para el tratamiento de

síndromes mielodisplásicos, aunque su eficacia está limitada por sus efectos inespecíficos en la metilación de genes globales.

Un enfoque más específico para restaurar la función de miRNA utiliza imitadores de los mismos que reducen los efectos de “cuerpo extraño” y se pueden personalizar en función del patrón de miRNAs del tumor. Los imitadores son RNAs sintéticos de doble cadena con modificaciones químicas que mejoran la estabilidad y la captación celular y se procesan en una forma monocatenaria para regular la expresión génica de manera similar a los miRNA. La hebra guía es idéntica al miRNA de interés y la cadena pasajera a menudo contiene modificaciones químicas, como el colesterol, que mejora la absorción o las modificaciones químicas para evitar la carga en el complejo RISC.

Los sistemas de administración basados en vectores se emplearon primero para la terapia génica, pero tienen una eficacia, estabilidad, permeabilidad, duración de los cambios genómicos y toxicidades fuera de las dianas muy variadas. Los vectores de expresión de miRNA están diseñados con promotores que dirigen la expresión del miRNA de interés específico de tejido o tumor. Por ejemplo, la administración de adenovirus y lentivirus de let-7 redujo la carga tumoral pulmonar en un modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS. También se han empleado emulsiones de lípidos, liposomas y nanopartículas para mejorar la estabilidad y la absorción de imitadores de estas moléculas. La administración de let-7 y miR-34 a través de la corriente sanguínea utilizando una emulsión de lípidos neutros inhibió los tumores en un modelo de cáncer de pulmón inducido por KRAS, lo que demuestra la utilidad clínica potencial de este enfoque. Además, los liposomas catiónicos se han usado para administrar eficazmente miR-7 a tumores resistentes a EGFR xenotransplantados en ratones, los cuales redujeron su volumen tumoral de manera espectacular. Por otra parte, las nanopartículas pueden recubrirse con anticuerpos específicos de tumores potenciando así el que los imitadores se dirijan específicamente al tumor y reduciendo los efectos en lugares que no sea la diana principal. Utilizando un modelo de melanoma metastásico, los investigadores administraron miR-34 a través de nanopartículas recubiertas con un fragmento variable de cadena única dirigido a tumores (scFv) que reduce la metástasis pulmonar.

Estos estudios proporcionan evidencia preclínica de la posible utilización de técnicas de restauración de miRNAs para tratar el cáncer de pulmón. La pérdida de miRNA-34 está implicada en una serie de cánceres, incluido el carcinoma hepatocelular y el cáncer de pulmón. Los estudios preclínicos han demostrado que la restauración de miR-34 redujo el crecimiento tumoral en modelos animales. La primera terapia de reemplazo de miRNA, el MRX34, consiste en un liposoma que imita a miR-34 y que se inyecta por vía intravenosa. En 2013, MRX34 recientemente entró en fase de ensayos clínicos en humanos para pacientes con cáncer de hígado avanzado o metastásico.

Estrategia 2. Bloqueando la función del miRNA

Desde el descubrimiento de miRNAs oncogénicos, las estrategias para inhibirlos se han desarrollado principalmente sobre la base de oligonucleótidos antisentido. Estos enfoques incluyen antagomirs, miRNAs de ácido nucleico bloqueado (LNA) y esponjas de miRNA (Figura 3). Los Antagomirs son RNAs sintéticos complementarios del miRNA guía que bloquean su función y permiten la traducción del mRNA. Los Antagomirs están limitados en su aplicación clínica porque se requieren grandes dosis para el bloqueo efectivo de miRNA, aunque las modificaciones químicas que mejoran la captación promueven la unión y previenen la degradación lleguen a mejorar esta limitación. La LNA anti-miRNAs sustituye varios ácidos nucleicos con análogos de RNAs bicíclicos que contienen el anti-miRNA en una conformación bloqueada. Esta modificación permite a oligonucleótidos más cortos con alta afinidad por sus miRNAs diana ser utilizados con una potencia aumentada y una reducción de los efectos fuera de la diana. De forma similar a los antagomirs, las esponjas miRNA se unen a miRNAs maduros alterando su función; sin embargo, están codificados en un vector viral impulsado por un promotor de expresión fuerte y contienen múltiples sitios de unión en tándem complementarios a un heptámero en el miRNA de la secuencia de interés que permite a la esponja bloquear una familia de miRNAs completa. La aplicabilidad clínica de las esponjas de miRNAs está también limitada por la gran dosis requerida para inhibir la actividad de los mismos y los efectos inespecíficos (fuera de la diana del vector viral utilizado). Una variedad de estudios *in vitro* e *in vivo* han demostrado el potencial de dirigir miRNAs usando estos enfoques; sin embargo, solo uno ha llegado a los ensayos clínicos. El primero de este tipo en participar en ensayos clínicos en humanos, Miravirsén es un agente terapéutico basado en LNA para el tratamiento de la infección viral por hepatitis C (VHC). El miRNA-122 es específico del hígado, esencial para la estabilidad y la replicación del virus de la hepatitis C. El LNA-antimiR-122 se une y secuestra a miR-122 evitando la replicación viral reduciendo los títulos virales en pacientes infectados por el VHC. El éxito de esta estrategia terapéutica en el tratamiento de la infección por hepatitis C demuestra su potencial de aplicabilidad en el tratamiento de otras enfermedades, incluido el cáncer [23].

MicroRNA en el cáncer de próstata

Introducción

El cáncer de próstata (PCa) es el cáncer no cutáneo más común entre los hombres, sin embargo, los métodos de diagnóstico actuales son insuficientes para detectar esta enfermedad y es necesario desarrollar biomarcadores más confiables. Actualmente, el antígeno prostático específico (PSA) se usa como marcador de diagnóstico para PCa; sin embargo, se han encontrado muchos factores para elevar los niveles de PSA. La edad, la infección, el trauma, la eyaculación, la retención urinaria, la instrumentación, ciertos medicamentos e incluso montar en bicicleta pueden conducir a diagnósticos falsos positivos, generando preocupación innecesaria y tratamiento excesivo con resultados nefastos para el paciente. Peor aún son las posibilidades de diagnosticar falsos negativos, que hacen que el PCa no se detecte hasta sus últimas etapas. Por lo tanto, aunque el uso del nivel de PSA ha tenido sus ventajas clínicas, no ha logrado cerrar suficientemente la brecha para diagnosticar con precisión la enfermedad o distinguir la enfermedad indolente de la agresiva. Una respuesta que podría cerrar esta brecha y permitir diagnósticos más eficientes puede residir en los microRNAs [24].

Diagnóstico

En el cáncer de próstata (PCa), el diagnóstico y seguimiento después de las terapias son algunos de los principales desafíos para su manejo clínico.

Si bien el cribado de PSA mejoró la detección temprana, sus niveles se correlacionan de manera deficiente con la agresividad o la diseminación tumoral, y no son útiles para predecir la respuesta o las recaídas. La precisión diagnóstica, en particular en términos de estratificación del riesgo, estadificación inicial, vigilancia activa y terapia focal, es uno de los principales problemas en este campo. Los pacientes se someten a biopsias repetitivas, que no sólo son invasivas, sino que además no son decisivas, incluso si se combinan con el PSA y el examen rectal digital (DRE). El DRE tiene una sensibilidad baja, mientras que el cribado del PSA se caracteriza por una baja especificidad; el error de muestreo en presencia de PCa multifocal, por ejemplo, podría llevar a una mala interpretación de los resultados y a la terapia incorrecta. En los últimos años, se ha invertido mucho esfuerzo para dilucidar la posibilidad de mejorar la atención del paciente mediante la sustitución de procedimientos, incluso si son mínimamente invasivos, como DRE o biopsia de próstata, con análisis de miRNAs en suero o plasma de pacientes. El estudio inicial fue publicado en 2011 por Moltzahn et al., quienes compararon los niveles de miRNAs en suero de 12 hombres sanos y 36 pacientes divididos en grupos de riesgo bajo, intermedio o alto basados en el puntaje de la

Evaluación de riesgo de cáncer de próstata. De los 384 miRNAs evaluados a través de qRT-PCR multiplex y analizados a través de un chip microfluídico, 10 de ellos mostraron diferencias entre muestras sanas y malignas (cuatro estaban inhibidos y seis estimulados). Algunos de ellos ya habían sido identificados en estudios previos sobre tejidos de próstata (por ejemplo, el miR-93 también se identificó como regulado positivamente en el cáncer de próstata por Volinia et al.), mientras que miR-223 y miR-30c se inhibían en el mismo estudio. Se encontró una correlación lineal entre los niveles de miRNA y el riesgo de cáncer para 3 de los 10 miRNAs desregulados; en particular, miR-106 y miR-1274 tenían una correlación positiva; miR-24 la tuvo negativa. Se sugirió que miR-106a y miR-1274 en particular poseen un potencial diagnóstico significativo. Posteriormente, Bryant et al. analizaron el plasma de 78 pacientes con cáncer de próstata y 28 donantes sanos. Se encontró que 12 miRNAs perdían la regulación (valorada por qRT-PCR) en pacientes con cáncer en comparación a la cohorte sérica independiente de individuos sanos. Los autores identificaron dos miRNAs (miR-107 y miR-574-3p) capaces de discriminar significativamente las dos categorías. Es de destacar que estos miRNAs también se probaron en 135 muestras de orina enriquecidas en células prostáticas después de DRE, y también se encontraron altamente concentrados en estas muestras, lo que abre nuevas posibilidades de diagnóstico. Posteriormente, Chen et al. describieron un conjunto de cinco miRNAs plasmáticos (let-7c, let-7e, miR-30c, miR622 y miR-1285) mediante el análisis de 25 muestras derivadas de pacientes con cáncer de próstata y otros 17 con hiperplasia benigna. Este patrón podría discriminar entre cáncer, hiperplasia y muestras sanas con un alto valor diagnóstico. En 2011, Yaman Agaoglu et al. probaron la posible utilidad diagnóstica de tres miRNAs específicos asociados a PCa, miR-21, miR-141 y miR-221, demostrando que miR-21 y miR-221 estaban elevados en el plasma de hombres con PCa localizado en comparación con controles sanos. Además, el patrón combinado de miR-141 y miR375 ha sido validado por varios grupos. Estos miRNAs parecen ser marcadores fiables de enfermedad sistémica porque se han utilizado para discriminar de forma eficiente a los hombres con cáncer localizado de aquellos con enfermedad metastásica. El miR-141 y miR-375 también se han asociado con el estadio tumoral y el puntaje de Gleason en el suero de los pacientes antes de someterse a prostatectomía radical (PR), lo que demuestra el potencial de los marcadores circulantes para la detección precoz del PCa.

Pronóstico

Los perfiles de expresión de los que hemos hablado hasta ahora utilizando miRNAs como factores de diagnóstico arrojaron algunos resultados consistentes. Las opciones de tratamiento reconocidas para el PCa en etapa temprana incluyen cirugía, radioterapia (RT) y vigilancia activa. Después de la resección prostática, se espera a que el PSA caiga a niveles indetectables, por lo que se cree que los pacientes con niveles de PSA detectables después de una resección tienen recidiva bioquímica (BCR) debido a la

presencia de tejido benigno de próstata o cáncer. A continuación, valoramos el pronóstico del cáncer de próstata tras su resección, y el papel que juegan los miRNAs.

Recurrencias bioquímicas

El primer punto para medir el éxito del tratamiento después de RP es el BCR, definido como el aumento de novo de los niveles de PSA sérico. BCR puede ser potencialmente predictivo del desarrollo de metástasis posteriores y, en última instancia, de la muerte, o por otra parte puede predecir otros signos de progresión clínica durante años. Diferentes estudios intentaron encontrar miRNAs capaces de estratificar a pacientes con diferentes probabilidades de incurrir en fallo bioquímico. En 2009, Tong et al. identificaron un patrón de 16 miRNAs en 40 tejidos tumorales de pacientes de un grupo que recayó antes de 2 años y otro grupo que no recayó dentro de un período de 10 años después de RP. Usando estos 16 miRNAs, pudieron clasificar correctamente el 75% de los pacientes analizados y excluir al 85% de los pacientes sin recurrencias aparentes. Si bien este estudio describe al miR-96 como por debajo del límite de detección en BCR, un estudio posterior de Schaefer et al. lo designó como el biomarcador electivo para la identificación de BCR. En particular, los autores analizaron 76 muestras de RP y el tejido adyacente normal, 12 de los cuales incurrieron en BCR después de la cirugía. Confirmaron el papel de miR-96 como un biomarcador BCR predictivo en un conjunto de muestras tumorales independientes de 79 pacientes, lo que demuestra que los tumores con altos niveles de miR-96 también tienen una disminución significativa en la supervivencia sin recidivas. Un estudio independiente confirmó en dos cohortes diferentes que miR-96 también se correlaciona significativamente con la supervivencia general de los pacientes después de la PR.

Sin embargo, estos datos prometedores no han podido ser confirmados por otros estudios. Mortensen et al. analizaron posteriormente a 35 pacientes con prostatectomías microdisecadas, 60% de los cuales habían experimentado recurrencias; el seguimiento medio de aquellos sin recurrencia fue de 66 meses. En general, 28 miRNAs se encontraron sobre-expresados en pacientes con recidiva, siendo miR449b el más significativo, confirmado en una cohorte de validación de 163 pacientes adicionales. De manera más consistente, múltiples grupos de investigación han demostrado que miR-21 está sobre-expresado en PCa recurrente; por ejemplo, Leite et al en 53 casos localizados de PCa divididos en grado alto o bajo, en comparación con BPH como control. Debido a que miR-21 es un conocido onco-miR desregulado en varios tipos de cáncer, no es sorprendente que la pobre supervivencia sin recurrencia se haya correlacionado con altos niveles de miR-21. Más recientemente, se ha propuesto un modelo predictivo de BCR que se centró en miRNAs que son potencialmente predictivos para los pacientes que recibieron RT de rescate. Además de confirmar datos previos que mostraban un patrón de 88 miRNAs, que podía distinguir a los pacientes con insuficiencia bioquímica temprana y tardía, identificaron nueve miRNAs asociados con BCR después de la RT de rescate, y tres de ellos eran completamente nuevos (miR-1193, miR-4516 y miR -626).

De acuerdo con estudios previos que analizaron miRNAs específicos del tejido, Uzunova et al. detectaron una correlación directa entre la regulación negativa de la expresión de miRNA y la progresión tumoral. Utilizando técnicas de secuenciación profunda (Solexa Illumina) y validando de forma cruzada los resultados con análisis de microarrays de miRNA humano V2 y con qRT-PCR en 87 PCas en comparación con 15 tejidos normales (11 próstatas normales adyacentes y 4 resecciones prostáticas transuretrales no malignas), obtuvieron un conjunto de 25 miRNAs (13 inhibidos y 12 sobre-expresados en PCa) que se correlacionó significativamente con parámetros clínicos desfavorables, como un alto puntaje de Gleason. En general, 13 de estos 25 miARN desregulados fueron analizados por Larne et al. en una cohorte de tejidos prostáticos FFPE derivados de 49 pacientes con PCa y 25 hombres sin PCa. De los siete miRNAs expresados diferencialmente en muestras de PCa, se eligió una combinación de cuatro miRNAs sobre la base de la mejor discriminación diagnóstica. Estos cuatro miRNAs, dos inhibidos (miR-96-5p y miR-183-5p) y dos estimulados (miR-145-5p y miR-221-5p), forman un índice miR (llamada miQ). El miQ fue capaz de discriminar PCa de muestras no cancerosas con gran precisión y capaz de predecir significativamente la agresividad tumoral y el estado metastásico. El valor predictivo de miQ se validó en cuatro cohortes diferentes y, a pesar de las diferencias en tamaño, metodología y diseño experimental, los resultados obtenidos indican que miQ es superior al PSA para predecir el diagnóstico. Además, se descubrió que el miQ es un predictor de agresividad tumoral y en las etapas limitadas de órgano temprano capaces de predecir BCR después de RP, lo que indica que miQ podría representar el biomarcador estratificado deseado. Además, miQ tiene una mayor precisión para predecir la agresividad que el PSA con un AUC de 0.788, cuando el estadio clínico es T3, y está asociado con el estado metastásico y, por lo tanto, podría ser un marcador pronóstico útil. De nuevo, una de las moléculas de miR de miQ es miR-221. Los bajos niveles de miR-221 no sólo se han asociado con el diagnóstico de PCa, sino también recientemente con un mayor riesgo de recurrencia en 59 pacientes con PCa maligno que experimentaron BCR en comparación con 59 controles de edad, raza, estadio patológico y grado.

Cáncer de próstata resistente a la castración

La progresión de la enfermedad tras la terapia de depleción de andrógenos se denomina CRPC. Incorpora un espectro de diferentes presentaciones clínicas, que van desde el aumento de los niveles de PSA a la manifestación de nuevas metástasis y la progresión de los tumores preexistentes. Al igual que en BCR, el oncogén miR-21 se ha asociado con CRPC. La sobreexpresión de miR-21 se ha encontrado en muestras de tumores, así como en el plasma de pacientes propensos a desarrollar enfermedad resistente a la castración. Además de miR-21, otros miRNA se han asociado con el inicio de CRPC. Aunque el número de muestras analizadas se limitó a 17, miR-221 y miR-222 se encontraron fuertemente sobreexpresados en el tejido prostático y la médula ósea de pacientes con CRPC en comparación con el tejido de próstata normal, mientras que miR-23b y miR-27b estaban inhibidos.

Curiosamente, la mayoría de los miRNAs que se encuentran alterados en CRPC están de alguna manera vinculados a la vía del receptor de andrógenos (AR). Algunos miRNAs parecen estar regulados por AR mientras que a su vez, otros son reguladores del mismo, al nivel de RNAm o proteína. Los miRNAs pueden ser regulados por andrógenos a través de la unión directa a elementos de respuesta a andrógenos en el promotor (por ejemplo, para miR-21, donde el AR conduce a su sobreexpresión que a su vez inhibe a la vía del factor de crecimiento b transformado, asociada con quimiorresistencia). La regulación directa del AR por miRNAs también se ha descrito. En particular, entre varios miRNAs potenciales, miR135b y miR-185 surgieron como los principales reguladores del AR, a través del 3'-UTR. La pérdida de miR-135b y miR-185 en el PCa ha sido ampliamente demostrada y podría explicar en parte el aumento común de la expresión de AR en el CRPC. Otros miRNAs se desregularon a través de la reprogramación de la señalización del AR (miR-221 / miR-222). La formación de metástasis a distancia es la última característica de CRPC. El miR-221 ha sido altamente correlacionado con la formación de metástasis y, junto con miR-141, podría distinguir con precisión entre los hombres con metástasis óseas en comparación con los hombres con enfermedad localizada. El miR-221 se destaca como uno de los biomarcadores más prometedores para el PCa, no sólo como una herramienta prometedora de diagnóstico y pronóstico, sino que también la baja expresión de miR-221 se asoció con factores clinicopatológicos, incluido el Puntaje de Gleason y recurrencia clínica. Los pacientes con PCa con tumores localizados que expresan miR-221 en niveles bajos tienen un mayor riesgo de recurrencia después de la cirugía, probablemente incrementando la proliferación, inhibiendo la apoptosis y promoviendo la invasión mediante la inhibición de IRF2 y SOCS3. La importancia de la regulación negativa del clúster miR-23b/miR27b en CRPC metastásico ha sido descrita por dos grupos diferentes, que lo encontraron alterado al analizar diferentes cohortes de pacientes con PCa, lo que indica su capacidad de regular negativamente la invasión y el crecimiento dependiente del anclaje. El clúster miR-23b/27b está bajo el control transcripcional directo del AR, y su re-expresión en líneas celulares CRPC da como resultado una atenuación significativa de la actividad de Rac1 y niveles aumentados del supresor de tumores E-cadherina, confirmando su papel en la regulación de la migración e invasión.

El análisis de marcadores potenciales para la estratificación de pacientes con CRPC también se ha extendido a la alteración de miRNA exosomal en plasma. Los exosomas son vesículas derivadas de células presentes en muchos fluidos biológicos, como el plasma y la orina, con diámetros entre 30 y 100 nm. Se ha encontrado que los genes miR-1290 y miR-375 exosómicos en plasma son prometedores biomarcadores pronósticos para pacientes con CRPC. Aunque se necesita una validación prospectiva para una evaluación cuidadosa de estos miRNAs candidatos, la detección precoz en los pacientes definitivamente se está moviendo en esta dirección.

Aplicación terapéutica

La radioterapia (RT) es la elección para los pacientes de PCa de alto riesgo localizado que no pueden someterse a resección prostática, y la supresión de testosterona, RT, radio-223 y la terapia hormonal son los tratamientos actuales de elección para los hombres con PCa recurrente que evoluciona hacia un fenotipo resistente a la castración en la mayoría de los casos. Para los hombres que no responden a la terapia hormonal primaria e incluso secundaria, que incluye antagonistas competitivos del AR (enzalutamida) y los inhibidores de la esteroidogénesis (abiraterona), la quimioterapia y la inmunoterapia son las únicas opciones disponibles. La posibilidad de utilizar la medición de miRNAs para decisiones terapéuticas adaptadas al paciente, como la predicción de la respuesta terapéutica, la combinación óptima de fármacos y la monitorización de la enfermedad en caso de que el PSA no sea un marcador fiable para la progresión de la enfermedad, son el foco principal en este campo. Hasta la fecha, se ha publicado un número creciente de estudios sobre los miRNAs como marcadores predictivos para la elección del tratamiento. Por ejemplo, la importancia de definir a tiempo el patrón de miRNAs que prediga la radiosensibilidad sería útil para el tratamiento con radioterapia. La primera evidencia de un patrón de miRNAs alterado en respuesta a la RT se publicó en 2008, y comprende seis moléculas (miR-512, -196a, -133b, -143, -145b y -218) inhibidas de forma significativa en las células de PCa, tanto dependientes de andrógenos o resistentes. En particular, se encontró que miR-521 se inhibe en mayor medida, y su sobreexpresión forzada fue capaz de sensibilizar células a RT *in vitro*, abriendo la posibilidad de usar miRNAs como agentes terapéuticos. Posteriormente, usando el mismo sistema celular, Li et al. demostraron que miR-106b también podría usarse para terapia dirigida porque su sobreexpresión es suficiente para anular el ciclo celular en células PCa después de recibir RT, a través de la regulación de p21 (CDKN1A). Este miRNA se encontró previamente sobreexpresado en muestras de PCa. Más recientemente, otro estudio confirmó el papel protector de la radiación de miR-106b en células de PCa múltiples, además de identificar dos miRNAs adicionales (miR890 y miR-740-3p) como potentes sensibilizadores a la radiación.

Sin embargo, la mayoría de los miRNA descritos muestran una relevancia clínica limitada como marcadores de predicción de respuesta a la radiación porque su función potencial proviene de la observación *in vitro* en líneas celulares, y no hay datos clínicos disponibles de pacientes que hayan recibido RT externa para PCa.

Para un PCa más agresivo, después de la RP y el fracaso de las terapias de privación de andrógenos, las alternativas posibles incluyen la quimioterapia basada en taxanos, los inhibidores del AR (enzalutamida) o de la síntesis de andrógenos (acetato de abiraterona). Sin embargo, aproximadamente el 40-50% de los pacientes con CRPC no responden a estos tratamientos, con una duración media de remisión de 6-9 meses. Al igual que en la radioterapia, los estudios preliminares que investigan el papel de los miRNAs como predictores de la respuesta a la quimioterapia se realizan principalmente en líneas celulares. Nuevamente, se ha identificado a miR-21 como controlador

fundamental de la respuesta a los taxanos, lo que confirma su importante papel de onco-miR. De hecho, miR-21 está significativamente más alto en suero de pacientes con PCa refractario a hormonas y/o resistente a docetaxel en comparación con aquellos sensibles a la quimioterapia. En líneas celulares resistentes a docetaxel, Lin et al. validaron la asociación de una combinación de seis miRNAs (miR200c, -200b, -146a, -222, -301b y -20a) en el plasma y sueros de pacientes con CRPC divididos en resistentes y sensibles, donde se tomó el PCa resistente con un aumento del PSA o progresión clínica después del bloqueo androgénico máximo, con un mínimo de 4 semanas entre la retirada de los anti-andrógenos y el comienzo de la quimioterapia.

Un miARN que parece ser prometedor para la terapia de PCa es miR-34a, debido a su conocida correlación con p53. En particular, Kojima et al. demostraron la existencia de asociación entre la resistencia al paclitaxel y miR-34a en las células del cáncer de próstata a través de la inhibición de la apoptosis. p53 transactiva la región promotora de miR-34a, y su sobreexpresión conduce a la detención del ciclo celular y a la regulación de diferentes dianas implicadas en el mismo (es decir, CDK4, CDK6, CYCD1, E2F3). El miR-34a se ha asociado con las dos vías apoptóticas y con la transición epitelio-mesenquimal en células de PCa. El locus genómico miR-34 es frecuentemente metilado en el cáncer, lo que conduce a la regulación negativa de miR-34a. La sobreexpresión de miR-34a y miR34c da como resultado un aumento de la apoptosis mediada por p53 en respuesta al tratamiento con doxorubicina en líneas celulares de PCa. No obstante, miR-34a parece ser el objetivo más prometedor porque su papel ha sido probado en experimentos con ratones xenotransplantados, donde su reintroducción parece disminuir el crecimiento de xenoinjertos de próstata [25].

MicroRNA en el cáncer de mama

Introducción

El cáncer de mama es el segundo tipo de cáncer más común diagnosticado en el mundo, afectando aproximadamente a una de cada ocho mujeres durante su vida [26]. Afecta a 1,3 millones de mujeres cada año y representa el 23% de todos los casos de cáncer y el 14% (465,000) de todas las muertes relacionadas con el cáncer [27]. Aunque la mayoría de los pacientes presentan una enfermedad que parece localizada en la mama, un porcentaje variable de los pacientes, dependiendo de la etapa inicial, la biología del tumor y el tipo de tratamiento, desarrollarán posteriormente una enfermedad recurrente y/o metastásica; mientras que el 10% de los pacientes ya se presentan con BC localmente avanzado y/o metastásico. Se ha estimado que la terapia sistémica adyuvante reduce la tasa de mortalidad de BC en un 35-72%. El manejo de los pacientes que fracasan con el tratamiento adyuvante y/o con metástasis BC en el diagnóstico inicial sigue siendo un desafío terapéutico principal para la carga global y las limitaciones de la terapéutica disponible actual en términos de eficacia y tolerabilidad.

En la última década, el conocimiento cada vez mayor de la heterogeneidad biológica de la enfermedad ha permitido considerar al BC como una serie de entidades patológicas moleculares separadas, a las que se puede adaptar la terapia en consecuencia. Además, los avances tecnológicos, en particular la genómica y la proteómica, han ofrecido la posibilidad de mejorar la adaptación del tratamiento a lo largo de la identificación de nuevas dianas para la terapia contra el cáncer. Estas moléculas están implicadas en varios procesos relevantes para la biología de BC, como la transducción de señales, el ciclo celular, las vías apoptóticas, proangiogénicas y metastásicas.

Entre estos posibles nuevos objetivos diagnósticos y terapéuticos, los miRNA desempeñan un papel bien conservado y crucial en los procesos biológicos normales, como la diferenciación celular, la proliferación y la apoptosis a través de una red de regulación génica complicada. El reciente aumento del interés en miRNAs se atribuye al avance de su papel en muchos procesos patológicos, así como en la transformación maligna. Los miRNAs, de hecho, están implicados en la patogénesis del BC.

Papel de los miRNAs en el desarrollo del cáncer de mama

Entre los miRNAs que actúan como oncogenes encontramos: miR-20a, implicado en la proliferación e invasión celular; miR-21, que actúa como una potente molécula antiapoptótica; miR-92 y miR-106a, implicados en la transformación maligna a través del oncogén relacionado con la mielocitomatosis (MYCN); mi-127a, que aumenta la progresión celular a través de la fase S; y miR-155, implicado en la transformación

mesenquimal epitelial (EMT) inducida por el factor de crecimiento transformante b (TGF-b), migración e invasión celular (figura 4.1).

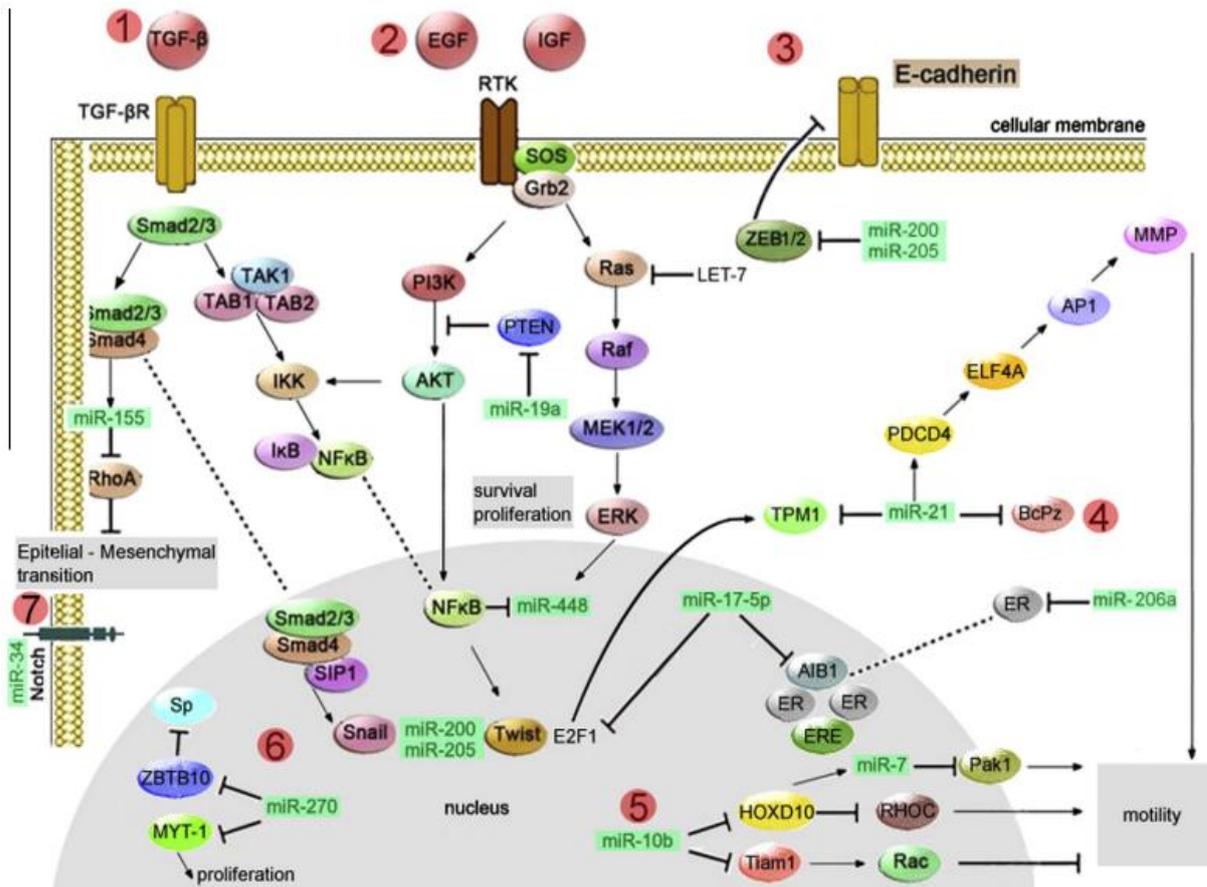


Figura 4 Activación de la maquinaria de traducción de miRNA en el cáncer de mama

(1) Se sabe que la mayoría de los miembros de la ruta de TGF- β son el objetivo de uno o más miRNAs. Además, la biogénesis de miRNAs también está regulada por TGF- β tanto directamente como a través de SMAD. Con base en estas interacciones, parece que los bucles de retroalimentación autorreguladores entre TGF- β y miRNAs influyen en la transición mesenquimal epitelial;

(2) Numerosos miRNAs actúan como reguladores positivos o negativos de la fosfoinositida-3-quinasa (PI3K) / Akt-señalización y MEK vías dirigiendo fosfatasa y tensina homólogo (PTEN) para la inhibición que afectan negativamente a phosphoinositide-3-kinase (PI3K) / Señalización de Akt o Ras, que da como resultado la proliferación celular y la supervivencia;

(3) La sobreexpresión de miR-200a es capaz de disminuir la expresión de los factores de transcripción ZEB1 / 2, con el consiguiente aumento de la expresión de Ecadherin, una proteína de adhesión asociada con la diferenciación celular. Por el contrario, la regulación a la baja de miR-200a en células tumorales dio como resultado una expresión aumentada de β -catenina y ciclina D1 implicada en la proliferación celular;

(4) Dos miRNAs, concretamente miR-206 y miR-21, se han identificado recientemente como regulados negativamente por estrógenos en el tumor de mama. Los experimentos de transfección revelaron que la introducción de miR-206 en células de cáncer de mama dependientes de estrógenos inhibe el crecimiento celular de una manera dependiente de la dosis y del tiempo, mientras que la disminución de miR-21 inhibe el crecimiento in vitro e in vivo, así como la migración;

(5) miR-10b es proangiogénico y su sobreexpresión en células endoteliales microvasculares humanas potencia la formación de redes capilares in vitro y también conduce a una mayor formación de microvasos in vivo;

(6) miR-270 bloquea ZBTB10 que a su vez reprime el factor de transcripción de proteína de especificidad 1 (SP1), que se sobreexpresa en muchos cánceres y desempeña un papel en la progresión de fase G0-G1 a S en células de cáncer de mama. Por lo tanto, al reducir la expresión de ZBTB10, miR-270 indirectamente regula SP1 aumentando así la progresión de fase S y funciona como un oncogén y

(7) Finalmente, miR34a funciona como un potente supresor de la proliferación celular a través de la modulación de la ruta de señalización E2F. La anulación de la función de miR-34a podría contribuir a la proliferación celular aberrante, lo que lleva al desarrollo del cáncer.

Todos los miRNAs mencionados están sobreexpresados en el tejido tumoral en comparación con los tejidos normales de mama. En particular, miR-21 se encuentra en aquellos tumores mamarios con un alto índice de proliferación, con estadificación tumoral avanzada, con afectación ganglionar, fenotipo agresivo incluido el cáncer de mama asociado al embarazo y en la médula ósea de pacientes con alto riesgo de recaída. Es de destacar que los estudios preclínicos mostraron que la restauración de miR-21 a niveles normales bloquea el crecimiento tumoral y revierte el índice de replicación. Es importante destacar que miR-21 está presente en mayor cantidad en tumores con expresión reducida de fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) proteína supresora fosfatasa y fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa (PTEN), lo que sugiere que PTEN es una diana potencial de miR-21. Esto es extremadamente importante ya que ya se dispone de fármacos específicos para la vía de PI3K y una plétora de nuevos agentes dirigidos a esta diana (Fig.4.2) se encuentran en desarrollo clínico. También se ha encontrado una correlación inversa entre la expresión de miR-21 y los supresores tumorales, la tropomiosina 1 (TPM1) y la proteína de muerte celular programada (PDCD4), que resultan regulados negativamente tanto a nivel transcripcional como traduccional. La lista de miRNAs implicados en la tumorigénesis también incluye miR-191 y miR-210, que están desregulados en el cáncer de mama en comparación con el tejido normal. El miR-191 es inducible por estrógenos y promueve la proliferación celular, migración, quimiorresistencia y supervivencia en el microambiente tumoral a través de la regulación negativa de la proteína de unión a la secuencia rica en AT 1 (SATB1) en la cascada receptor de estrógenos/estrógenos (ER)/miR-19 /SATB. Por su parte, el miR-210 aumenta la proliferación celular, la migración y la invasión tanto en cáncer de mama ER-positivo como ER-negativo; además, se ha descrito que miR-210 está asociado con hipoxia y con un resultado clínico pobre en pacientes (ER+) con BC tratados con tamoxifeno.

Entre los miRNAs que actúan como supresores tumorales están miR-17-5p, miR-206, miR 34 y Let-7. La molécula miR-17-5p inhibe la expresión del gen amplificado en cáncer de mama 1 (AIB1) que da como resultado una disminución de la expresión génica independiente y dependiente de ER y la proliferación del cáncer de mama. El miRNA miR-206 funciona como supresor tumoral, inhibe el crecimiento celular, la migración y la invasión e induce la apoptosis. En modelos celulares, los estrógenos redujeron los niveles de miR-206 y la reintroducción de miR-206 en células de cáncer de mama dependientes de estrógenos inhibe el crecimiento celular de una manera dependiente de la dosis y el tiempo (Figura 4.4). La disminución de los niveles de miR-206 se asocia con una etapa clínica avanzada de cáncer de mama y una supervivencia general más corta. La baja expresión de miR 34 se ha encontrado especialmente en células de cáncer de mama triple negativo (TNBC), probablemente debido a la alta incidencia de mutación p53 en este subtipo específico de cáncer de mama. De hecho, la restauración de los miembros de la familia miR-34 (a-c) mediante la expresión de un p53 de tipo silvestre puede detener el ciclo celular en la fase G1 (Fig 4.7) mediante la reducción de ciclina E2, la quinasa 6 dependiente de ciclina (CDK6) y E2F y aumento del gen antiapoptótico Bcl-2. El miR-27b inhibe la transcripción del citocromo P4501B1 (CYP1B1) que activa genes

procarcinógenos. Finalmente, Lethal-7 (Let-7) actúa como un supresor tumoral, induciendo la salida del ciclo celular y la diferenciación terminal; Se ha encontrado que la familia Let-7 regula negativamente a RAS y la proteína AT gancho 2 del grupo de alta movilidad (HMGA2) lo que inhibe la autorrenovación y diferenciación de las células iniciadoras del tumor mamario (BT-IC) respectivamente.

Papel de los miRNAs en la diseminación tumoral

Los miRNAs son cruciales en la diseminación metastásica, que recientemente ha llevado al término "metastamiRs" para enfatizar su papel en la migración, la invasión, la relación con el microambiente y la consecución de un fenotipo de mal pronóstico. Entre los metastamiR que actúan como oncogenes se encuentran miR-22, 10b, miR 103, miR-107, miR373, miR-520c, miR-21, miR-143, miR-182, miR-183, miR-9, miR-132 y miR 17/20 clúster. Recientemente se ha descubierto que miR-22 activa la EMT (transición de tejido epitelial a mesenquimal) en modelos animales. Induce hiperplasia de la glándula mamaria y expande la población de células madre, por lo tanto, actúa como un promotor tumoral; más importante aún, miR-22 promueve el proceso metastático silenciando al miR-200 antimetastático. El ya mencionado miR-10b también está involucrado en la EMT. El gen pro-metastático TWIST1 induce la sobreexpresión de miR-10b, que se encuentra en altos niveles en células cancerosas metastásicas. Los altos niveles de miR-10b inhiben la traducción de la homeobox D10 (HOXD10) y dan como resultado la inducción del producto del gen pro-metastático, el miembro de la familia del gen Ras Homologue C (RHOC) (Figura 4.5). En modelos preclínicos, altos niveles de miR-103/107 conducen a la inhibición de la biogénesis de miRNA a través de la regulación negativa de la proteína Dicer; Los niveles de expresión de miR-103/107 aumentan de líneas celulares no agresivas a metastásicas, mientras que los niveles endógenos de proteína Dicer disminuyen en líneas metastásicas. Esto sugiere una relación entre miRNA 103/107 y la probabilidad de desarrollar metástasis en cáncer de mama humano. Tanto miR-373 como -520c promueven la migración *in vitro* y se encuentran sobreexpresados *in vivo*. La expresión de miR-373 es más alta en las metástasis ganglionares en comparación con los tumores primarios de cáncer de mama. miR-9 no solo está involucrado en la EMT, sino también en la invasión tumoral y la angiogénesis, a través de la regulación negativa de E-cadherina y del receptor del factor inhibidor de la leucemia supresora de metástasis (LIFR); LIFR activa la cascada hippo (Hpo) y conduce a la fosforilación y secuestro citoplásmico de la proteína asociada al coagulante SES (YAP). Cuando está en el núcleo, YAP determina una reducción del 50% en el nivel de proteína del factor de crecimiento del tejido conjuntivo (CTGF). MiR-132 promueve la neovascularización de las células endoteliales al inhibir la expresión de p120 Ras GAP. El clúster miR-17/20 regula el microambiente tumoral y controla la migración e invasión de células de cáncer de mama al inhibir las citoquinas (IL-8, CXCL1, IL 10 y NT4) y los activadores de plasminógeno (citoqueratina 8 y α -enolasa), que son necesarios para que se produzcan las metástasis de células tumorales.

Entre los metastamiR que actúan como supresores tumorales, están miR205, familia miR-200, miR-146a/b, miR-206, miR-335, miR-31, miR-125a/b, miR-145, miR-7, miR-661, miR-126, miR-15b, miR-16, miR-20a / by miR-29b. miR-205 bloquea la EMT, también inhibe al Receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (HER3), inactivando la proteína quinasa B (PKB, también conocida como Akt), que da como resultado la supresión de la vía de señalización de PI3K/Akt. Cuando los niveles de miRNA-125a y -125b y miRNA-205 están regulados negativamente, hay una transcripción incrementada y una cantidad global de HER2 y 3 proteínas que confieren mayor invasividad celular. Como se puede apreciar en la Figura 4.3, junto con miR-205, los miembros de la familia miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 y miR-429), inhiben a ZEB1 y ZEB2, represores de E-caderina, lo que promueve la EMT y metástasis tumoral. Tanto miR-146a como miR-146b inhiben la invasión y la migración *in vitro*, mediante la regulación negativa del factor nuclear kappa-potenciador de la cadena ligera de las células B activadas (NFk-B) que promueve las actividades de las metaloproteinasas de matriz (MMP) al reprimir el factor de necrosis tumoral (TNF) -receptor asociado al factor 6 (TrAF6) y la interleucina-1 receptor asociado kinasa 1 (IRAK1) en el receptor Toll-like y la interleucina 1 (IL-1), lo que lleva a la regulación negativa de la genes diana IL-8, IL-6 y MMP-9; *in vivo*, inhiben al EGFR y a la proteína quinasa ROCK1, que participan en la promoción de la invasión y la metástasis. Se descubrió que miR-206 y miR-335 suprimen la migración, la invasión y la colonización metastásica sin inhibir el crecimiento tumoral general. miR-206 activa la apoptosis e inhibe la migración de células tumorales a través de Notch3; disminuye la actividad metastásica en líneas celulares de cáncer de mama altamente metastásicas. miR-335 inhibe la metástasis a través de la selección de SRY-box que contiene factor de transcripción (SOX4), receptor tipo tirosina proteína fosfatasa (PTPRN2), c-Mer tirosina quinasa (MERTK) y la proteína de la matriz extracelular Tenascina-C (TNC). Los niveles de miR-31 fueron más bajos en pacientes con cáncer de mama y metástasis. miR-31 inhibe múltiples pasos de metástasis incluyendo invasión, anoikis y colonización que conducen a una reducción del 95% en la metástasis pulmonar en un modelo ortotópico de cáncer de mama. La sobreexpresión de miR-125a o miR-125b en una línea celular cancerosa dependiente de HER2 suprimió la expresión y la síntesis de HER2 y HER3, lo que disminuyó la motilidad e invasividad celular. A niveles fisiológicos, miR-125a es capaz de reprimir la traducción de la proteína de unión al ARN (RBP) HuR, para inhibir el crecimiento celular y para reducir la migración celular y la proliferación; miR-125b ejerce un efecto antiproliferativo a través de la inhibición de c-Raf. miR-145 es un supresor tumoral capaz de inhibir el crecimiento de células tumorales tanto *in vitro* como *in vivo* a través del silenciamiento de un dominio 17 de la desintegrina y metaloproteinasas (ADAM17) y expresión génica de EGFR; también suprime la invasión celular a través del silenciamiento del gen de metástasis mucina 1 (MUC1). La expresión de miR-7 está regulada positivamente por HOXD10 con supresión de la motilidad, la capacidad de invasión y el potencial de crecimiento independiente del anclaje en células de cáncer de mama. La expresión de miR-661 está controlada por el factor de transcripción c/EBPa; actúa reprimiendo el antígeno tumoral metastásico 1 (MTA1). miR-126 puede reprimir el dominio de homología 1 Ena/VASP de Spred1 y la subunidad reguladora 2 de

fosfoinosítido-3-quinasa (PIK3R2), que a su vez regulan negativamente el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y señalización del factor de crecimiento fibroblástico-b (bFGF) a través de las rutas de MAP quinasa y PI3 quinasa. miR-126 también inhibe la expresión de la molécula de adhesión vascular1 (VCAM-1). Las moléculas miR-15b, miR-16 y miR-20a/b también actúan como anti-angiogénicos. Finalmente, en un estudio reciente, se encontró que miR-29b modula el microambiente tumoral y suprime la metástasis; su expresión es promovida por el factor transcriptor GATA3, tanto directamente (uniendo los sitios GATA en el promotor) como indirectamente (inhibiendo las rutas TGF- β y NF- κ B). La vía GATA3/miR-29b promueve un programa de diferenciación luminal y se opone al estado basal/EMT [28].

Diagnóstico, pronóstico y aplicaciones terapéuticas.

Una vez conocemos las vías de desregularización en el cáncer de mama y en base a los que hemos descrito para el resto de cánceres, podemos utilizar estas señales como biomarcadores, en nuestro beneficio para establecer un diagnóstico, aportar un pronóstico e incluso tratar la enfermedad actuando sobre estas vías. Figura (5)

miRNA para uso terapéutico en cáncer de mama

El uso de miRNAs para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas se basa en 2 enfoques:

- 1) modulación de miRNAs en combinación con terapias no basadas en miRNA para aumentar la eficacia de los tratamientos convencionales.
- 2) uso de miRNAs como moléculas del fármaco, basadas en la síntesis y administración de oligonucleótidos específicos, capaces de aumentar o disminuir los niveles de miRNA en el cáncer de mama.

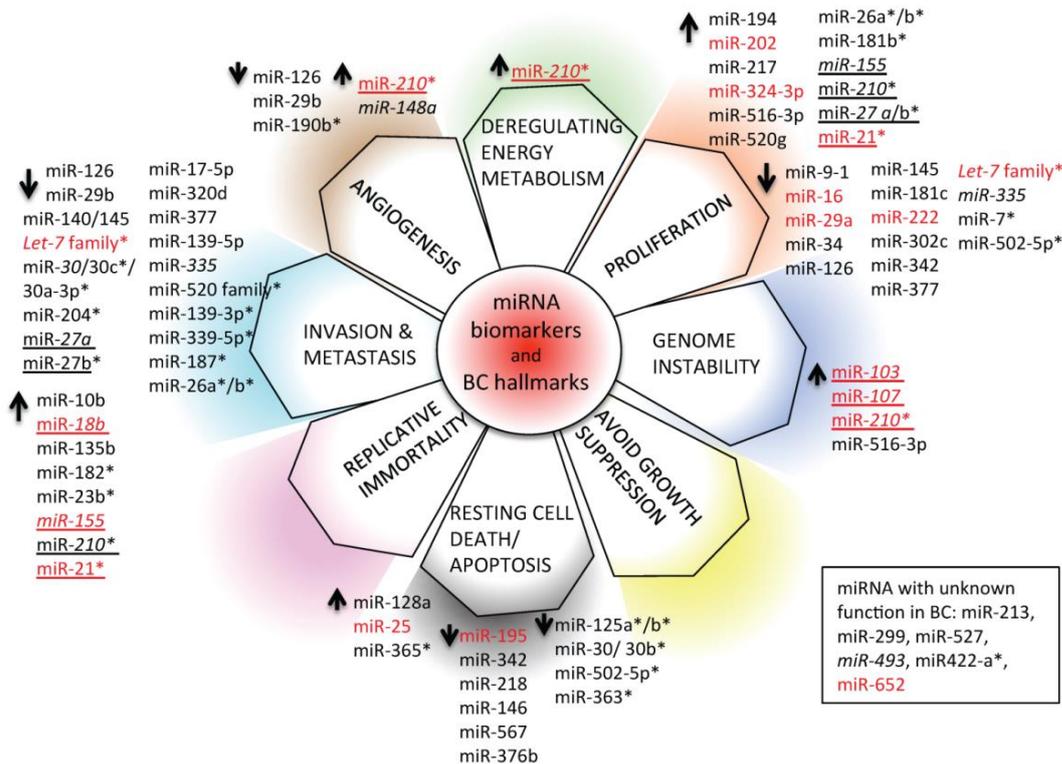


Figura 5.- biomarcadores de miARN y marcadores del cáncer de mama. Los miRNA tienen un papel como miARN de diagnóstico, miRNAs de pronóstico (cursiva), miRNAs predictivos de la respuesta de BC a la terapia (*) o miRNAs con funciones múltiples (diagnóstico, pronóstico, predicción del resultado de la terapia, subrayado). Circulante (rojo) y no circulante (negro)

Métodos para la modulación de miARN

Hay dos enfoques principales para desarrollar terapias basadas en miRNA: antagonista y oligonucleótidos miméticos. Los antagonomiR se generan para inhibir miRNAs que adquieren una función de ganancia en la enfermedad humana. La estrategia más común para eliminar la función de miRNAs se logra mediante oligonucleótidos monocatenarios con secuencias complementarias de miRNA. Por el contrario, los imitadores de miRNA se utilizan para recuperar una pérdida de función, como en la terapia génica tradicional. Este enfoque, también conocido como terapia de reemplazo de miARN, ha atraído mucho interés ya que brinda una nueva oportunidad para explotar el uso de los supresores tumorales en la terapia. El bajo peso molecular de los miARN permite la administración de miARN terapéuticos como oligonucleótidos bicatenarios cortos. Para mejorar la eficacia de la administración de miRNA o anti-miRNA *in vivo*, se han desarrollado moléculas modificadas, tanto imitadores de miRNA como antagonistas, con semividas más largas y mayor eficacia, tales como oligonucleótidos anti-miRNA (AMO), ácido nucleico ácido bloqueado (LNA) oligonucleótidos modificados, antagonomiRs con colesterol-conjugado, y recientemente se han desarrollado las variantes 2'-O-methoxyethyl-4'-thioRNA (MOE-SRNA). En los últimos años, se ha descrito un método para inhibir la función de los miRNA usando mRNA sintéticos que contienen múltiples sitios de unión para un miRNA específico, denominados esponjas miRNA. En

líneas celulares de cáncer de vejiga se ha demostrado que la expresión forzada de una esponja diseñada para inhibir miR-21 conduce a una reducción en la glucólisis aerobia tumoral, es decir, la capacidad de las células para metabolizar glucosa incluso en condiciones aeróbicas. Las esponjas han sido validadas incluso en un modelo de ratón xenotransplantado con células SUMC de BC epitelial, donde la inhibición de miRNA-9 impulsado por Myc usando un mRNA sintético que contiene varios sitios de unión miR-9 redujo el desarrollo de metástasis pulmonares. Se ha observado la inhibición del efecto de proliferación celular en BC incluso en otro modelo de ratón implantado con la línea celular MDA MB-231 de BC, donde una inhibición basada en esponja miR-150 condujo a una reducción en la proliferación de la masa tumoral mediante el aumento del receptor P2X7.

Terapias dirigidas a miRNA en el cáncer de mama

El uso de miRNAs solo en la terapia contra el cáncer para inhibir la proliferación y el desarrollo de BC sigue siendo un desafío, aunque ya se han obtenido algunos resultados prometedores tanto en experimentos *ex vivo* como *in vivo*. Por ejemplo, miR-145 ha sido elegido como diana en terapia para el cáncer de mama porque generalmente se encuentra regulado negativamente. El uso de oligonucleótidos miRNA miméticos o inhibidores se ha probado en experimentos *in vivo*. Por ejemplo, se ha encontrado que miR-21 es de particular interés en el cáncer de mama porque los oligonucleótidos anti-miRNA modificados químicamente ya se han probado *in vivo* en ratones xenotransplantados. Para evitar la rápida degradación y excreción de miRNAs, es necesario el estudio de nuevos sistemas de administración, que podrían mejorar la estabilidad y la administración a los tejidos diana. Recientemente, algunos estudios se centraron en el uso potencial de los nanomateriales para facilitar la administración de biomoléculas dentro de los tumores. En particular, las nanopartículas de oro, con su alta afinidad por biomoléculas, citotoxicidad reducida, fácil control del tamaño y una química de superficie bien desarrollada, se han modificado para aumentar su afinidad por los ácidos nucleicos, permitiendo la administración efectiva de silenciadores de RNA al interior de las células. El mismo enfoque se ha utilizado para el aporte de miR-145 a las células cancerígenas. Por lo tanto, las nanopartículas de oro se han utilizado con éxito para el suministro de oligonucleótidos miR-145 dentro de líneas celulares del cáncer de mama.

La pregunta sobre el efecto de la administración en órganos no diana y la toxicidad sistémica del compuesto permanece sin respuesta. Un obstáculo para el uso de miRNAs en la terapia es el hecho de que la modulación de miRNA puede afectar cientos de transcripciones en diferentes tejidos, siendo potencialmente capaz de cerrar rutas completas. Por lo tanto, hasta la fecha, pocas compañías han utilizado miRNAs para desarrollar una nueva clase de terapias contra el cáncer. Sin embargo, varias empresas sugieren que los oligonucleótidos antagomiR pueden administrarse fácilmente a través de inyecciones locales o parenterales con una captación suficiente del agente para

lograr la inhibición sostenida de la diana en tejidos y órganos sin la necesidad de una formulación. Sin embargo, las características de miRNA, como su estabilidad y actividad generalizada en varios objetivos, nos llevan a pensar que antes de usarlos en terapias, se requiere mucho trabajo para obtener un conocimiento más detallado y completo sobre el potencial terapéutico, la distribución tisular y sistémica y la toxicidad.

miRNAs y quimioresistencia

Los miRNA pueden usarse potencialmente para aumentar la respuesta del cáncer de mama a una intervención terapéutica. El cáncer de mama ha demostrado ser quimiorresistente cuando algunos miRNAs están desregulados (por ejemplo, miR-125b). Los oligonucleótidos miméticos de miRNA, se pueden usar en combinación con la terapia convencional para obtener un mayor beneficio para los resultados del paciente. Un ejemplo de este enfoque se ha utilizado en el estudio de Yang et al. donde la regulación positiva de miR-195, obtenida por oligonucleótidos miméticos, suministrados a la línea celular MCF-7 resistente a ADR aumentó la sensibilidad de las células al tratamiento, conduciendo la apoptosis por la inhibición de Raf-1 y Bcl-2. Además, el tratamiento combinado de un paciente con BC usando oligonucleótidos antago-miR para inhibir los niveles de expresión de miRNA podría potencialmente aumentar el efecto de la terapia convencional. Este enfoque se ha usado, por ejemplo, para demostrar *in vitro* que los oligonucleótidos antisentido miR-21 podrían usarse en combinación con H para matar células resistentes BC en modelos de ratón xenoinjertados.

miRNAs, CSC y quimiorresistencia

La capacidad de los miRNA para regular el fenotipo CSC y EMT es fundamental en la gestión de la resistencia terapéutica. La quimiorradioterapia existente puede dirigirse solo a las células que proliferan rápidamente. Por lo tanto, los CSC escapan de la muerte y, por lo tanto, podrán volverse resistentes, hacer metástasis o generar recaídas. La modulación de miRNA es por lo tanto fundamental para aumentar la respuesta del tumor a la terapia. Se ha demostrado, por ejemplo, que una línea celular de leucemia resistente a la daunorrubicina muestra niveles aumentados de miR-21, el miRNA responsable del control de la EMT, mientras que la supresión de este miRNA en la misma línea celular aumenta la citotoxicidad a dicho fármaco. Además, en el cáncer de mama, la resistencia a la terapia está claramente influenciada por CSC miRNAs. Por ejemplo, la expresión de miR-34a, necesaria para el mantenimiento de CSC, se regula negativamente en líneas celulares resistentes a ADR de BC, y su regulación positiva conduce a una mayor sensibilidad a la terapia, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, se ha descrito una estrecha relación cruzada entre miR-200c, miR-203 y un factor de transcripción de células madre, Bmi1, en el cáncer de mama; en particular, Yin et al.

demonstraron que Bmi1, a menudo regulada positivamente en el cáncer de mama e involucrada en el mantenimiento de células madre, está regulada por miR-200c y miR-203. La expresión de Bmi1 y la inhibición de miR-200c y miR-203 se acompañan de la reversión de la resistencia al tratamiento con quimioterapia en diferentes líneas celulares de BC. En todos estos ejemplos, está claro que la modulación de miRNAs tiene un impacto crítico en el mantenimiento de CSC, EMT y, en general, en la respuesta de la enfermedad a la terapia. Debido a que las CSC están involucradas en la recaída de BC, la modulación de miRNA en combinación con la terapia podría disminuir la posibilidad de la próxima reincidencia de BC [29].

Conclusiones

Los microRNAs en este último siglo se ha convertido en una de las fuerzas diagnósticas, pronósticas y terapéuticas más potentes que disponemos, si bien a estas alturas, aun no se ha conseguido exprimir el potencial que parecen tener.

Hoy en día todavía basamos muchas de nuestras terapias en inhibir oncogenes y su expresión y sobre expresar genes inhibidores de tumores. Una vez sea posible actuar con seguridad y potencia en los microRNAs encargados de regular estas diferentes vías de producción de canceres seremos capaces de tratar estos con mayor eficacia.

Durante esta revisión se ha demostrado la gran ubicuidad de los microRNAs y se ha ofrecido una visión amplia de sus funciones en una gran variedad de tumores que incluyen los más prevalentes de nuestro medio.

Puede que, en los próximos años, si se consigue desarrollar terapias dirigidas con microRNAs estas sustituyan a los tratamientos expuestos en esta revisión proporcionando una nueva época de terapias dirigidas e individualizadas para el enfermo.

Bibliografía

[1] M. Bhasakaran and M.Mohan, MicroRNAs: History, Biogenesis, and their Evolving Role in Animal Development and Disease, *Vet Pathol* (2014) Jul; 51(4): 759-774.

[2] Almeida MI, Reis RM, Calin GA, MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers, *Mutat Res* (2011) Dec 1;717(1-2):1-8.

[3] Bernstein E, Caudy AA, Hammond SM, Hannon GJ, Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference, *Nature* (2001); 409(6818):363-6.

[4] Kurihara Y, Watanabe Y, Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci USA* (2004); 101(34):12753-8.

[5] Gao F-B, Posttranscriptional control of neuronal development by microRNA networks, *Trends in Neurosciences* (2007); 31: 20.

[6] Stark A, Bushati N, Jan CH, et al , A single Hox locus in *Drosophila* produces functional microRNA from opposite DNA strands, *Genes Dev* (2008); 22 (1): 8-13.

[7] Preall JB, He Z, Gorra JM, Sontheimer EJ, Short interfering RNA strand selection is independent of dsRNA processing polarity during RNAi in *Drosophila*, *Curr Biol* (2006); 16(5):530-5.

[8] Gregory RI, Chendrimada TP, Cooch N, Shiekhattar R. , Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing, *Cell* (2005); 123(4):631-40.

[9] Zhan, M. and Miller, C.P. and Papayannopoulou, T. and Stamatoyannopoulos, G. and Song, C.Z, MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation, *Experimental hematology* (2007); 35 (7): 1015-1025.

[10] Cifuentes, D. and Xue, H. and Taylor, D.W. and Patnode, H. and Mishima, Y. and Cheloufi, S. and Ma, E. and Mane, S. and Hannon, G.J. and Lawson, N. and others, A novel miRNA processing pathway independent of dicer requires Argonaute2 catalytic activity, *Science* 328 (2010); (5986): 1694 - 1698.

[11] Heng-Chi Lee, Liande Li, Weifeng Gu, Zhihong Xue, Susan K. Crosthwaite, Alexander Pertsemliadis, Zachary A. Lewis, Michael Freitag, Eric U. Selker, Craig C. Mello, Yi Liu, Diverse Pathways Generate MicroRNA-like RNAs and Dicer, (2010); 38(6):803-14

[12] Sen G, Blau H, Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies, *Nat Cell Biol* (2005); 7 (6): 633-6.

[13] Lian S, Jakymiw A, Eystathioy T, Hamel J, Fritzler M, Chan E, GW bodies, microRNAs and the cell cycle, *Cell Cycle* (2006); 5 (3): 242-5.

[14] Jakymiw A, Lian S, Eystathioy T, Li S, Satoh M, Hamel J, Fritzler M, Chan E, Disruption of P bodies impairs mammalian RNA interference, *Nat Cell Biol* (2005); 7 (12): 1267-74.

[15] Eulalio A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol.* (2007) Jun;27(11):3970-81.

[16] Marilena V Iorio and Carlo M Croce, MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review, *EMBO Mol Med*, (2012) Mar; 4(3): 143-159

[17] Budak H, Bulut R, Kantar M, Alptekin B , MicroRNA nomenclature and the need for a revised naming prescription., *Brief Funct Genomics* (2016); 15(1): 65-71.

[18] Gianpiero Di Leva, Michela Garofalo and Carlo M. Croce, microRNAs in cancer, *Annu Rev Pathol* (2014); 9: 287-314.

[19] SEOM Sociedad española de Oncología medica, Las cifras del cáncer en 2017.

[20] Shuo Yan, Yan-Cao, Aiwu Mao, MicroRNAs in colorrectal cáncer: potential biomarkers and therapeutic targets, *Frontiers in Bioscience, Landmark*,(2015)June 1; 20,1092-1103.

[21] Zhiqiang Xue, Jiabin Wen, Xiangyang Chu, Xinying Xue, A microRNA gene signature for identification of lung cáncer, *Surgical Oncology* 23 (2014) 126-131.

[22] Yunlong Zhang, Qian Yang, Siwang Wang, MicroRNAs: a new key in lung cáncer. *Cáncer Chemother Pharmacol* (2014) 74:1105-1111.

[23] Jennifer F Barger and S Patrick Nana-Sinkam, MicroRNA as tools and therapeutics in lung cáncer, *Respir Med* (2015); 109(7): 803-812.

[24] Rhonda Daneil, Qianni Wu, Vernell Williams, Gene Clark, Georgi Guruli and Zendra Zehner, A Panel of MicroRNAs as Diagnostic Biomarkers for the Identification of Prostate Cancer, *Int J Mol Sci* (2017) Jun; 18(6): 1281.

[25] Linda Fabris, Yvonne Ceder, Arul M. Chinnaiyan, Guido W. Jenster, Karina D Sorensen, Scott Tomlins, Tapio Visakorpi and George A. Calin, The Potential of MicroRNAs as Prostate Cancer Biomarkers, *Eur Urol* (2016)Aug; 70(2): 312-322.

[26] C.D. Holmes, P. Silverman, Breast cancer: overview & updates, *Nurse Pract.* 36 (2011) 20–26.

[27] A.P. Morel, M. Lievre, C. Thomas, et al., Generation of breast cancer stem cells through epithelial–mesenchymal transition, *PLoS One* 3 (2008) e2888, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>.

[28] Serpico D, Molino L, Di Cosimo, microRNAs in breast cáncer development and treatment, *Cancer Treat Rev* (2014);40(8): 595-604.

[29] Gloria Bertoli, Claudia Cava and Isabella Castiglioni, MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer, *Theranostics* (2015): 5(10): 1122-1143.