

TRABAJO FIN DE GRADO

Grado en Farmacia

Curso académico 2020-2021

**MicroARNs: potencial herramienta diagnóstica y
terapéutica en la metástasis hepática de origen
colorrectal.**

Autora: Mireya López Gilete

Directora: Joana Márquez Clavijo

ÍNDICE

Resumen	1
1. Introducción	1
2. Objetivos.....	2
3. Desarrollo	3
3.1. Patogénesis del proceso metastásico en el CCR	3
3.1.1. El hígado como principal órgano de metástasis en el CCR.....	3
3.2. MicroARNs y su desregulación en la metástasis hepática de origen colorrectal	5
3.2.1. Exosomas como vehículos de microARNs en la metástasis hepática de origen colorrectal	8
3.2.2. Implicación de la metilación en la desregulación de microARNs	12
3.3. Técnicas diagnósticas y sistemas de administración de microARNs	13
4. Conclusión	18
5. Bibliografía	19

Resumen

El cáncer colorrectal (CCR) es uno de los tumores más prevalentes a nivel mundial. Las posibilidades de supervivencia de los pacientes que lo padecen disminuyen en el momento que desarrollan una metástasis, siendo el hígado uno de los órganos principalmente afectados. En la actualidad no se dispone de terapias completamente efectivas frente a la metástasis hepática, suponiendo un mal pronóstico para estos pacientes. Por ello, es necesaria la búsqueda de nuevas estrategias que ayuden tanto a la detección precoz como a la reducción de la metástasis hepática a partir del CCR.

Los microARNs, pequeñas secuencias de ARN no codificante que regulan la expresión génica post-transcripcional, juegan importantes papeles en diversos procesos biológicos. Recientemente, se ha descubierto su participación en el cáncer, resultando relevante la desregulación de su expresión en la metástasis hepática de origen colorrectal. Por este motivo, el estudio de microARNs sobreexpresados o silenciados en el CCR, que conducen a su progresión hacia la metástasis hepática, plantea su posible aplicación clínica como biomarcadores diagnósticos, además de conducir al desarrollo de terapias basadas en microARNs con el fin de frenar o recuperar su expresión.

1. Introducción

El cáncer colorrectal (CCR) representa el tercer tipo de cáncer diagnosticado a nivel mundial¹. El riesgo de padecer este tumor aumenta con la edad, viéndose incrementada su incidencia cada década en la población mayor de 40 años². Según la Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM), los cánceres más frecuentemente diagnosticados en España en el año 2021 serán los de colon y recto, contribuyendo ambos a 43.581 nuevos casos³.

En la mayor parte de los casos detectados, el origen del CCR se remonta a un pólipo en la mucosa intestinal que adquiere propiedades malignas con el paso del tiempo, creciendo de forma descontrolada y con capacidad migratoria a otros tejidos, pudiendo dar lugar a un proceso metastásico⁴. La metástasis es un proceso complejo que consta de diversas etapas mediante las cuales, a partir de un tumor primario, se forman nuevos focos cancerígenos en órganos distintos a aquel en el que se originó. Para ello, las células tumorales deben invadir el tejido que rodea al tumor primario, intravasarse en la circulación sanguínea o linfática, hacer frente al sistema inmune y, finalmente, formar un nuevo tumor a distancia⁵.

Según la progresión de la enfermedad se distinguen diferentes estadios (0-IV) en el CCR. El estadio 0 o carcinoma *in situ* es la fase más temprana de la enfermedad y se caracteriza por la localización de las células tumorales en la parte más superficial de la mucosa, sin llegar a traspasarla. En el estadio I el tumor ha crecido y ha atravesado la mucosa, pero no traspasa

la capa muscular. El estadio II se define por la infiltración de las células tumorales en todas las capas de la pared colorrectal, pudiendo invadir tejidos cercanos. Cabe destacar que en los tres primeros estadios no se aprecia afectación ganglionar, hecho que sí ocurre en estadios más avanzados, como el estadio III, en el cual las células tumorales han invadido órganos proximales. Por último, en el estadio IV, la fase más avanzada de la enfermedad, se puede apreciar la diseminación de células tumorales a órganos alejados del colon y recto, como hígado o pulmón⁶.

El diagnóstico precoz del CCR representa una labor decisiva en sus perspectivas de tratamiento y, por consiguiente, en la probabilidad de supervivencia de los pacientes que lo padecen. Si se analiza la tasa de supervivencia a 5 años para pacientes con CCR en estadios tempranos, esta se sitúa alrededor del 90%, mientras que una vez se desarrolla la metástasis, se reduce considerablemente a un 10%⁴.

Uno de los principales órganos afectados en la metástasis del CCR es el hígado, debido principalmente a su posición anatómica y arquitectura histológica, adaptada a sus diversas funciones⁷. En la práctica clínica no se dispone de terapias completamente efectivas para los pacientes con metástasis hepática a partir del CCR⁸, por lo que resulta necesario el estudio de nuevas estrategias que permitan tanto un diagnóstico precoz como un tratamiento adecuado de este tipo de metástasis.

En el CCR se pueden distinguir alteraciones genéticas y epigenéticas, de manera que se pueden evidenciar tanto cambios en la secuencia génica como variaciones en la expresión génica no atribuibles a alteraciones de la secuencia de ADN respectivamente. Una de las principales alteraciones epigenéticas que presenta relevancia en este cáncer es la desregulación de microARNs⁹. Se trata de pequeñas secuencias de ARN no codificante cuya expresión puede aparecer tanto silenciada como sobreexpresada en el CCR¹⁰. Su capacidad reguladora de genes a nivel postranscripcional¹¹ y su posible relación con el desarrollo y progresión tumoral¹⁰ los convierte en herramientas candidatas a ser utilizadas en el diagnóstico y tratamiento de la metástasis hepática de origen colorrectal.

2. Objetivos

La realización de este trabajo pretende conseguir los siguientes objetivos:

1. Describir el proceso metastásico y resaltar la importancia del hígado como órgano de metástasis, evaluando la necesidad de nuevas terapias frente a uno de los mayores retos en el CCR: la metástasis hepática.
2. Analizar la implicación de la desregulación de diferentes microARNs en el desarrollo de la metástasis hepática de origen colorrectal.

3. Estudiar métodos diagnósticos y sistemas de administración de microARNs como herramientas útiles en la clínica oncológica.

3. Desarrollo

3.1. Patogénesis del proceso metastásico en el CCR

Un 50% de los pacientes con CCR presenta un proceso metastásico en el momento del diagnóstico¹², contribuyendo en gran medida a su morbi-mortalidad⁵. Las células colorrectales sufren ciertas alteraciones genéticas y epigenéticas que provocan una proliferación descontrolada de las mismas, experimentando posteriormente una transición epitelial-mesenquimal (EMT, por sus siglas en inglés) e invadiendo el tejido que rodea al tumor primario. De esta manera, las células tumorales penetran en la circulación sanguínea o en el sistema linfático e invaden otro tejido, donde pueden formar un nuevo foco tumoral^{5,12}. La colonización metastásica depende de la interacción de las células tumorales colorrectales con el microambiente del nuevo órgano colonizado y de que su adaptación dé lugar a una metástasis favorable⁵. Se ha observado una cierta selectividad en la colonización metastásica. Este hecho se describe por primera vez en 1889 por Stephen Paget, quien propone la teoría “*seed and soil*”, en la que se explica que ciertas células tumorales colonizan de una manera selectiva órganos distantes con microambientes favorables¹³. Cada órgano presenta un microambiente distintivo y esto conlleva que células tumorales procedentes de un tumor primario se comuniquen de forma específica con un órgano diana y tengan por ello una cierta selectividad y preferencia sobre los órganos sobre los que desarrollan metástasis⁵.

3.1.1. El hígado como principal órgano de metástasis en el CCR

Uno de los principales órganos implicados en el proceso metastásico por diversos tipos de cáncer es el hígado⁷. Con respecto al CCR, un 50% de los pacientes desarrolla metástasis hepática en algún momento de la enfermedad, siendo la principal causa de muerte en estos pacientes¹⁴. Diferentes características hacen de este órgano una diana en la metástasis. El hígado es uno de los primeros órganos por el que transitan las células tumorales que han sido desprendidas desde el colon. Como consecuencia, estas células serán capturadas por los sinusoides hepáticos (capilares fenestrados que irrigan el hígado), donde deben sobrevivir y adaptarse a su microambiente. Además, su profusa irrigación y capacidad de detoxificación predisponen al hígado a la infiltración de células tumorales diseminadas desde otros órganos. El hígado es un órgano vital, por lo que en el momento en el que está implicado en un proceso metastásico las probabilidades de supervivencia disminuyen considerablemente^{7,15,16}.

Son diversos los mecanismos implicados en la colonización metastásica hepática desde el colon. Uno de los más conocidos se basa en la interacción ligando-receptor entre receptores de quimiocinas sobreexpresados en las células colorrectales tumorales (CXCR4, CCR6) y sus respectivos ligandos en el hígado (la quimiocina CXCL12 o factor 1 derivado de células estromales (SDF-1, por sus siglas en inglés) y la quimiocina CCL20 o proteína inflamatoria de macrófagos alpha 3 (MIP-3 α , por sus siglas en inglés)), los cuales contribuyen respectivamente a la quimiotaxis de las células colorrectales con sobreexpresión de dichos receptores, facilitando así el proceso metastásico¹⁶. Además, los exosomas, cuya función va a ser descrita posteriormente en este trabajo, van a desempeñar un papel clave en la migración celular por medio de los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR6¹⁷.

Con respecto a las perspectivas de tratamiento de un paciente con metástasis hepática a partir del CCR, la hepatectomía es el único tratamiento eficaz asociado a la curación. Sin embargo, únicamente un 10-15% de los pacientes es objeto de resección en el momento del diagnóstico y, de los pacientes que se someten a cirugía, alrededor de un 50% experimenta recidivas en el futuro¹⁸. A pesar de que la administración de quimioterapia sistémica neoadyuvante logra revertir la irresecabilidad de las metástasis hepáticas en un 10-30% de los pacientes¹⁹, continúa existiendo un importante porcentaje de pacientes en los que la resección hepática no se considera una opción terapéutica. Este hecho ha conducido al desarrollo de técnicas preoperatorias, como la embolización de la vena porta previa a la resección, en aquellos pacientes con un remanente hepático pequeño tras la cirugía. Mediante esta técnica, con el objetivo de asegurar la función hepática, se procede al bloqueo del flujo sanguíneo portal en la parte del hígado donde se localiza el tumor, produciendo una atrofia ipsilateral de esa área y provocando, por consiguiente, una hiperplasia compensatoria del remanente hepático²⁰. Se ha demostrado que un 60% de los pacientes a priori rechazados para ser sometidos a resección hepática por escaso volumen de hígado remanente puede ser objeto de resección tras la embolización portal¹⁸. A pesar de ser un resultado prometedor, la inexistencia de una única terapia completamente eficaz para hacer frente a la metástasis hepática conduce a la elección de una estrategia terapéutica combinada en el manejo de esta enfermedad¹⁸.

En los últimos años, ante la falta de tratamientos eficaces frente a uno de los mayores retos en el cáncer, la metástasis, se estudian nuevas estrategias que ayuden tanto al diagnóstico precoz como al tratamiento eficaz de este proceso. Para ello se analizan los mecanismos desencadenantes del proceso metastásico, con el fin de elucidar factores que estén implicados en su regulación. Unas moléculas que han demostrado tener un papel clave en el cáncer y, concretamente, en la modulación del proceso metastásico, son los microARNs, cuyo potencial poder diagnóstico y terapéutico puede ser de utilidad en la clínica oncológica²¹.

3.2. MicroARNs y su desregulación en la metástasis hepática de origen colorrectal

Los microARNs (miARNs o miRs) son pequeñas secuencias de ARN no codificante constituidas por un número variable de nucleótidos, que suele oscilar entre 18 y 22¹¹. Estas moléculas participan en diferentes actividades celulares, entre ellas la síntesis de insulina²², la respuesta inmune²³ y la síntesis de neurotransmisores²⁴, relacionándose con ciertas patologías asociadas a dichas funciones, tales como diabetes²², procesos autoinmunes²³ y enfermedad de Alzheimer²⁵ respectivamente. Además, cabe destacar la implicación de los miARNs en la regulación de dos procesos celulares vitales, la proliferación y la apoptosis, lo que puede conducir al desarrollo de un proceso tumoral si se produce una desregulación de su expresión¹⁰.

La biogénesis de los miARNs [Figura 1] es un proceso complejo en el que se suceden diversas etapas²⁶. Comienza en el núcleo, donde se forma un transcrito primario (pri-miARN) a partir de la ARN polimerasa II. El pri-miARN es escindido por el complejo microprocesador formado por Drosha (ribonucleasa (RNasa) III) y la proteína de la región crítica del gen 8 del síndrome DiGeorge (DGCR8, por sus siglas en inglés), resultando en un precursor en forma de horquilla (pre-miARN) exportado fuera del núcleo por la exportina 5, una proteína RanGTP dependiente. En el citoplasma, una RNasa denominada Dicer, junto con una proteína de unión a ARN en respuesta a transactivación (TRBP, por sus siglas en inglés), escinde el pre-miARN transformándolo en un miARN de doble cadena. Una de las hebras es degradada, mientras que la otra hebra funcional se ensambla con las proteínas Argonauta (AGO) en el complejo silenciador inducido por ARN (RISC, por sus siglas en inglés), conduciendo al silenciamiento del ARN mensajero (ARNm) diana mediante dos mecanismos: inhibiendo la traducción y/o provocando su degradación^{26,27}. La elección de uno de estos dos mecanismos depende de la complementariedad de bases entre el miARN y el ARNm diana, llevando a la degradación del ARNm en caso de perfecta complementariedad entre ambas moléculas o, por el contrario, inhibiendo su traducción en aquel escenario donde ambas secuencias no muestren una complementariedad absoluta²⁶. La interacción específica del miARN con el ARN mensajero diana tiene lugar en la región no traducida del extremo 3' del ARNm (3' UTR)²⁶. Debido a su actuación a nivel postranscripcional sobre el ARNm, los microARNs juegan un papel importante en la regulación postranscripcional de diferentes genes.

Se estima que el genoma humano codifica alrededor de 1.000 miARNs. Debido a que el número de ARN mensajeros es de aproximadamente 30.000, cabe estimar que un único miARN puede regular y tener como diana a cientos de ARN mensajeros²⁸.

La regulación de los miARNs tiene lugar mediante procesos similares a los encargados de la regulación de otros ARNs, como son la activación e inhibición transcripcional, la represión

epigenética o el control de su tasa de degradación²⁹. Polimorfismos de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) en los genes que codifican los miARNs pueden alterar la biogénesis de estos e influenciar de esta manera en la selección de dianas y en la consiguiente susceptibilidad de desarrollar un tipo de cáncer³⁰. Alrededor de un 50% de los genes codificantes de miARNs se localiza en regiones del genoma asociadas al desarrollo de un proceso tumoral, lo que conlleva que ciertos miARNs puedan desempeñar un papel crucial en su patogénesis³¹.

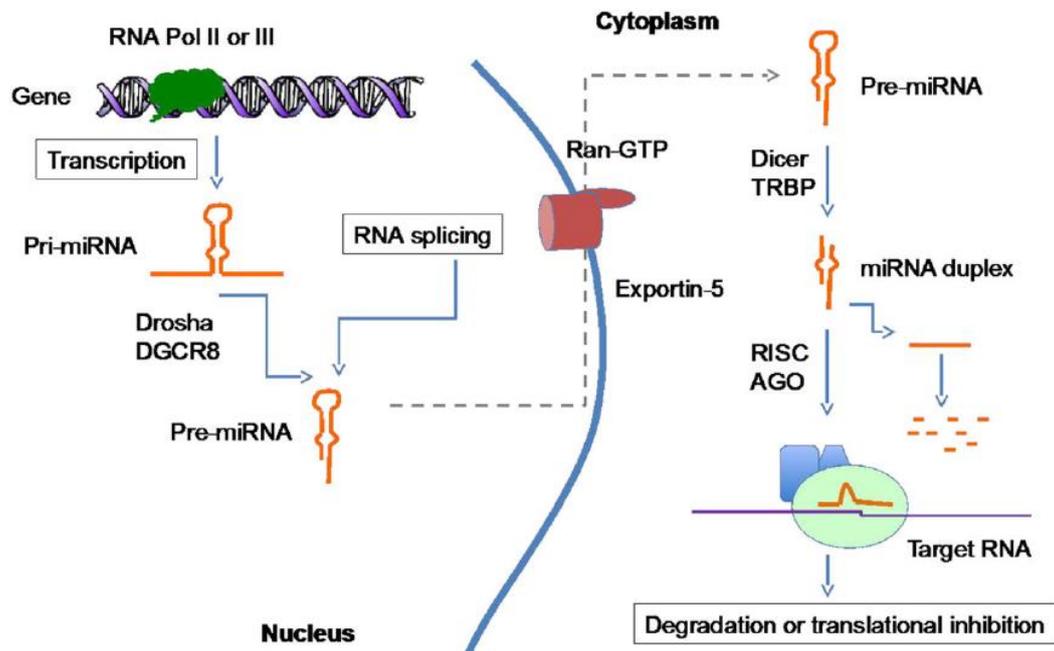


Figura 1. Biogénesis y función de los miARNs²⁷.

En el cáncer, los microARNs se comportan principalmente de dos modos: actuando como oncogenes o participando como genes supresores de tumores, dependiendo del tipo de gen que regulen y encontrándose generalmente sobreexpresados o silenciados respectivamente. Debido a su función como reguladores de procesos de proliferación y apoptosis, los miARNs se convierten en herramientas de utilidad en el diagnóstico y tratamiento de diferentes tipos de cáncer. Los miARNs que actúan como oncogenes, también llamados “oncomirs”, inducen el desarrollo tumoral mediante la inhibición de genes supresores tumorales y/o a través de la supresión de genes encargados del control de la diferenciación y la apoptosis. Por su parte, los miARNs que actúan como genes supresores de tumores son los responsables de frenar el crecimiento tumoral por su acción inhibitoria sobre los oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación y la apoptosis¹⁰.

Michael et al. (2003)³² publican un artículo en el que se reporta la primera asociación entre miARNs y el CCR, observando en él una expresión disminuida del miR-143 y miR-145 en

comparación con tejido colorrectal normal. Debido al silenciamiento de estos miARNs y mediante la identificación de sus genes diana, determinan la sobreexpresión de diversas proteínas implicadas en la oncogénesis, lo que puede explicar el proceso tumoral colorrectal. Desde entonces, a través de diferentes bases de datos de microARNs, se han identificado diversos miARNs implicados en el CCR y, concretamente, en su progresión hacia la metástasis hepática¹⁷.

La alteración de ciertas vías de señalización como la vía Wnt/ β catenina, la ruta mediada por el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, por sus siglas en inglés), la vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF β , por sus siglas en inglés) y la vía del gen TP53, ha demostrado tener un papel clave en el crecimiento, invasión y metástasis del CCR. Por otra parte, el gen APC (*Adenomatous polyposis coli*) es un gen supresor tumoral con efecto inhibitorio sobre la vía de señalización Wnt/ β catenina que aparece mutado en un 90% de los casos de CCR, lo que contribuye al desarrollo tumoral y al proceso metastásico. Existen diversos estudios en los que se identifican miARNs implicados en la alteración de la señalización APC/Wnt/ β catenina, ya sea por acción inhibitoria sobre el gen APC (miR-135a/b, miR-494, miR-19a) y la activación de la vía Wnt (miR-21, miR-155, miR-103a, miR-1827, miR-145, miR-34a) o indirectamente a través de otros miembros de esta vía de señalización¹⁷.

A su vez, los miARNs implicados en la alteración de estas vías se clasifican como miRs oncogénicos o miRs supresores tumorales, cuya sobreexpresión o silenciamiento respectivamente se relaciona con la progresión del cáncer colorrectal¹⁷. Un estudio llevado a cabo por Asangani et al. (2008)³³ expone el miARN-21 como un miR oncogénico responsable de la invasión e intravasación de células colorrectales tumorales, contribuyendo al proceso metastásico. Concretamente, investigan el silenciamiento por parte de este miARN del ARNm responsable de codificar la proteína de muerte celular programada 4 (Pdc4, por sus siglas en inglés), una proteína supresora tumoral encargada de inhibir la iniciación y progresión tumoral. Además, Liu et al. (2018)³⁴ demuestran que Pdc4 es capaz de inducir la apoptosis mediante la supresión de la vía Wnt/ β catenina, por lo que el silenciamiento del gen que codifica Pdc4 por parte del miR-21, según el estudio desarrollado por Asangani et al. (2008)³³, llevaría a la activación de esta vía de señalización y, por consiguiente, a la promoción del proceso tumoral.

Por otra parte, Geng et al. (2014)³⁵ determinan mediante la reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa con transcriptasa inversa en tiempo real (RT-qPCR, por sus siglas en inglés) que líneas celulares de cáncer de colon con potencial capacidad metastásica (HCT116, RKO, RCA y GEO) muestran una expresión del miARN-192 (un miR supresor

tumoral) cien veces menor que líneas celulares con bajo o nulo poder metastásico (FET y HCT116b), lo que conduce a la posible correlación inversa entre este miARN y el desarrollo de metástasis. Estos autores demuestran que el silenciamiento del miARN-192 en células colorectales tumorales conduce a la sobreexpresión de tres genes prometastásicos (Bcl-2, Zeb-2 y VEGFA)³⁵, cuya expresión a su vez puede verse afectada por la activación o inhibición de la vía de señalización Wnt/ β catenina^{36,37}. La sobreexpresión de Bcl-2, Zeb-2 y VEGFA se traduce en una disminución de la apoptosis, una reducción de la expresión de E-cadherina y un incremento de la angiogénesis respectivamente, tres pasos clave en el proceso metastásico³⁵. Geng et al. (2014)³⁵ señalan una reducción significativa de los niveles del miARN-192 en pacientes con CCR en estadio IV comparado con estadios más tempranos [Figura 2], lo que contribuye a su utilidad como biomarcador diagnóstico de la metástasis hepática de origen colorrectal.

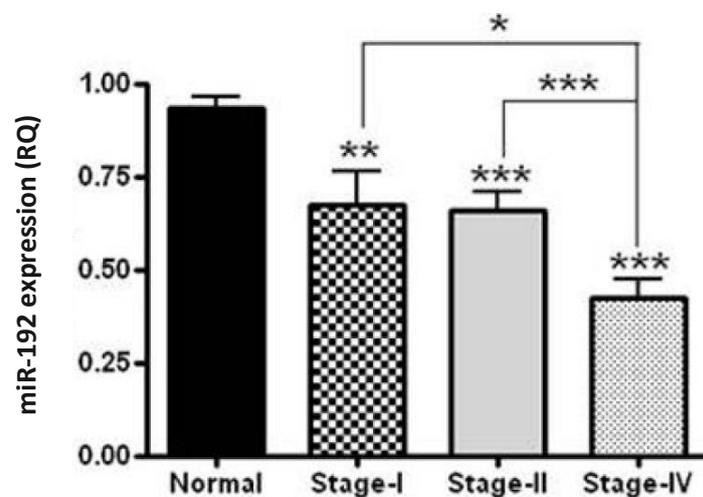


Figura 2. Expresión del miR-192 en muestras de 22 individuos sanos y 29 pacientes con diagnóstico de CCR en diferentes estadios. * $p < 0.02$, ** $p < 0.004$, *** $p < 0.001$. Los resultados se expresan como media \pm error estándar de la media, obtenidos por RT-qPCR³⁵.

3.2.1. Exosomas como vehículos de microARNs en la metástasis hepática de origen colorrectal

Los exosomas son pequeñas vesículas extracelulares (VEs) secretadas por la mayor parte de las células, incluidas las células tumorales. Se originan a partir de la fusión de cuerpos multivesiculares procedentes del sistema endosomal junto con la membrana plasmática de la célula. En el interior de estas vesículas se pueden cargar diferentes biomoléculas como lípidos, proteínas o miARNs, siendo estas últimas las más estudiadas por su implicación en la progresión del cáncer. El contenido de los exosomas es transferido hacia células receptoras de un órgano distinto del que se originaron³⁸.

Una de las principales características de los exosomas liberados por las células tumorales es su organotropismo, esto es, la afinidad de estas vesículas por órganos específicos. Este hecho sucede debido a la presencia de ciertas moléculas en su membrana, lo que contribuye a su dirección hacia ciertos órganos diana, en los cuales se encuentran sus respectivos ligandos específicos³⁹. Tal como se ha comentado anteriormente, en la metástasis hepática de origen colorrectal el mecanismo de interacción ligando-receptor entre los receptores de quimiocinas CXCR4 y CCR6 (sobrexpresados en células colorrectales tumorales) y sus respectivos ligandos SDF-1 y MIP-3 α (localizados en el hígado), sucede también por medio de exosomas^{16,17}. Wang et al. (2015)⁴⁰ demuestran que la inyección intravenosa *in vivo* de exosomas liberados por una línea celular de cáncer de colon con potencial capacidad metastásica a hígado (HT-29) promueve la metástasis hepática del CCR mediante el incremento de la expresión del receptor CXCR4 en diferentes células estromales, favoreciendo por consiguiente su reclutamiento en el hígado con el fin de generar un microambiente metastásico favorable.

Debido a la secreción de exosomas por diversidad de tipos celulares, resulta imprescindible disponer de marcadores específicos que ayuden a la caracterización de los exosomas según su procedencia. Un estudio llevado a cabo por Teng et al. (2017)⁴¹, publicado en la revista *Nature*, consigue dicha diferenciación mediante la transfección de vectores plasmídicos con secuencias lentivirales en la línea celular de carcinoma de colon murino CT26 [Figura 3]. Dichos vectores expresan la biotina ligasa BirA y un marcador de membrana (GlucB) consistente en una proteína luciferasa (Gaussia luciferasa) fusionada a un péptido aceptor de biotina y localizado tanto en la membrana plasmática de la célula como en los exosomas secretados. Este marcador de membrana permite la visualización de los exosomas secretados por la línea celular CT26 mediante imágenes multimodales, esto es, mediante la integración de diferentes técnicas de imagen⁴¹. Gaussia luciferasa, un tipo de enzima bioluminiscente, cataliza la oxidación de una luciferina conocida como coelenterazina⁴², emitiendo una fuerte señal bioluminiscente. El marcador, por su parte, es biotinizado en las células en presencia de la biotina ligasa tras la unión de la biotina al péptido aceptor de biotina. Una vez fusionada la biotina, se conjuga con la estreptavidina, una proteína de gran afinidad por la biotina, facilitando su observación a través de la tomografía mediada por fluorescencia (FMT, por sus siglas en inglés)^{41,43}. De esta manera, se plantea la posible utilidad de estos marcadores para monitorizar *in vivo* los exosomas secretados por células colorrectales tumorales a través de órganos o fluidos biológicos, pudiendo visualizar los principales órganos diana a los que se dirigen a formar un nuevo tumor⁴¹.

Una vez aislados los exosomas específicos que llevan a la metástasis hepática de origen colorrectal, es de utilidad identificar su contenido en miARNs. Mediante técnicas de RT-qPCR,

Teng et al. (2017)⁴¹ detectan que la mayor parte de miARNs ensamblados y transportados en el interior de los exosomas liberados desde células tumorales son miARNs supresores tumorales, mientras que los miARNs oncogénicos permanecen en dichas células. Esto explica el hecho por el cual, generalmente, los miARNs supresores de tumores se encuentran silenciados en las células tumorales y los miARNs oncogénicos aparecen sobreexpresados. Sin embargo, existen excepciones, como es el caso del miR-21⁴⁴ y el miR-328¹⁷, miARNs oncogénicos cuyos niveles están aumentados en los exosomas secretados por células tumorales colorrectales, asociándose a la progresión del CCR hacia la metástasis hepática.

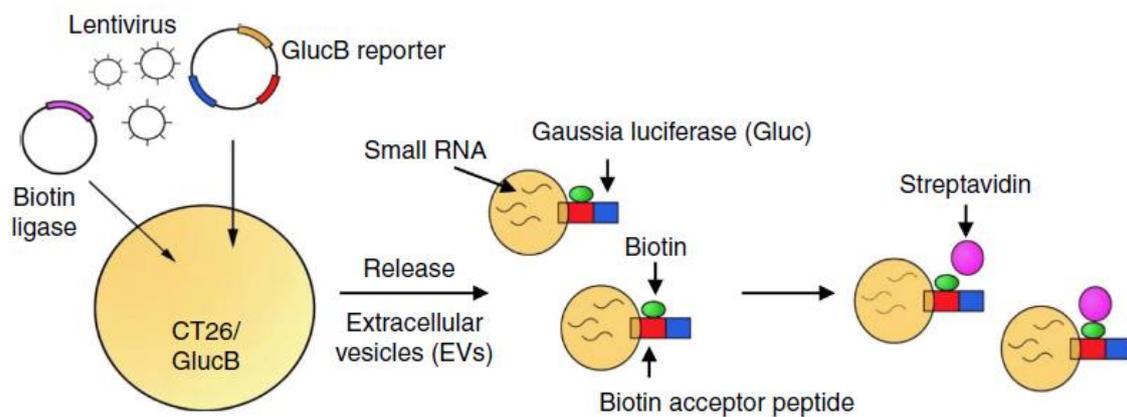


Figura 3. Representación esquemática del aislamiento de vesículas extracelulares (VEs) procedentes de la línea celular de carcinoma colorrectal CT26, transfectada con vectores plasmídicos con secuencias lentivirales que expresan la biotina ligasa BirA y un marcador de membrana (GlucB) consistente en una proteína luciferasa (Gaussia luciferasa) fusionada a un péptido aceptor de biotina⁴¹.

Teng et al. (2017)⁴¹ revelan el poder del miARN-193a en promover la progresión del CCR hacia la metástasis hepática. Tras analizar los exosomas procedentes del plasma de 40 pacientes con CCR, determinan que aquellos con diagnóstico de metástasis hepática (25 pacientes) presentan niveles más elevados de miARN-193a en su interior (según análisis de RT-qPCR) comparado con los que no presentan metástasis hepática al inicio del estudio (15 pacientes). Además, observan que la proteína de bóveda principal (MVP, por sus siglas en inglés) es la responsable del transporte de este miARN desde las células tumorales hasta los exosomas, aumentando así la progresión del CCR [Figura 4]. Este hecho se apoya en el incremento de los niveles de miARN-193a en la línea celular colorrectal tumoral CT26 si se silencia la proteína MVP mediante el sistema CRISPR/Cas9.

El miARN-193a es un microARN supresor tumoral que, mediante su unión a la región 3' UTR del ARNm de Caprin1 [Figura 4], detiene el ciclo celular en la fase G1, impidiendo la proliferación. El ensamblaje del miARN-193a en exosomas provoca su silenciamiento en las

células del tumor primario, perdiendo su capacidad supresora de tumores y permitiendo, por tanto, la acción de Caprin1 en la promoción del ciclo celular⁴¹. Hejazi et al. (2020)⁴⁵ determinan que el miARN-193a regula, además, la expresión de genes relacionados con el proceso de transición epitelial-mesenquimal, disminuyendo la expresión de vimentina (una proteína implicada en el estado mesenquimal) y de la metaloproteínasa de matriz 9 (MMP-9, por sus siglas en inglés). Estos autores exponen una estrategia terapéutica combinada mediante la reposición del miARN-193a en las células tumorales colorrectales y el empleo del antineoplásico paclitaxel (Taxol®), proponiendo una terapia prometedora en el futuro del CCR⁴⁵.

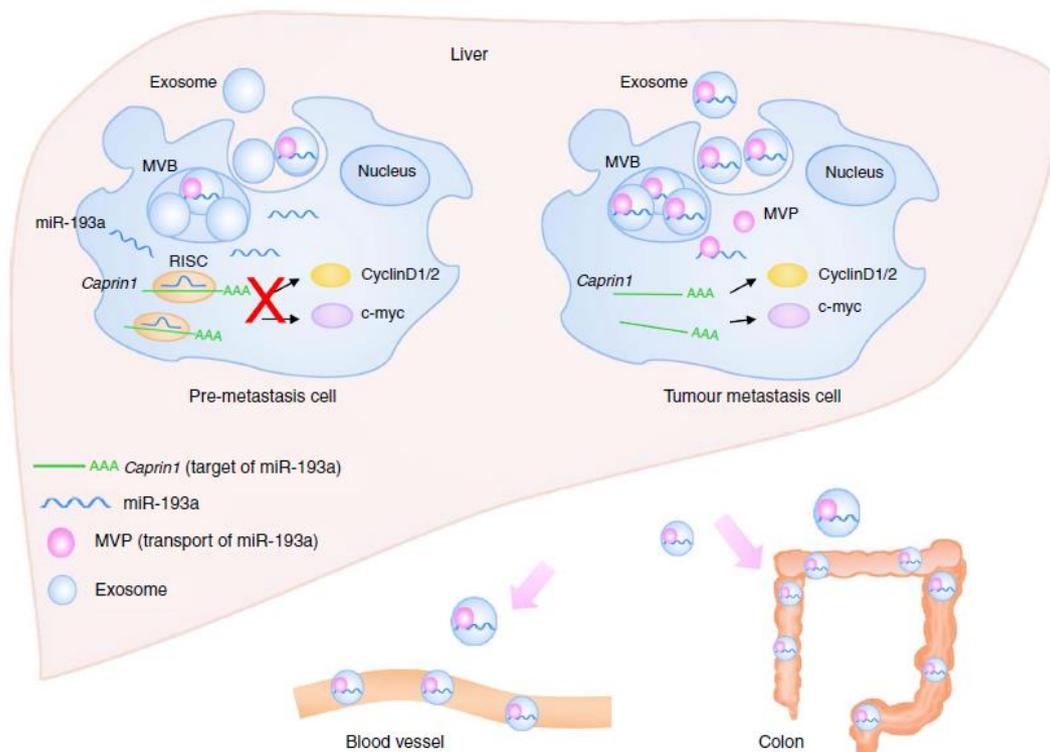


Figura 4. Representación gráfica del desarrollo de metástasis hepática de origen colorrectal mediante la exportación del miR-193a en exosomas vía MVP. MVB; cuerpos multivesiculares⁴¹.

Otro ejemplo relevante de miARN supresor tumoral presente en mayores cantidades en los exosomas de pacientes con metástasis hepática es el miR-126⁴¹. Liu et al. (2014)⁴⁶ asocian la expresión disminuida del miR-126 en las células colorrectales tumorales con un mal pronóstico del CCR, debido principalmente a la sobreexpresión del receptor CXCR4 en dichas células.

Con respecto a los miARNs oncogénicos, Shao et al. (2018)⁴⁴ detectan exosomas portadores del miR-21 liberados por células de carcinoma colorrectal y demuestran que este miARN induce la liberación de la interleucina 6 (IL-6) por las células de Kupffer (macrófagos residentes

en el hígado) mediante el receptor tipo Toll 7 (TLR7, por sus siglas en inglés) presente en estas células. Asimismo, la inducción del miR-21 por parte de IL-6 en el hígado contribuye al potencial oncogénico del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3, por sus siglas en inglés), el cual ha demostrado a su vez incrementar la producción de IL-6 por parte de los macrófagos hepáticos. Además, se detecta a nivel hepático un incremento de los miembros de la familia de proteínas ligadoras de calcio S100A y de las metaloproteinasas de matriz extracelular (MMPs), así como una disminución de la apoptosis, contribuyendo al proceso metastásico [Figura 5]. Por tanto, la generación de este microambiente pro-inflamatorio favorece la supervivencia de las células colorrectales tumorales en el hígado, conduciendo a la colonización y establecimiento de la metástasis hepática.

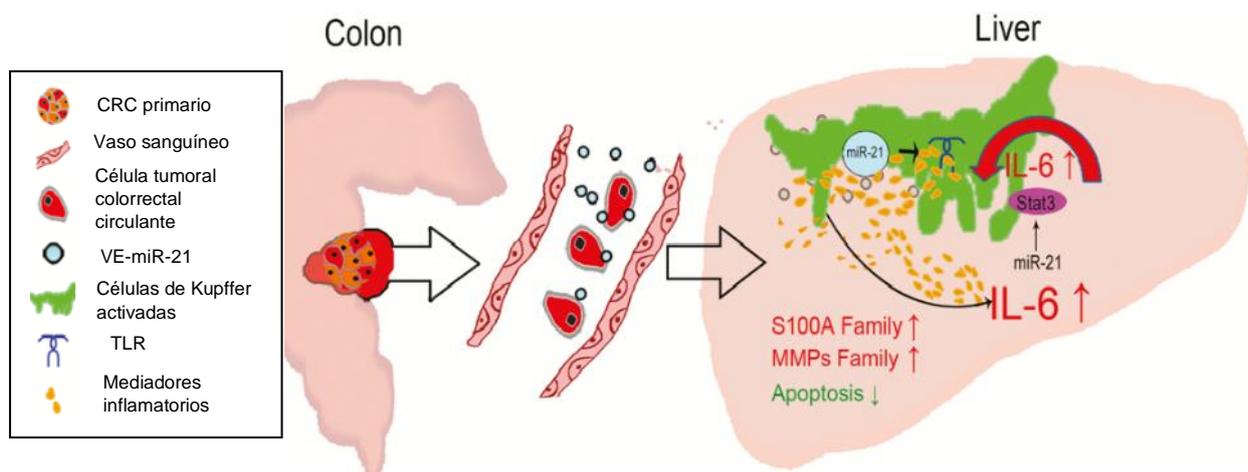


Figura 5. Representación gráfica del establecimiento de un nicho premetastásico inflamatorio en el hígado mediado por el miR-21 contenido en exosomas liberados por células colorrectales tumorales⁴⁴.

3.2.2. Implicación de la metilación en la desregulación de microARNs

La expresión de miARNs en el CCR se encuentra alterada y dicha desregulación puede ser debida a múltiples causas, tales como mutaciones génicas, anomalías cromosómicas o cambios epigenéticos. Estos últimos requieren especial atención debido a la regulación de la expresión de miARNs mediante la metilación en las islas CpG (secuencias ricas en citosina-guanina) de las regiones promotoras que controlan la transcripción de miARNs^{16,47}.

Un ejemplo de miARN donde la metilación juega un papel clave en la progresión del CCR hacia la metástasis hepática es el miARN-200c, relacionado con el proceso de transición epitelial mesenquimal⁴⁸. Mediante la unión del grupo metilo en el carbono 5' de la citosina la expresión de genes queda silenciada⁴⁹. Por tanto, debido a la hipermetilación, las células colorrectales del tumor primario presentan una expresión mínima del miARN200c, lo que

conduce a la sobreexpresión de sus genes diana (ZEB1, ETS1 Y FLT1), normalmente silenciados por la acción de este miARN. Estos genes son inductores de la EMT y su expresión conlleva una disminución de la proteína de adhesión E-cadherina, además de una sobreexpresión de la vimentina. La pérdida de E-cadherina provoca la disminución de la adhesión entre las células, proporcionándoles libertad de movimiento hacia otros órganos, como el hígado, donde pueden originar focos metastásicos⁴⁸. Para que el proceso de metástasis sea efectivo las células epiteliales que han pasado a su forma mesenquimal tienen que volver a su estado epitelial, con el fin de recuperar su capacidad proliferativa y crecer en este nuevo órgano, proceso denominado transición mesenquimal epitelial (MET, por sus siglas en inglés)⁵⁰. Se determina que el miARN200c desempeña también un papel crucial en este segundo escenario, donde la hipometilación de las regiones promotoras provoca la recuperación de su expresión, silenciando sus genes diana inductores de la EMT. De esta manera, se produce una elevada expresión de E-cadherina y una baja expresión de vimentina, lo que conduce a una proliferación de las células metastásicas en el hígado, favoreciendo el proceso metastásico⁴⁸.

Otros ejemplos relevantes son los miembros de la familia del miARN-34 (miR-34a, miR-34b y miR-34c), miR supresor tumoral regulado por p53, una de las proteínas supresoras tumorales más importantes⁵¹. Diversos estudios demuestran que la expresión de este miARN aparece disminuida en células colorrectales tumorales^{52,53}. Esta desregulación de su expresión parece ser debida a la hipermetilación de las regiones promotoras, según un estudio realizado por Roy et al. (2012)⁵⁴, contribuyendo a la progresión del CCR.

Estos resultados conducen a la exploración de moléculas capaces de desmetilar las regiones promotoras de los genes de estos miARNs. Azacitidina (Vidaza®) y decitabina (Dacogen®) se presentan como agentes desmetilantes útiles en el tratamiento de neoplasias hematológicas. Cowan et al. (2010) demuestran, además, su actividad en ciertos tumores sólidos, pudiendo ser de utilidad en el CCR. Sin embargo, su perfil de efectos adversos requiere consideración⁵⁵. Con respecto a la familia del miARN-34, Roy et al. (2012)⁵⁴ proponen un análogo sintético de la curcumina (CDF, la curcumina difluorada) como agente desmetilante capaz de recuperar la expresión de este miR y, por tanto, de reducir la expresión de su gen diana Notch-1, atenuando la migración de las células colorrectales tumorales hacia el hígado.

3.3. Técnicas diagnósticas y sistemas de administración de microARNs

Debido al limitado abordaje terapéutico frente a un paciente con metástasis hepática a partir del CCR, se abre la posibilidad de monitorizar en la clínica los niveles de miARNs en el suero o plasma de pacientes con un diagnóstico de CCR, con el fin de evitar una detección tardía de su progresión hacia la metástasis hepática⁴¹. Las técnicas clásicas para la detección de

miARNs incluyen RT-qPCR a tiempo real, Northern blot y microarrays. La primera de ellas presenta una elevada sensibilidad y se considera la técnica de elección para la cuantificación de miARNs. Con respecto a Northern blot, su alta especificidad le convierte en una técnica de interés para la detección de miARNs, no obstante, se trata de un método tedioso y de alto coste. Por su parte, la tecnología de microarrays permite una detección rápida y de multitud de genes simultáneamente, pero su mayor coste y su baja sensibilidad y especificidad limitan su aplicabilidad⁵⁶. En la actualidad, el uso de genosensores electroquímicos (biosensores para la detección específica de ácidos nucleicos) se presenta como alternativa a dichas técnicas en la detección y monitorización de miARNs. Este sistema se basa en la detección de miARNs mediante secuencias complementarias de oligonucleótidos y en su posterior transducción en una señal eléctrica, procesada por sistemas electrónicos⁵⁷. Lusi et al. (2009)⁵⁸ consiguen por primera vez la detección del miARN-122 mediante un genosensor electroquímico, basado en un método sin marcaje, a través de la oxidación de la guanina tras la hibridación de dicho miARN con una sonda libre de guanina (sustituida por inosina). De esta manera, la oxidación de la guanina del analito genera una señal eléctrica, detectada mediante voltametría de uso diferencial. Se trata de una determinación rápida, costo-efectiva, no radiactiva y ultrasensible. Además, el hecho de no requerir marcaje evita el empleo de sustancias potencialmente tóxicas unidas a los miARNs. Sin embargo, existen todavía ciertos retos a los que deben hacer frente las técnicas diagnósticas de miARNs en un futuro, como son la similitud de las secuencias entre los diferentes miARNs y su corta longitud, complicando el diseño de secuencias complementarias de detección⁵⁶.

Por otra parte, el descubrimiento de miRs oncogénicos sobreexpresados y miRs supresores tumorales silenciados conduce al desarrollo de moléculas capaces de inhibirlos (antagonistas de miARNs (anti-miRs)) y de reponerlos (miARN mímicos) respectivamente⁵⁹. Uno de los factores que influye en la eficacia de los miARNs es la expresión de ciertas enzimas involucradas en su procesamiento, como el complejo RISC o la enzima Dicer. En ciertas células tumorales la expresión de estas enzimas aparece silenciada, llevando a una incorrecta formación de los miARNs. Este hecho se podría evitar mediante el empleo de miARNs maduros como agentes terapéuticos, de manera que sean independientes de las enzimas procesadoras⁵⁹.

La terapia basada en miARNs ofrece una serie de ventajas frente a las terapias convencionales. Principalmente, permite el desarrollo de terapias personalizadas en función del perfil de miARNs desregulados en las células tumorales del paciente⁶⁰. Por otra parte, su capacidad de actuación multidiana los convierte en agentes terapéuticos de interés en el proceso metastásico, caracterizado por la desregulación de diferentes genes en sus diversas etapas. Sin embargo, dicha capacidad de unión a diferentes ARN mensajeros requiere

consideración, ya que su administración indiscriminada conduciría al bloqueo de la síntesis de diferentes proteínas, llevando a la aparición de serios efectos adversos⁶¹. Por este motivo, además de por su inestabilidad en el suero y su incapacidad para atravesar membranas biológicas, es necesario el desarrollo de sistemas de administración específicos con el fin de lograr la incorporación de miARNs y de sus antagonistas en las células diana específicas. Como consecuencia, se han desarrollado diversas estrategias terapéuticas de administración basadas en miARNs, distinguiéndose principalmente aquellas de administración local y sistémica⁵⁹.

Los sistemas de administración local se basan tanto en la inyección intratumoral de vectores de miARNs como en la administración de sistemas de nanopartículas específicamente en el tumor que se quiere tratar. No consiste en una opción útil en cánceres metastásicos, por lo que su utilidad queda limitada a tumores fácilmente accesibles, como el melanoma no metastásico, con la ventaja frente a la administración sistémica de una reducida toxicidad en órganos sanos no diana⁵⁹.

Con respecto a la administración sistémica, las reacciones de inmuno y neurotoxicidad a través de receptores tipo Toll (TLR) son los eventos adversos que requieren mayor atención, pudiendo limitar su aplicabilidad⁵⁹. Se están investigando diferentes estrategias para la administración segura y eficaz de miARNs⁵⁹ y anti-miRs⁶² en aquellos tumores donde se persiga recuperar o silenciar la expresión de los miARNs respectivamente. Principalmente, cabe destacar las modificaciones químicas y los sistemas de administración virales y no virales^{59,62,63}.

Modificaciones químicas en el grupo 2' OH: Se trata de un grupo hidroxilo presente en la posición 2' del anillo de ribosa de los nucleótidos, susceptible al ataque de las nucleasas de la circulación sanguínea. Mediante la metilación (2'O-Me) o la incorporación de un grupo metoxietilo (2'O-MOE) en este grupo hidroxilo, se ha observado un incremento de su estabilidad frente a la degradación por parte de las nucleasas^{62,63}.

Sistemas virales de administración de microARNs: Diferentes virus (adenovirus, lentivirus, retrovirus) pueden ser utilizados como vectores para la administración de miARNs o anti-miRs. La encapsulación de los genes de interés en el vector viral provoca, tras la infección viral, su integración en el genoma de la célula diana (en el caso de retrovirus y lentivirus) o la incorporación del gen en el núcleo de la célula en forma extracromosómica (si se utilizan vectores adenovirales). Con el fin de lograr una selección específica de las células diana tumorales donde se desee transducir el material genético de interés se pueden realizar modificaciones genéticas en la cápside vírica, de manera que el vector tenga afinidad por

receptores específicos de células tumorales. A pesar de su eficacia, el potencial carácter inmunogénico y la posible reactivación viral los convierte en herramientas menos seguras frente a los sistemas de administración no virales⁵⁹.

Sistemas de administración no viral de microARNs: A pesar de su menor eficacia en la transfección celular de miARNs, en comparación con vectores virales, existen diversas publicaciones^{64,65} en las que se demuestra su potencial para reducir la metástasis hepática de origen colorrectal. Diversos estudios *in vitro* analizan la efectividad de la encapsulación del miARN-34a en nanopartículas en cuanto a su penetrabilidad en la célula, su liberación desde la nanopartícula y su capacidad de actuación sobre el ARNm diana [Figura 6]⁶⁴. MRX34, una nanopartícula lipídica anfótera liposomal cargada con mímicos del miARN-34, consiste en la primera terapia basada en miARNs desarrollada⁶⁴. En el año 2013, su seguridad, farmacocinética y farmacodinamia fue evaluada en un ensayo clínico (NCT01829971)⁶⁶ en fase I, abierto y multicéntrico. Participaron 155 pacientes con diagnóstico de 7 tipos diferentes de cáncer, incluyendo hepatocarcinoma primario irresecable o con metástasis hepática a partir de otros tumores primarios. El régimen de dosis consistió en la administración intravenosa de MRX34 durante 5 días, seguida de dos semanas de descanso, durante 3 ciclos. Sin embargo, este estudio no prosiguió debido a la aparición de serios eventos adversos inmunológicos en 5 casos⁶⁶. A pesar de ello, otros estudios han continuado investigando su papel como terapia oncológica, debido a que la amplia distribución del miARN-34 en distintos órganos conlleva que MRX34 pueda ser de utilidad en diversos tipos de cáncer si se consigue la seguridad en su administración⁶⁴.

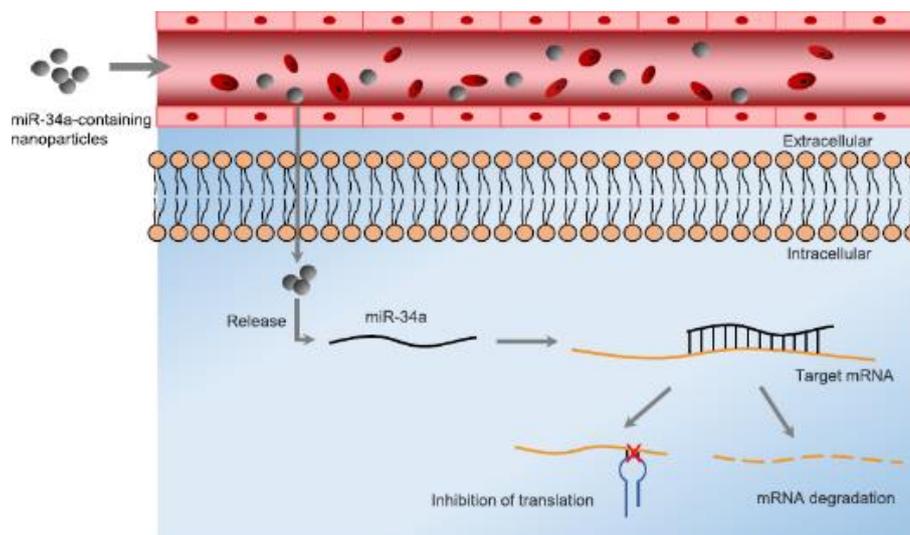


Figura 6. Administración sistémica del miR-34a encapsulado en nanopartículas, lo que permite atravesar membranas biológicas y penetrar en el interior celular, donde se libera el miR-34a. Tras su liberación, se une a la región 3' UTR del ARN mensajero diana, provocando su degradación o inhibiendo su traducción⁶⁴.

Márquez et al. (2018)⁶⁵ desarrollaron unas nanopartículas de sulfato de condroitina (CS), oleilamina (OA) y monooleato de sorbitano (SP), que conjugadas con el miARN-20a, [Figura 7] se dirigen específicamente a las células endoteliales de los sinusoides hepáticos (CESHs), uno de los primeros tipos celulares en el hígado en entrar en contacto con las células metastásicas de origen colorrectal. Se trata de un material biocompatible y biodegradable con afinidad por los receptores de ácido hialurónico y de manosa, presentes en las CESH. El estudio se centra en la restauración del miARN-20a silenciado en las CESH debido a que el silenciamiento de este miR se relaciona con la activación de las CESH tras su interacción con las células de origen colorrectal. En concreto, el silenciamiento del miR-20a produce una sobreexpresión de las proteínas E2F1 y ARHGAP1 en las células endoteliales, lo que provoca un aumento en la proliferación y migración de dichas células hacia el foco metastásico, favoreciendo la angiogénesis. La restauración del miARN-20a en las CESH mediante nanopartículas resulta en una reducción del 80% de la metástasis hepática *in vivo*, restringiendo su vascularización. Este resultado es esperanzador y sitúa al miARN-20a como potencial herramienta terapéutica en la metástasis hepática de origen colorrectal como terapia complementaria.

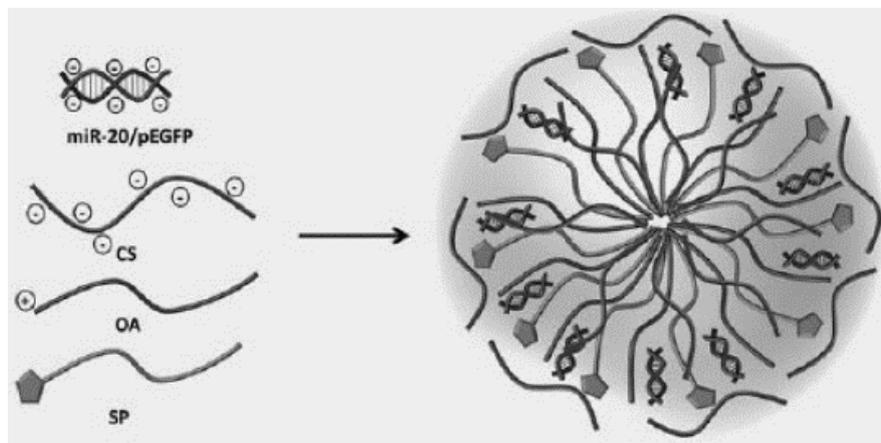


Figura 7. Diagrama esquemático de la composición de la nanopartícula conjugada con miR-20a⁶⁵.

Cada vez se desarrollan más estudios focalizados en crear sistemas de administración específicos que conduzcan a los miARNs o a sus antagonistas hacia su lugar diana. Una de las nuevas estrategias terapéuticas con potencial auge en un futuro próximo es el empleo de células madre mesenquimales como sistemas de transporte de miARN miméticos y anti-miRs. Estas células presentan un tropismo específico por la región diana, además de un eficiente transporte y liberación de su contenido a través de la formación de uniones tipo *gap* con la célula diana o mediante la secreción de exosomas. Asimismo, su bajo poder inmunogénico

las convierte en objeto de interés como sistemas de administración seguros en la terapia basada en miARNs^{59,67}.

4. Conclusión

El conocimiento de los mecanismos por los cuales los microARNs ejercen su función reguladora de genes los convierte en potenciales herramientas diagnósticas y terapéuticas en la clínica oncológica. La posibilidad de monitorizar los niveles de microARNs del suero o plasma de un paciente con CCR supone poder lograr una detección precoz de esta enfermedad, disminuyendo su capacidad de progresión hacia la metástasis hepática. Además, la ausencia de una estrategia terapéutica completamente eficaz frente a pacientes con metástasis hepática, junto con la detección de microARNs desregulados en el CCR y su relación con la progresión hacia dicha metástasis, ha conducido al desarrollo de terapias basadas en microARNs, lo que proyecta un futuro esperanzador en la medicina personalizada a través de terapias oncológicas individualizadas en función del perfil de microARNs de cada paciente. Sin embargo, es necesario continuar investigando nuevos microARNs desregulados, técnicas diagnósticas más específicas y sistemas de administración más seguros y eficaces, con el fin de explotar su potencial poder diagnóstico y terapéutico en la clínica.

5. Bibliografía

- (1) Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424.
- (2) Lamarca Lete A, Molina Villaverde R, López González JL, Álvarez-Mon Soto M. Cáncer colorrectal. *Medicine.* 2013;11(25):1519-1525.
- (3) Sociedad Española de Oncología Médica (SEOM) [Internet]. Madrid: SEOM; 2021 [consulta, 24/3/2021]. Las cifras del cáncer en España 2021. Disponible en: https://seom.org/images/Cifras_del_cancer_en_España_2021.pdf
- (4) Kuipers EJ, Grady WM, Lieberman D, Seufferlein T, Sung JJ, Boelens PG, et al. Colorectal cancer. *Nat Rev.* 2015;1:15065.
- (5) Steeg PS. Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges. *Nat Med.* 2006;12(8):895-904.
- (6) Asociación Española Contra el Cáncer (aecc) [Internet]. [consulta, 25/3/2021]. Cáncer de colon: Supervivencia y Esperanza de Vida. Disponible en: <https://www.aecc.es/es/todo-sobre-cancer/tipos-cancer/cancer-colon/evolucion-cancer-colon>
- (7) Van den Eynden GG, Majeed AW, Illemann M, Vermeulen PB, Bird NC, Høyer-Hansen G, et al. The multifaceted role of the microenvironment in liver metastasis: biology and clinical implications. *Cancer Res.* 2013;73(7):2031-2043.
- (8) Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg.* 2006;244(2):254-259.
- (9) Okugawa Y, Grady WM, Goel A. Epigenetic Alterations in Colorectal Cancer Emerging Biomarkers. *Gastroenterology.* 2015;149(5):1204-1225.
- (10) Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol.* 2007;302:1–12.
- (11) Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 2004; 116(2):281–297.
- (12) Correia MM, Choti MA, Rocha FG, Wakabayashi G, editors. Colorectal cancer liver metastases: a comprehensive guide to management. Switzerland: Springer; 2020.
- (13) Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(6):453-458.
- (14) Faivre J, Manfredi S, Bouvier AM. Epidemiology of colorectal cancer liver metastases. *Bull Acad Natl Med.* 2003;187(5):815–822.
- (15) Brodt P, editor. Liver metastasis: biology and clinical management. Montreal (Canada): Springer; 2011.

- (16) Beauchemin N, Huot J, editors. *Metastasis of colorectal cancer*. Dordrecht: Springer; 2010.
- (17) Balacescu O, Sur D, Cainap C, Visan S, Cruceriu D, Manzat-Saplacan R, et al. The Impact of miRNA in Colorectal Cancer Progression and Its Liver Metastases. *Int J Mol Sci*. 2018;19(12):3711.
- (18) Qin X, Xu J, Zhong Y, editors. *Multidisciplinary management of liver metastases in colorectal cancer: early diagnosis and treatment*. Dordrecht: Springer; 2017.
- (19) Gruber-Rouh T, Marko C, Thalhammer A, Nour-Eldin NE, Langenbach M, Beeres M, et al. Current strategies in interventional oncology of colorectal liver metastases. *Br J Radiol*. 2016;89(1064):20151060.
- (20) Azoulay D, Castaing D, Smail A, Adam R, Cailliez V, Laurent A, et al. Resection of nonresectable liver metastases from colorectal cancer after percutaneous portal vein embolization. *Ann Surg*. 2000;231(4):480-486.
- (21) Bouyssou JM, Manier S, Huynh D, Issa S, Roccaro A M, Ghobrial IM. Regulation of microRNAs in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1845(2):255–265.
- (22) Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, Ma X, Macdonald PE, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature*. 2004;432(7014):226-230.
- (23) O’Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2010;10(2):111-122.
- (24) Fiore R, Siegel G, Schratt G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta*. 2008;1779(8):471-478.
- (25) Nelson PT, Keller JN. RNA in brain disease: no longer just “the messenger in the middle”. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2007;66(6):461-468.
- (26) Dong H, Lei J, Ding L, Wen Y, Ju H, Zhang X. MicroRNA: function, detection, and bioanalysis. *Chem Rev*. 2013;11(8):6207-6233.
- (27) Kim J, Yao F, Xiao Z, Sun Y, Ma L. MicroRNAs and metastasis: small RNAs play big roles. *Cancer Metastasis Rev*. 2018;37(1):5-15.
- (28) Pritchard CC, Cheng HH, Tewari M. MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nat Rev Genet*. 2012;13(5):358-369.
- (29) Mohr AM, Mott JL. Overview of microRNA biology. *Semin Liver Dis*. 2015;35(1):3-11.
- (30) Hashemi M, Moradi N, Ziaee SA, Narouie B, Soltani MH, Rezaei M, et al. Association between single nucleotide polymorphism in miR-499, miR-196a2, miR-146a and miR-149 and prostate cancer risk in a sample of Iranian population. *J Adv Res*. 2016;7(3):491-498.
- (31) Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci*. 2004;101(9):2999-3004.

- (32) Michael MZ, O' Connor SM, van Holst Pellekaan NG, Young GP, James RJ. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res.* 2003;1(12):882-891.
- (33) Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene.* 2008;27(15):2128-2136.
- (34) Liu Y, Su D, Song T. Programmed cell death 4 inhibits proliferation and differentiation and induces apoptosis of human mesenchymal stem cells through suppressing the Wnt/ β catenin pathway. *RSC Adv.* 2017; 7:26566-26573.
- (35) Geng L, Chaudhuri A, Talmon G, Wisecarver JL, Are C, Brattain M, et al. MicroRNA-192 suppresses liver metastasis of colon cancer. *Oncogene.* 2014;33(46):5332-5340.
- (36) Kasprzak A. Angiogenesis-Related Functions of Wnt Signaling in Colorectal Carcinogenesis. *Cancers (Basel).* 2020;12(12):3601.
- (37) Huang L, Liu Z, Hu J, Luo Z, Zhang C, Wang L, et al. MiR-377-3p suppresses colorectal cancer through negative regulation on Wnt/ β -catenin signaling by targeting XIAP and ZEB2. *Pharmacol Res.* 2020;156:104774.
- (38) Simons M, Raposo G. Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol.* 2009;21(4):575-581.
- (39) Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, Rodrigues G, Hashimoto A, Tesic Mark M, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature.* 2015;527(7578):329-335.
- (40) Wang X, Ding X, Nan L, Wang Y, Wang J, Yan Z, et al. Investigation of the roles of exosomes in colorectal cancer liver metastasis. *Oncol Rep.* 2015;33(5):2445-2453.
- (41) Teng Y, Ren Y, Hu X, Mu J, Samykutty A, Zhuang X, et al. MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun.* 2017;8:14448.
- (42) Wu N, Kobayashi N, Tsuda K, Unzai S, Saotome T, Kuroda Y, et al. Solution structure of *Gaussia* Luciferase with five disulfide bonds and identification of a putative coelenterazine binding cavity by heteronuclear NMR. *Sci Rep.* 2020;10:20069.
- (43) Lai CP, Mardini O, Ericsson M, Prabhakar S, Maguire C, Chen JW, et al. Dynamic biodistribution of extracellular vesicles in vivo using a multimodal imaging reporter. *ACS Nano.* 2014;8(1):483-494.
- (44) Shao Y, Chen T, Zheng X, Yang S, Xu K, Chen X, et al. Colorectal cancer-derived small extracellular vesicles establish an inflammatory premetastatic niche in liver metastasis. *Carcinogenesis.* 2018;39(11):1368-1379.

- (45) Hejazi M, Baghbani E, Amini M, Rezaei T, Aghanejad A, Mosafer J et al. MicroRNA-193a and taxol combination: A new strategy for treatment of colorectal cancer. *J Cell Biochem.* 2020;121(2):1388-1399.
- (46) Liu Y, Zhou Y, Feng X, Yang P, Yang J, An P, et al. Low expression of microRNA-126 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer.* 2014;53(4):358-365.
- (47) Suzuki H, Maruyama R, Yamamoto E, Kai M. Epigenetic alteration and microRNA dysregulation in cancer. *Front Genet.* 2013;4:258.
- (48) Hur K, Toiyama Y, Takahashi M, Balaguer F, Nagasaka T, Koike J et al. MicroRNA-200c modulates epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in human colorectal cancer metastasis. *Gut.* 2013;62(9):1315-1326.
- (49) Humberto Afanador C., Muñeton Peña C.M. Epigenética del cáncer colorrectal. *Rev Colomb Gastroenterol.* 2018;33(1):32-40.
- (50) Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009;139(5):871–890.
- (51) Lowenstein CJ, Arking DE, Beer MA, Maitra A, Mendell JT. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell.* 2007;26(5):745-752.
- (52) Zhang X, Ai F, Li X, Tian L, Wang X, Shen S, et al. MicroRNA-34a suppresses colorectal cancer metastasis by regulating Notch signaling. *Oncol Lett.* 2017;14(2):2325-2333.
- (53) Zhang D, Zhou J, Dong M. Dysregulation of microRNA-34a expression in colorectal cancer inhibits the phosphorylation of FAK via VEGF. *Dig Dis Sci.* 2014;59(5):958-967.
- (54) Roy S, Levi E, Majumdar AP, et al. Expression of miR-34 is lost in colon cancer which can be re-expressed by a novel agent CDF. *J Hematol Oncol.* 2012;5:58.
- (55) Cowan LA, Talwar S, Yang AS. Will DNA methylation inhibitors work in solid tumors? A review of the clinical experience with azacitidine and decitabine in solid tumors. *Epigenomics.* 2010;2(1):71-86.
- (56) Ouyang T, Liu Z, Han Z, Ge Q. MicroRNA Detection Specificity: Recent Advances and Future Perspective. *Anal Chem.* 2019;91(5):3179-3186.
- (57) Banica FG. *Chemical Sensors and Biosensors: Fundamentals and Applications.* JohnWiley & Sons. 2012;7:118-134.
- (58) Lusi EA, Passamano M, Guarascio P, Scarpa A, Schiavo L. Innovative electrochemical approach for an early detection of microRNAs. *Anal Chem.* 2009;81(7):2819-2822.
- (59) Chen Y, Gao DY, Huang L. In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: challenges and strategies. *Adv Drug Deliv Rev.* 2015;81:128-141.

- (60) Tume L, Cisneros C, Sevillano J, Pacheco-Tapia T, Matos D, Acevedo-Espínola R, et al. Desregulación de microARN en el cáncer: un enfoque terapéutico y diagnóstico. *Gaceta Mexicana de Oncología*. 2016;15(5):298-304.
- (61) Varela MA. Identification of sequences common to more than one therapeutic target to treat complex diseases: simulating the high variance in sequence interactivity evolved to modulate robust phenotypes. *Genomics*. 2015;16(1):530.
- (62) Lennox KA, Behlke MA. Chemical modification and design of anti-miRNA oligonucleotides. *Gene Ther*. 2011;18(12):1111-1120.
- (63) Davis S, Lollo B, Freier S, Esau C. Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic Acids Res*. 2006;34(8):2294-2304.
- (64) Zhang L, Liao Y, Tang L. MicroRNA-34 family: a potential tumor suppressor and therapeutic candidate in cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2019;38(1):53.
- (65) Márquez J, Fernández-Piñero I, Arauzo-Bravo MJ, Poschmann G, Stühler K, Khatib A, et al. Targeting liver sinusoidal endothelial cells with miR-20a-loaded nanoparticles reduces murine colon cancer metastasis to the liver. *Int.J. Cancer*. 2018;143:709-719.
- (66) Clinicaltrials [Internet]. U.S.: National Library of Medicine; 2013 - A Multicenter Phase I Study of MRX34, MicroRNA miR-RX34 Liposomal Injection; [consulta,30/03/2021]. Disponible en:
<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/record/NCT01829971?term=MRX34&draw=2&rank=2>
- (67) Helmy KY, Patel SA, Silverio K, Pliner L, Rameshwar P. Stem cells and regenerative medicine: accomplishments to date and future promise. *Ther Deliv*. 2010;1(5):693-705.