

Los microARN como biomarcadores y blancos terapéuticos en cáncer

Alejandro Moro-Soria

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, INOR
Calle 29 y F, CP 10400, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba
alexmoro@infomed.sld.cu

REVISIÓN

RESUMEN

Los tumores malignos son la primera causa de muerte temprana de millones de personas en Cuba y otros países, por lo que el diagnóstico y tratamiento del cáncer es un problema de salud mundial. Tradicionalmente, estos tumores se clasifican y tratan según variables clínico-patológicas un tanto imprecisas todavía, pues no reflejan las particularidades moleculares de cada paciente. En este sentido, es preciso encontrar otros biomarcadores individuales y blancos terapéuticos que complementen esas variables y guíen el diagnóstico de los pacientes, su pronóstico y tratamiento. Los avances en el conocimiento de la biología del cáncer y el desarrollo de herramientas para los análisis genómicos, constituyen perspectivas clínicas para el descubrimiento de estos biomarcadores. Los microARN (miARN) son un tipo de ARN no codificante que provocan la regulación postranscripcional de la expresión génica. Su expresión en el cáncer está alterada, y podrían funcionar como oncogenes o supresores de tumores, por lo que se utilizan como biomarcadores diagnósticos, pronósticos, predictivos y blancos terapéuticos. Teniendo en cuenta la importancia de este tema para oncólogos e investigadores, se describen la biogénesis de los miARN, su mecanismo de acción y los avances en el estudio como biomarcadores o dianas terapéuticas en el cáncer.

Palabras clave: miARN, biomarcadores, cáncer, blancos moleculares terapéuticos, oncología personalizada

Biotecnología Aplicada 2014;31:81-86

ABSTRACT

microRNA as biomarkers and therapeutic targets in cancer. Malignant tumors rank as the first cause of death mortality and potentially lost years of life in Cuba and many other countries where millions of people die each year because of cancer. Therefore, the diagnosis and treatment of cancer is a health issue worldwide. Malignant tumors are traditionally classified and treated according to clinical and pathological variables which are currently insufficient to reflect each patient's molecular features. Consequently, there is a need to find new individual biomarkers and therapeutic targets that could complement current clinical-pathological variables and become a guide for diagnosis, prognosis and treatment. Advances in understanding the biology of cancer as well as the development of more powerful gene analysis tools create new clinical perspectives to find such biomarkers and targets. MicroRNAs (miRNAs) belong to a class of non-coding RNA with post-transcription regulation of gene expression. Their expression is aberrant in cancer where they could function either as oncogenes or tumor suppressors, being used as diagnostic, prognostic or predictive biomarkers and therapeutic targets. Since, research on miRNA is a key issue for oncologists and researchers, in this review we provide a description of their biogenesis, mechanism of action and recent findings, supporting their use in cancer, either as biomarkers or therapeutic targets.

Keywords: miRNA, biomarkers, cancer, therapeutic molecular targets, personalized oncology

Introducción

El biomarcador ideal es aquel que sea específico para la enfermedad de interés, que esté disponible mediante técnicas no invasivas y cuya detección no sea muy costosa. Los biomarcadores que permiten distinguir las bases moleculares de las variaciones en la evolución de los tumores y la respuesta clínica a las terapias, son de gran valor médico [1]. Según las cifras de la base de datos GLOBOCAN de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC), el cáncer es un problema creciente de salud: hay un aumento de la incidencia de 12.7 millones en 2008 a 14.1 millones en 2012, y de la mortalidad: de 7.6 millones a 8.2 millones [2]. En 2012, los tumores malignos en Cuba fueron la primera causa de mortalidad (22 532 fallecidos), por encima de las enfermedades cardiovasculares (22 234 fallecidos), y la primera causa de años de vida potencialmente perdidos (18.2 años) [3]. De ahí la importancia de desarrollar nuevos biomarcadores que permitan detectar y caracterizar los tumores tempranamente, como es el caso de las moléculas de ARN con estos fines.

Durante las dos últimas décadas se identificaron y agregaron a la familia de ARN, nuevos tipos caracterizados por sus funciones reguladoras de la expresión génica y su tamaño variable. Se incluyeron 1) siARN (ARN pequeños de interferencia), de 20 a 25 nucleótidos, relacionados con la defensa del organismo frente a las infecciones virales; 2) ARN asociados a Piwi (piARN), de 25 a 30 nucleótidos, que funcionan asociados con la subfamilia Piwi de las proteínas Argonauta, y son esenciales para el desarrollo de las células germinales; 3) microARN (miARN), de 20 a 25 nucleótidos, relacionados con la represión o degradación del ARN mensajero (ARNm) en varias especies; y 4) ARN largos, no codificantes (LncARN), de tamaño variable, desde 70 hasta miles de nucleótidos, que participan en varios procesos celulares, incluyendo la maduración del ARNm y la biogénesis de los ribosomas [4]. Particular atención han recibido los miARN por su relevancia en el estudio del cáncer.

El control de la expresión génica por los microARN es un proceso que ocurre en todas las células tumorales.

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacol Ther.* 2001; 69(3):89-95.

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; c2013 [cited 2013 Oct 17]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>

3. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud, Cuba, 2012 [Internet]. Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud, Minsap; 2013 [cited 2013 Oct 17]. Available from: http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario_2012.pdf

4. Wang J, Li LC. Small RNA and its application in andrology and urology. *Transl Androl Urol.* 2012;1(1):33-43.

Frecuentemente estas células tienen alterado el perfil de expresión de los miARN, y las evidencias recientes indican que estas alteraciones podrían tener valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de cáncer [5]. En los últimos años se avanzó en el conocimiento de los mecanismos de progresión y en el desarrollo de estrategias terapéuticas para prevenir la diseminación del cáncer a todo el organismo. Ello permitió que aumentara el porcentaje de pacientes que sobrevivían 5 años después del diagnóstico. Sin embargo, la metástasis es la causa principal de la muerte de estos enfermos. Por tanto, es imperativa la identificación de mediadores de metástasis, que se puedan utilizar como biomarcadores o dianas terapéuticas. Esta información sería una herramienta útil para la toma de decisiones clínicas más acertadas frente al cáncer, que permitiría ajustar los tratamientos a las particularidades moleculares de cada paciente. En este contexto, los miARN representan una nueva clase de biomarcadores y potenciales dianas terapéuticas.

En este artículo se ejemplifica la función de los miARN como posibles biomarcadores para el diagnóstico en el cáncer de pulmón, el pronóstico en el cáncer de mama, y como biomarcadores predictivos en el cáncer de colon, ya que estas tres localizaciones constituyen las primeras causas de muerte a escala mundial y en Cuba. Además se exponen sus potencialidades como blancos terapéuticos, las ventajas de su medición como biomarcadores circulantes y las limitaciones de su uso. Finalmente se ofrece una valoración del estado actual y las perspectivas del trabajo con ellos.

Descubrimiento y estructura genómica

Los primeros miARN en ser descubiertos fueron lin-4 (derivado de *lineage abnormal*) y let-7 (derivado de *lethal*), en el gusano *Caenorhabditis elegans*, por los grupos liderados por Ambros y Ruvkun en 1993 y en 2000, respectivamente [6, 7]. Estos investigadores hallaron que eran ARN atípicos, porque se producían como una cadena de 22 (lin-4) o 21 (let-7) nucleótidos (nt), se derivaban de precursores de 70 nucleótidos (nt) con la estructura de tallo y lazo, y tenían funciones de represores antisentido de la traducción de ARNm, que codificaban para proteínas necesarias para el desarrollo de *C. elegans* en la secuencia debida.

Cuando se describieron, lin-4 y let-7 parecían ser exclusivos de *C. elegans*, una rareza, ya que no se habían descrito otros ARN pequeños, con función reguladora en ninguna especie. Sin embargo, dos descubrimientos cambiaron esa percepción. El primero fue que el ARN de let-7 está conservado filogenéticamente, en tamaño y secuencia, en todos los animales bilateralmente simétricos [8]; y el segundo hallazgo fue que los ARN antisentido de pequeño tamaño, aproximadamente de 22 nt (llamados siARN) eran fundamentales para el proceso de interferencia de ARN (ARNi) [9].

El ARNi es un mecanismo de vigilancia genéticamente conservado, que puede degradar el ARNm, como respuesta a la presencia de ARN de doble cadena, correspondiente al ARNm blanco. lin-4 y let-7 no son siARN, pues su acción no necesita la degradación de sus ARNm blancos; pero la ubicuidad de los siARN sugirió que los ARN de pequeño tamaño como lin-4

y let-7 son bastante estables en el medio ambiente eucariota, en el que permanecen por un periodo relativamente prolongado. De hecho, los ARN de lin-4 y let-7, de aproximadamente 22 nt, se procesan a partir de sus precursores, en forma de tallo-lazo, por la misma enzima Dicer que genera los siARN de talla aproximada de 22 nt a partir del ARN de doble cadena, mecanismo que se detalla más adelante. Teniendo en cuenta que Dicer es una enzima que también está ampliamente distribuida, se presumió que moléculas semejantes a lin-4 y let-7 pudieran encontrarse en otros organismos, además de *C. elegans*. En 2001 se confirmó esta hipótesis, lo que llevó a la publicación de tres artículos científicos en el mismo número de la revista *Science*, que describían más de 100 miARN en varias células de los metazoos [10-12]. Estos artículos causaron gran impacto, pues con la incorporación de los miARN se abrió un nuevo camino en el conocimiento de la regulación génica.

Actualmente se conoce que las células eucariotas tienen siARN o al menos la maquinaria celular necesaria para producirlos, con excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Los miARN funcionan fundamentalmente en organismos multicelulares, aunque también se identificaron en el alga unicelular *Chlamydomonas reinhardtii* [13]. Y lo que quizás ya no sorprendió tanto, fue que en 2004 se confirmara que algunos virus contienen miARN [14]. Ello demostró que podían ser de gran importancia para la regulación de la transición de la etapa de latencia a la etapa de replicación y lisis; incluso, para la atenuación de la respuesta inmune del hospedero contra la infección viral.

La mayoría de los miARN caracterizados se ubican en el espacio intergénico o en sentido contrario a los genes vecinos. Por tanto, se piensa que se transcriban como unidades independientes [15]. Sin embargo, en algunos casos el miARN se transcribe junto con el gen vecino. Esto indica que la expresión de los miARN y de los genes vecinos que codifican para proteínas podrían estar asociadas [16].

Los análisis genómicos de los miARN a gran escala muestran que la mayoría se concentra en clústeres o agrupamientos de genes, son policistronicos y se coexpresan con miARN vecinos [17]. Además se demostró que estos miARN agrupados en clústeres cooperan y coordinan sus funciones entre sí, por lo que son más eficientes en la regulación génica [18, 19] y de las proteínas relacionadas [20]. La hipótesis es que los miARN agrupados se relacionan funcionalmente, porque tienen como blanco el mismo gen o quizás varios genes, pero codifican para proteínas relacionadas [21]. Algunas evidencias apoyan esta hipótesis. Por ejemplo, para que una célula pueda proliferar e invadir otros tejidos, tiene que evitar mecanismos de control como el arresto celular y la apoptosis. Se demostró que los miARN 15a y 16 que forman un clúster en la región cromosómica 13q14 (frecuentemente eliminada en varias neoplasias), actúan como supresores de tumores en el cáncer de próstata, porque tienen los genes *bcl-2*, de la ciclina D1 y *wnt3A* como blanco. Estos genes codifican para proteínas que inhiben la apoptosis, promueven la proliferación celular y la invasión, respectivamente. En el cáncer de próstata avanzado, las concentraciones de miR15a

5. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature*. 2012;482(7385):347-55.

6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

7. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.

8. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.

9. Sharp PA. RNA interference-2001. *Genes Dev*. 2001;15(5):485-90.

10. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.

11. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.

12. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-4.

13. Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature*. 2008;451(7177):414-6.

14. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004;304(5671):734-6.

15. Gromak N. Intronic microRNAs: a crossroad in gene regulation. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(4):759-61.

16. Wang J, Xiang G, Zhang K, Zhou Y. Expression signatures of intragenic miRNAs and their corresponding host genes in myeloid leukemia cells. *Biotechnol Lett*. 2012;34(11):2007-15.

17. Sun J, Gao B, Zhou M, Wang ZZ, Zhang F, Deng JE, et al. Comparative genomic analysis reveals evolutionary characteristics and patterns of microRNA clusters in vertebrates. *Gene*. 2013;512(2):383-91.

18. Zhang Y, Zhang R, Su B. Diversity and evolution of MicroRNA gene clusters. *Sci China C Life Sci*. 2009;52(3):261-6.

19. Chhabra R, Dubey R, Saini N. Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases. *Mol Cancer*. 2010;9:232.

20. Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, Kang S, et al. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol*. 2009;3:65.

21. Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, et al. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(1):59-68.

22. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memeo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature medicine*. 2008;14(11):1271-7.

y miR16-1 son muy bajas, mientras que las de Bcl-2, Ciclina D1y Wnt3A son elevadas [22].

Nomenclatura

Los estudios relacionados con los miARN se facilitaron con la adopción de un sistema para nombrarlos y la implementación de una base de datos o registro de miARN [23]. Este sistema asigna nombres a los miARN basado en guías establecidas por expertos, que plantean que los nuevos miARN tienen que estar verificados experimentalmente mediante clonaje o por evidencias de su expresión y funcionamiento [24]. Se nombran con el prefijo mir- seguido por un número que indica el orden de identificación. Por ejemplo, mir-100 fue descubierto antes que mir-101. Ese prefijo se refiere al precursor del miARN, mientras que miR (con R mayúscula), se refiere a la forma madura del miARN. Cuando dos miARN son casi idénticos, que se diferencian por uno o dos nucleótidos, se adiciona una letra minúscula detrás del número. Por ejemplo, miR-123a es casi idéntico a miR-123b.

Los miARN que se encuentran en lugares diferentes en el genoma pero producen un miARN maduro idéntico, se anotan con un guion adicional. Por ejemplo, los precursores mir-194-1 y mi-194-2 producen un miARN maduro idéntico, miR-194, pero están localizados en regiones diferentes del genoma. La especie a la que corresponde el miARN se indica con un prefijo de tres letras, por ejemplo, hsa-miR-100 es el miARN 100 que se encuentra en seres humanos (*Homo sapiens*), mientras que mmu-miR-100 es el miARN 100 que se encuentra en ratones (*Mus musculus*).

La numeración de los miARN es secuencial; por tanto, si el último miARN descubierto fue el miR-789 en ratones, el próximo que se publique será el miR-790, independientemente de la especie donde se descubrió. Si se envía una secuencia de un miARN nuevo, que se identificó en el gallo doméstico *Gallus gallus*, pero es idéntico al miR-121 humano, el nombre que obtendrá será miR-121, con el prefijo gga-121 para diferenciarlo de hsa-121.

Cuando dos miARN se originan de los brazos opuestos del mismo precursor (o pre-mir), se denotan con un sufijo -3p o -5p. Finalmente, cuando los niveles de expresión relativos se conocen, un asterisco posterior al nombre indica el miARN que se expresa a niveles más bajos en relación con el que se encuentra en el lado opuesto. Por ejemplo, miR-234 y miR-234* comparten el mismo precursor, mir-234; pero este se encuentra en mayores concentraciones en la célula que miR-234*.

Biogénesis

El mecanismo general de biogénesis de los miARN se describe en la figura. Ellos se transcriben como parte de transcritos primarios mayores (pri-miARN), generados por la acción de la ARN polimerasa II [25]. Al igual que otros transcritos de la ARN polimerasa II, los pri-miARN tienen sus extremos 5' y 3' modificados con CAP y cola de poliA, respectivamente [26]. Estos pri-miRNA forman una estructura de tallo y lazo, reconocida por un sistema multiproteico con dos componentes fundamentales, la enzima Drosha y la proteína DGCR8 (*Di George syndrome critical region gene 8*), capaz de enlazarse a ARN de doble cadena. En

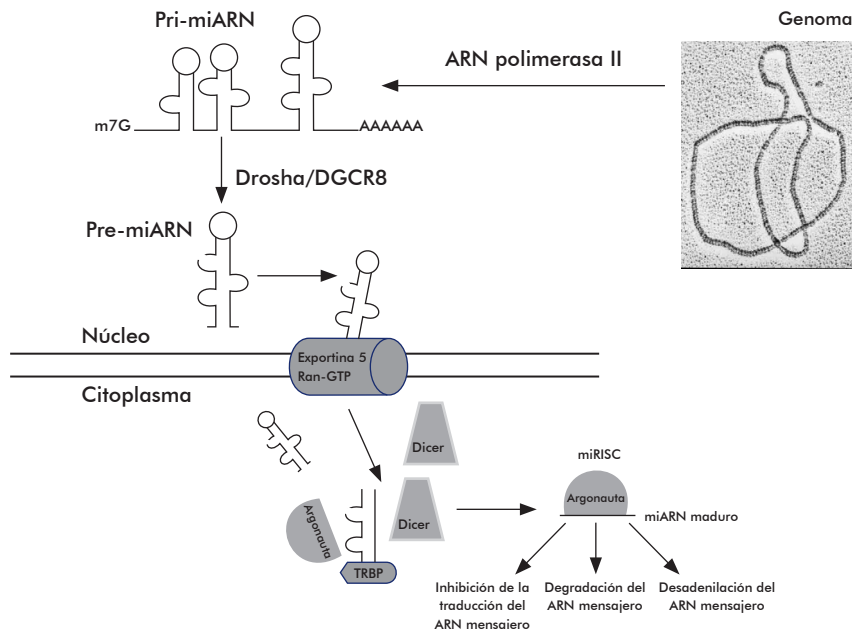


Figura. Biogénesis de los miARN. Los miARN monocistrónicos o policistrónicos son transcritos en el núcleo de las células eucariotas por la ARN polimerasa II en transcritos primarios, los pri-miR, que contienen cientos de nucleótidos. Posteriormente, estos son procesados por la ARNasa tipo III, Drosha y su cofactor DGCR8, que liberan precursores de tipo tallo-lazo de 70 nt, doble cadena de ARN, los pre-miARN. Estos son exportados al citoplasma mediante el complejo Exportina 5 y Ran-GTP. Una vez en el citoplasma, un complejo que contiene Dicer, una ARNasa tipo III, procesa al pre-miARN y genera moléculas de ARN de doble cadena de pequeño tamaño, aproximadamente 22 nt y vida media corta, que es una cadena seleccionada (miARN maduro) mientras que la otra es degradada. El miARN maduro interacciona con un miembro de la familia de proteínas Argonauta y se incorpora al complejo de silenciamiento inducido por ARN (miRISC). Una vez que el miARN se unió a su ARNm blanco, pueden ocurrir: 1) degradación del ARNm; 2) inhibición de la traducción del ARNm a proteínas, o 3) desadenilación y reducción de los niveles de ARNm.

este mecanismo de reconocimiento, DCGR8 se une a la base de la estructura de tallo y lazo, y de esta manera guía a la enzima Drosha que es una ARNasa tipo III y es la que tiene la actividad catalítica del complejo [27]. Drosha corta la doble cadena en el tallo a una distancia aproximada de 11 nt por encima de la base y genera extremos 3' con salientes de 2 nt. Este corte libera una molécula de ARN con forma de tallo y lazo, de aproximadamente 70 a 100 nt, que constituye el precursor (pre-miARN) y se reconoce por el receptor nuclear Exportina-5, y se exporta del núcleo al citoplasma [28]. Una vez en el citosol, el pre-miARN es nuevamente procesado por un ARNasa tipo III, Dicer [29]. El dominio PAZ de esta enzima se enlaza al extremo 3' con el saliente de 2 nt del pre-miARN (sustrato), y de esta manera queda el sustrato en la posición adecuada, para que sea cortado, lo que resulta en un miARN de doble cadena de 22 nt y con 2 nt salientes en los extremos 3' [30].

Posteriormente, una de las cadenas, la cadena guía o miARN maduro, se transfiere a una proteína llamada Argonauta y se forma el complejo llamado miRISC (complejo silenciador inducido por miARN), mientras que la otra es degradada. En mamíferos, el complejo que se forma contiene el miARN maduro, la enzima Dicer, la proteína Argonauta y otra proteína que se enlaza al ARN de doble cadena, TRBP [31]. Por lo general, la cadena de miARN con menor estabilidad en el apareamiento de bases en su extremo 5' es la cadena guía o miARN maduro [32].

23. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res.* 2004;32(Database issue):D109-11.

24. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA.* 2003;9(3):277-9.

25. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* 2004;23(20):4051-60.

26. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA.* 2004;10(12):1957-66.

27. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell.* 2006;125(5):887-901.

28. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* 2003;17(24):3011-6.

29. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell.* 2001;106(1):23-34.

30. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell.* 2009;136(2):215-33.

Mecanismo de acción

Una vez que se forma el complejo RISC, este se une a la región 3' no traducida (3'-UTR) del ARNm, aunque también puede unirse a la región 5' no traducida (5'-UTR) y a la región promotora. A la secuencia en el miARN que reconoce a la 3'-UTR del ARNm se le conoce como 'semilla', y se ubica en la región 5' del miARN, del nucleótido 2 al 7 [33]. Una vez que el miARN se unió a su ARNm blanco, puede ocurrir la degradación del ARNm, o la inhibición de la traducción del ARNm a proteínas, o la desadenilación y reducción en los niveles de ARNm [34].

Los miARN como biomarcadores en cáncer

El diagnóstico temprano de un tumor primario mejora el pronóstico y la respuesta a los tratamientos. Como no se dispone de un sistema para la pesquisa del cáncer de pulmón en sus etapas tempranas en la población, la mayoría de las veces se diagnostica en etapas avanzadas. La primera evidencia de la expresión aberrante de los miARN en el cáncer de pulmón se informó en 2006, cuando se identificó un grupo de ellos que en el tejido tumoral se expresaban diferente a como lo hacían en el tejido sano [35]. Esto abrió la posibilidad de su empleo como biomarcadores de este tipo de cáncer. Estudios recientes demostraron que el aumento de la expresión de miR-21 era significativamente diferente en el esputo de pacientes con cáncer de pulmón, con respecto al de las personas sanas, con una sensibilidad del 70 % y una especificidad del 100 % [36]. También se encontró en experimentos en ratas que la exposición al humo del cigarro modifica los niveles de expresión de los miARN [37], por lo que los cambios en los niveles de miARN se pudieran utilizar como biomarcadores para el diagnóstico del cáncer en los fumadores.

Los diez miARN cuya expresión aberrante en el tejido tumoral sirve para confirmar el diagnóstico de cáncer de pulmón, mediante tomografía computarizada, y que tiene gran valor para discriminar si es neoplasia o tejido sano son let-7, miR-21, -200b, -210, -219-1, -324, que son inducidos y miR-30a, -126, -45 y -486, que son reprimidos [38]. Para el desarrollo de las terapias dirigidas a blancos específicos, es preciso clasificar los tumores en: tumores de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), los subtipos histológicos adenocarcinomas (ADC) y los carcinomas de células escamosas (SCC). Sin embargo, no es fácil, especialmente si la biopsia es pequeña o los tumores están escasamente diferenciados. En este sentido, dos miARN, el miR-21 y el -205 se utilizaron exitosamente para distinguir ADC de SCC [39]. También se describió un patrón de expresión característico de cinco miARN (miR-25, -34c-5p, -191, let-7e y -34a) utilizados para esta diferenciación [40]. Además es necesario distinguir los tumores primarios de las metástasis. La sobreexpresión de miR-182 se detectó en tumores primarios, mientras que el miR-126 se expresó en concentraciones elevadas en las metástasis [41].

La causa principal de muerte de pacientes con cáncer de mama, son las complicaciones derivadas de las metástasis [42]. En los últimos años se efectuaron diversos estudios para identificar y caracterizar los eventos

celulares que rigen el proceso de la metástasis, que es muy complejo. Los miARN afectan la adherencia celular, la migración, la invasión, la motilidad y la angiogénesis [43]. Los miARN asociados con el proceso metastásico se denominan metastamir. El primer metastamir fue descrito por el grupo de Robert Weinberg, quienes encontraron que el miR-10b inicia el proceso de invasión y metástasis en el cáncer de mama [44]. El primer metastamir supresor de metástasis fue descrito por el grupo de Joan Massagué [45], quienes revelaron que el miR-335 suprime la metástasis y la migración mediante su acción sobre el factor transcripcional SOX4, presente en células progenitoras y sobre la proteína tenascina C, que forma parte de la matriz extracelular.

Los metastamir se utilizan en el cáncer de mama como posibles biomarcadores pronósticos. Por ejemplo, en un estudio por microarray de miARN se cuantificó la expresión de 249 miARN en 299 tumores de mama (185 positivos a receptor de estrógeno, RE+; 114 negativos, RE-). Los miARN -7, -128a, -210 y -516-3p se correlacionaron con la agresividad del tumor en los tumores RE+ y los ganglios negativos, mientras que miR-210 estuvo asociado a la recidiva temprana en pacientes con RE- y ganglios negativos [46]. En el cáncer de mama se observó que el miARN 27 y los de la familia 17-92 (miR-17, -18a, -19a, -19b, -20a y -92) regulan negativamente las concentraciones de los factores transcripcionales de la familia ZBTB, y que estas concentraciones están significativamente asociadas con la supervivencia [47, 48].

A partir de la integración de la expresión de ARNm, miARN y ADN metilado, recientemente se examinó la supervivencia de 466 pacientes con carcinoma ductal invasivo (CDI) de la mama, el subtipo histológico más frecuentemente diagnosticado [49]. En el análisis de este patrón génico integrado, se encontró que 37 ARNm y 7 miARN, entre las subclases clínicas y patológicas, se asocian con la supervivencia general y que su valor pronóstico es superior a otros patrones génicos comercialmente disponibles para la estratificación de pacientes con cáncer de mama, tales como el Mammaprint® y el Oncotype Dx®.

Los avances en el conocimiento de las vías de señalización alteradas en el cáncer colorrectal (CCR), sentaron las bases para la aplicación de terapias dirigidas a blancos específicos. Por ejemplo, el anticuerpo monoclonal cetuximab contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), se utiliza como monoterapia contra el CCR [50], o combinado con quimioterapia [51]. Recientemente se supo que pacientes con mutaciones en el gen K-ras (aproximadamente el 38 %) son resistentes a la terapia anti-EGFR [52]. De modo que esta terapia se restringe al subgrupo de pacientes con CCR que no tienen mutado el gen K-ras, aunque no es un tratamiento efectivo para todos; por lo que es necesario hallar nuevos marcadores. Recientemente se describió que los miARN let-7 [53], miR-143 [54] y miR-18a [55], cuyas concentraciones están reducidas en el CCR, tienen al K-ras como uno de sus genes diana. En este sentido, se evaluó el poder predictivo de 18 miARN (varios de los cuales tienen como blanco al K-ras) en 32 pacientes con CCR metastásico (CCRM) tratados con cetuximab y

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

32. Schwarz DS, Hutvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.

33. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85.

34. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost*. 2012;107(4):605-10.

35. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(7):2257-61.

36. Wang Q, Wang S, Wang H, Li P, Ma Z. MicroRNAs: novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012;237(3):227-35.

37. Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB J*. 2009;23(3):806-12.

38. Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(9):3713-8.

39. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):2030-7.

40. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):430-41.

41. Barshack I, Lithwick-Yanai G, Afek A, Rosenblatt K, Tabibian-Keissar H, Zepeniuk M, et al. MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung. *Pathol Res Pract*. 2010;206(8):578-84.

42. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.

43. Dumont N, Tlsty TD. Reflections on miR-ing effects in metastasis. *Cancer Cell*. 2009;16(1):3-4.

44. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449(7163):682-8.

45. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-52.

46. Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, de Weerd V, Boersma AW, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(35):13021-6.

quimioterapia. El aumento en la expresión de miR-200 y la disminución en la de miR-143, se asociaron con mayor tiempo libre de progresión en pacientes con el K-ras mutado. No hubo correlación entre la expresión de los miARN que tienen como blanco al K-ras y el tiempo libre de progresión en pacientes con el K-ras no mutado. Por tanto, la inhibición de la expresión del K-ras por los miARN solo es relevante en el contexto donde hay niveles elevados del K-ras; es decir, cuando hay mutaciones activadoras [56].

En un estudio de los perfiles de expresión de los miARN en 99 pacientes con CCRm, 33 de ellos con los genes K-ras/BRAF no mutados, para predecir los que pudieran tener una respuesta favorable ante el cetuximab y una supervivencia mayor, se reveló que los pacientes con enfermedad progresiva tenían una sobreexpresión del miR-31 y una inhibición del miR-592. También se agruparon los pacientes sobre la base del perfil de expresión de los miARN y se encontraron diferencias significativas entre los grupos. Los pacientes con escasa supervivencia tenían los miARN de la familia de let-7, el miR-140-5p sobreexpresados y el miR-1224-5p inhibido [57].

El tratamiento estándar para aquellos con CCR localmente avanzado (aproximadamente un tercio de todos los pacientes con CCR), son las radioquimioterapias neoadyuvantes con capecitabina o 5-fluorouracilo, y luego la resección quirúrgica. Lamentablemente, un gran porcentaje de estos tumores no responden a los neoadyuvancia y los pacientes tienen grandes probabilidades de desarrollar tumores recidivantes.

En un estudio reciente, se analizaron los perfiles de los miARN en 20 pacientes cuyos tumores se habían clasificado como sensibles o resistentes a esa variante terapéutica. Los niveles de expresión de ocho miARN fueron significativamente diferentes entre los dos grupos. Los miARN -215, -190b y -29b2* se sobreexpresaron en los pacientes con tumores resistentes, mientras que let-7e, miR-196b, -450a, -450b-5p y -99a* se sobreexpresaron en los tumores sensibles. Los niveles de expresión de estos miARN permitieron clasificar nueve pacientes (de 10) en no respondedores, e igual cifra como respondedores. Se concluyó que los miARN forman parte del mecanismo de respuesta de las células del cáncer de recto frente a la radioquimioterapia, y por tanto, tienen gran potencial como marcadores predictivos en los pacientes diagnosticados con esta neoplasia [58].

Los miARN como blancos terapéuticos en cáncer

Los miARN tienen dos características que los hacen atractivos como dianas terapéuticas para el cáncer. Una es que regulan varias vías metabólicas: la complejidad y heterogeneidad del cáncer sugiere que la única forma de desarrollar un tratamiento exitoso es teniendo como blanco a múltiples genes simultáneamente. La segunda es que existen microARN que están sobreexpresados de manera aberrante en el cáncer y se conocen como oncomirs. Por tanto, podría ser fácil y económicamente más atractivo desarrollar fármacos contra los miARN, potencialmente útiles para tratar tumores malignos en varias localizaciones. La inhibición de los miARN puede lograrse mediante

oligonucleótidos antisentido o antagomir [59, 60] o inhibidores competitivos llamados ‘esponjas’ de miARN [61]. Estas contienen varios sitios de unión al miARN, ya sea en un transcrito no codificante o en el 3'-UTR de un gen reportero, y poseen ventajas con respecto a los antagomir. Primero, los antagomir dependen de una zona extensa de complementariedad con el miARN blanco para su efectividad [62]. Por tanto, para neutralizar varios miARN es necesario preparar una mezcla que contenga antagomir complementarios a estos miARN, mientras que si en la célula se introduce un ARNm que contenga múltiples sitios de unión (típicamente de 4 a 10 sitios) a los miARN de interés, este va a inhibir específicamente a todos los miARN que tengan la secuencia complementaria a esos sitios de unión. Segundo, muchas células son resistentes a la introducción de los antagomir, mientras que la construcción genética que contiene la esponja se puede introducir en la célula mediante varios tipos de vectores. Tercero, los antagomir se deben administrar periódicamente y en altas concentraciones si se quiere inhibir la expresión del miARN blanco; mientras que la expresión de la construcción genética de la esponja en células germinales de animales transgénicos, permitiría que el miARN de interés se inhiba durante toda la vida del animal [63]. Sin embargo, aunque la tecnología de inhibición de miARN por esponjas tiene ventajas en la experimentación con modelos biológicos, la inhibición utilizando antagomir se considera más atractiva y con mayor potencial desde el punto de vista terapéutico. De hecho, la primera molécula con un miARN como blanco evaluada en seres humanos, para el tratamiento de las hepatitis causadas por el virus de la hepatitis C (VHC), fue el Miravirsén [64] (originalmente denominado SPC3649 [65]; Santaris Pharma A/S), un antagomir contra el miR-122, regulador positivo de la replicación del VHC y supresor tumoral en el hepatocarcinoma.

En el año 2005 se demostró que el miR-122 tiene dos sitios semilla, que interactúan con la región 5'-UTR del ARN del VHC, y provocan el aumento del ARN viral en células hepáticas infectadas. Esta evidencia indica que el miR-122 es un factor importante en el hospedero y un blanco potencial para el tratamiento de las infecciones por el VHC, relevante si consideramos que en aproximadamente 170 millones las personas infectadas y el VHC es la causa fundamental de insuficiencia hepática [66]. La idea de desarrollar una terapia antiviral basada en el miR-122 como blanco, fue atractiva por lo limitados que son los tratamientos actuales de las infecciones por HCV.

Además de su importancia como primer fármaco anti-miARN, hay otras dos características del Miravirsén que lo hacen atractivo. Con él se demostró que al modular un miARN, se modulan los genes que él regula. Además, el Miravirsén es una molécula a cuya estructura química se le hicieron modificaciones para aumentar su estabilidad, afinidad y especificidad. Tal modificación consistió en el cierre del anillo de ribosa por un puente metileno, que conectó el oxígeno en la posición 2 con el carbono en la posición 4, lo que produjo nucleótidos cerrados (LNA, *locked nucleic acid*). Los LNA son nucleótidos con una elevada capacidad de hibridación y afinidad por

47. Kim K, Chadalapaka G, Lee SO, Yamada D, Sastre-Garau X, Defossez PA, et al. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene*. 2012;31(8):1034-44.

48. Tang W, Zhu J, Su S, Wu W, Liu Q, Su F, et al. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PLoS One*. 2012;7(12):e51702.

49. Volinia S, Croce CM. Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(18):7413-7.

50. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-65.

51. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1408-17.

52. Lievre A, Bachelot JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):374-9.

53. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.

54. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. 2009;28(10):1385-92.

55. Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):953-9.

56. Mekenkamp LJ, Tol J, Dijkstra JR, de Krijger I, Vink-Borger ME, van Vliet S, et al. Beyond KRAS mutation status: influence of KRAS copy number status and microRNAs on clinical outcome to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:292.

57. Mosakhani N, Lahti L, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundstrom J, Ristamaki R, et al. MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genet*. 2012;205(11):545-51.

58. Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nekvindova J, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiat Oncol*. 2012;7:195.

59. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomir'. *Nature*. 2005;438(7068):685-9.

60. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(10):775-89.

61. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4(9):721-6.

62. Esau CC. Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. *Methods*. 2008;44(1):55-60.

el ARN de simple cadena [67]. Por tanto, los miARN modificados con LNA, como el Miravirsén, ofrecen perspectivas alentadoras para la clínica.

Actualmente, las compañías biotecnológicas están desarrollando miméticos de miARN o antagomir, y estrategias para su pronta administración sistémica en el tratamiento del cáncer y otras enfermedades [64]. Teniendo en cuenta la estrecha relación entre los miARN y la disregulación de los procesos malignos, se avizora una mayor celeridad durante la aprobación y el uso de las estrategias terapéuticas basadas en su modulación, como monoterápicos o en combinación con radio, quimio e inmunoterapias.

Los miARN circulantes

La descripción de los miARN circulantes significó el descubrimiento de nuevos mediadores de la expresión génica. Aunque la mayoría se encuentra y actúa en el interior de la célula, los miARN circulantes también pueden estar fuera: en fluidos como el plasma, la saliva, el líquido amniótico, la orina y otros [68]. Su composición y concentraciones se relacionan con varias enfermedades, por lo que se pudieran utilizar como biomarcadores, medibles por vías poco invasivas, para evaluar y vigilar el estado fisiológico del organismo. Es importante resaltar que estos miARN pueden ser abundantes en fluidos extracelulares, y muy estables, incluso en condiciones extremas de temperatura, pH y almacenamiento. Su composición en el plasma es idéntica en todas las personas: no depende del sexo ni de la edad, por lo que se consideran buenos biomarcadores clínicos [69]. No obstante, no está bien definido cómo ejercen su acción. Se plantea que pudieran ser mediadores de señales, que permiten a las células tumorales ‘comunicarse’ con las células no transformadas del microambiente, lo cual es crucial en la progresión maligna. Por tanto, a las moléculas que transportaban algún tipo de información al microambiente, como las citocinas, las quimiocinas y los factores de crecimiento, se les unen los miARN circulantes [70].

Limitaciones en el uso de los miARN como biomarcadores

La introducción de nuevos biomarcadores en la clínica se limita por la insuficiente sensibilidad, especificidad y estabilidad de los marcadores potenciales.

A pesar de que los miARN se consideran biomarcadores con gran potencial, no dejan de tener algunas limitaciones, como su especificidad. El miR-21 se encuentra elevado, no solo en el cáncer de páncreas, sino también en el linfoma difuso de células B grandes [71]. Otro aspecto importante es su modo de obtención, pues no hay homogeneidad en los protocolos para su aislamiento y caracterización, el material de partida (si es plasma, suero, tejido o bloques de parafina), y las características de los pacientes incluidos en los estudios. Existen evidencias de que los eritrocitos son una fuente importante de miARN circulantes y que la hemólisis puede alterar hasta el 50 % de los niveles de un miARN determinado como biomarcador en plasma. Por tanto, es preciso ser riguroso al interpretar

los resultados de la medición de los miARN circulantes asociados con cáncer, para descifrar si realmente están relacionados con el proceso maligno y que no sean la consecuencia de un fenómeno asociado a la lisis celular. Otro elemento que necesita ser estandarizado es la cuantificación de los miARN. No existe consenso sobre qué molécula utilizar como gen para normalizar: si un miARN que no varíe, si otra molécula de ARN u otro gen.

Comentarios finales

En las últimas dos décadas hubo progresos significativos en la identificación y caracterización de las causas genéticas y epigenéticas del cáncer, en la evaluación de posibles biomarcadores y en el desarrollo de fármacos contra nuevas dianas, lo que impactó en el aumento relativamente insuficiente, del tiempo de supervivencia de los pacientes oncológicos después del diagnóstico. Se profundiza en el conocimiento de la biología del cáncer para identificar otras alteraciones que al causar o contribuir a la malignidad se pudieran utilizar como nuevos biomarcadores o blancos moleculares, y continuar aumentando el tiempo de supervivencia de los enfermos. En tal sentido, recientemente se identificó que los miARN son moléculas esenciales con funciones importantes en el control de varios procesos fisiológicos y patológicos (incluyendo el cáncer), cuya expresión se modula diferencialmente en tejidos sanos o en aquellos que cursan procesos patológicos no asociados a malignidad y correlaciona con las características clínico-patológicas.

La elevada estabilidad de los miARN en tejidos y fluidos, y la posibilidad de ser cuantificados aunque estén en pequeñas cantidades, son ventajas para diagnosticar, pronosticar y estratificar a los pacientes, con el objetivo de aumentar las respuestas objetivas a los tratamientos antineoplásicos. Por ejemplo, ya se comercializa el sistema miRInform® Pancreas LDT (Asuragen® Inc.) [72], desarrollado tras el análisis de la expresión diferencial de miR-196a y miR-217 [73, 74]. A partir de una biopsia, este sistema permite discriminar la pancreatitis crónica del adenocarcinoma pancreático. Además, es atractiva la capacidad de cada miARN de modular la expresión de múltiples ARNm a la vez, por lo que es posible, por ejemplo, la reinstauración de la funcionalidad de una vía supresora completa que se encontraba afectada, a diferencia de otras estrategias que solamente permiten modular la expresión de un gen y no involucran toda la vía. Esta particularidad los hace muy atractivos como dianas terapéuticas en sí mismos o para disminuir la resistencia a otros tratamientos, aspectos sobre los que trabajan intensamente los investigadores académicos o de la industria.

En los próximos 2 a 5 años se avizora un aumento de los sistemas basados en los miARN que aprueben las agencias reguladoras. Estos se podrán introducir en la clínica de manera rutinaria, para aumentar la sensibilidad y especificidad de las pruebas diagnósticas y pronósticas, lo que ofrecerá nuevas oportunidades para mejores tratamientos personalizados.

63. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA*. 2010; 16(11):2043-50.

64. Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CM. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):282-9.

65. Branch AD, Rice CM. Antisense gets a grip on miR-122 in chimpanzees. *Science Translational Medicine*. 2010;2(13).

66. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.

67. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*. 2004;43(42):13233-41.

68. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.

69. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223-33.

70. Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrunaro A, Gerace D, et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol*. 2012;41(6):1897-912.

71. Gu L, Song G, Chen L, Nie Z, He B, Pan Y, et al. Inhibition of miR-21 induces biological and behavioral alterations in diffuse large B-cell lymphoma. *Acta Haematol*. 2013;130(2):87-94.

72. miRInform® Pancreas [Internet]. Austin, TX: Asuragen® Inc. c2013 [2013 Oct 17]. Available from: <http://asuragen.com/products-and-services/clinical-lab/mirinform-pancreas/>

73. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnoij A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007;26(30):4442-52.

74. Szafranska AE, Dolezal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttges J, Munding JB, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem*. 2008; 54(10):1716-24.

Recibido en octubre de 2013.

Aprobado en marzo de 2014.

MicroRNAs as biomarkers and therapeutic targets in cancer

Alejandro Moro-Soria

Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología, INOR
Calle 29 y F, CP 10400, Plaza de la Revolución, La Habana, Cuba
alexmoro@infomed.sld.cu

ABSTRACT

Malignant tumors rank as the first cause of death mortality and potentially lost years of life in Cuba and many other countries where millions of people die each year because of cancer. Therefore, the diagnosis and treatment of cancer is a health issue worldwide. Malignant tumors are traditionally classified and treated according to clinical and pathological variables which are currently insufficient to reflect each patient's molecular features. Consequently, there is a need to find new individual biomarkers and therapeutic targets that could complement current clinical-pathological variables and become a guide for diagnosis, prognosis and treatment. Advances in understanding the biology of cancer as well as the development of more powerful gene analysis tools create new clinical perspectives to find such biomarkers and targets. MicroRNAs (miRNAs) belong to a class of non-coding RNA with post-transcription regulation of gene expression. Their expression is aberrant in cancer where they could function either as oncogenes or tumor suppressors, being used as diagnostic, prognostic or predictive biomarkers and therapeutic targets. Since, research on miRNA is a key issue for oncologists and researchers, in this review we provide a description of their biogenesis, mechanism of action and recent findings, supporting their use in cancer, either as biomarkers or therapeutic targets.

Keywords: miRNA, biomarkers, cancer, therapeutic molecular targets, personalized oncology

Biotechnología Aplicada 2014;31:87-92

RESUMEN

Los microARN como biomarcadores y blancos terapéuticos en cáncer. Los tumores malignos son la primera causa de muerte temprana de millones de personas en Cuba y otros países, por lo que el diagnóstico y tratamiento del cáncer es un problema de salud mundial. Tradicionalmente, estos tumores se clasifican y tratan según variables clínico-patológicas un tanto imprecisas todavía, pues no reflejan las particularidades moleculares de cada paciente. En este sentido, es preciso encontrar otros biomarcadores individuales y blancos terapéuticos que complementen esas variables y guíen el diagnóstico de los pacientes, su pronóstico y tratamiento. Los avances en el conocimiento de la biología del cáncer y el desarrollo de herramientas para los análisis genómicos, constituyen perspectivas clínicas para el descubrimiento de estos biomarcadores. Los microARN (miARN) son un tipo de ARN no codificante que provocan la regulación postranscripcional de la expresión génica. Su expresión en el cáncer está alterada, y podrían funcionar como oncogenes o supresores de tumores, por lo que se utilizan como biomarcadores diagnósticos, pronósticos, predictivos y blancos terapéuticos. Teniendo en cuenta la importancia de este tema para oncólogos e investigadores, se describen la biogénesis de los miARN, su mecanismo de acción y los avances en el estudio como biomarcadores o dianas terapéuticas en el cáncer.

Palabras clave: miARN, biomarcadores, cáncer, blancos moleculares terapéuticos, oncología personalizada

Introduction

The ideal biomarker must be specific for the disease of interest, available by non-invasive techniques and detected by methods that are not too costly. Those biomarkers, which may distinguish the molecular bases of variations in tumor evolution and the clinical response to treatments, are of great medical value [1]. According to the database of GLOBOCAN, from the International Agency for Research on Cancer (IARC), cancer is a growing health problem; its incidence has increased from 12.7 million in 2008 to 14.1 million in 2012, and mortality has increased from 7.6 million to 8.2 million [2]. In 2012, malignant tumors in Cuba were the first cause of death (22 532 deaths), exceeding those due to cardiovascular diseases (22 234 deaths), and the first cause of potentially lost years of life (18.2 years) [3]. This shows the importance of finding new biomarkers for the early detection and characterization of tumors, as in the use of the RNA molecules for this purpose.

In the last twenty years, new types of RNA have been characterized through their gene expression regulating functions and variable size. These include

1) siRNA (small interference RNA) of 20-25 nucleotides, related to the defense of the body against viral infections; 2) RNA associated to Piwi (piRNA) of 25-30 nucleotides, that operates in association with the Piwi subfamily of Argonaute proteins, and are essential for the development of germ cells; 3) microRNA (miRNA) of 20 to 25 nucleotides that are related to the repression or degradation of the messenger RNA (mRNA) in several species; and 4) long non-coding RNA (LncRNA), of variable size, from 70 to several thousand nucleotides, which participate in several cellular processes, including maturation of the mRNA and the biogenesis of the ribosomes [4]. The miRNAs are of particular interest due to their relevance in cancer studies.

The control of genetic expression by miRNAs occurs in all tumor cells. These cells frequently have an alteration of the expression profile of miRNAs, and recent evidence indicates that these alterations may have diagnostic, prognostic and predictive value for cancer [5]. In recent years, there have been advancements in the progression mechanisms and development of

1. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clinical Pharmacol Ther.* 2001; 69(3):89-95.

2. Ferlay J, Soerjomataram I, Ervik M, Dikshit R, Eser S, Mathers C, et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. c2013 [cited 2013 Oct 17]. Available from: <http://globocan.iarc.fr>

3. Ministerio de Salud Pública. Anuario Estadístico de Salud, Cuba, 2012 [Internet]. Habana: Dirección Nacional de Registros Médicos y Estadísticas de Salud, Min-sap; 2013 [cited 2013 Oct 17]. Available from: http://files.sld.cu/dne/files/2013/04/anuario_2012.pdf

4. Wang J, Li LC. Small RNA and its application in andrology and urology. *Transl Androl Urol.* 2012;1(1):33-43.

5. Lujambio A, Lowe SW. The microcosmos of cancer. *Nature.* 2012;482(7385):347-55.

therapeutic strategies to prevent the dissemination of cancer throughout the body. This made it possible to increase the percentage of patients with a 5 year survival after diagnostics. However, metastasis is the main cause of death of these patients. It is therefore essential to identify metastasis mediators, which can be used as biomarkers or therapeutic targets. This information would be a useful tool for better clinical decision making in cancer, thus adjusting the treatments to the molecular specificities of each patient. In this context, the miRNAs represent a new class of potential biomarkers and therapeutic targets.

In this paper, we give examples of the functions of the miRNAs as possible biomarkers for the diagnostic of lung cancer, the prognosis of breast cancer, and as predictive biomarkers in colon cancer, since these three locations are the main causes of death worldwide and in Cuba. Their potential as therapeutic targets is also shown, including their advantages as circulating biomarkers, and the limitations of their use. Finally, we offer an analysis of their current situation and the perspectives of working with them.

Discovery and genomic structure

The first miRNAs discovered were the lin-4 (derived from *abnormal lineage*) and let-7 (derived from *lethal*), in the worm *Caenorhabditis elegans*, led by Ambros and Ruvkun's groups in 1993 and in 2000, respectively [6, 7]. They found that these were atypical RNA, because they were produced as a strand of 22 (lin-4) or 21 (let-7) nucleotides (nt); they were derived from precursors of 70 nucleotides (nt) with the stem-loop structure, and their functions were of antisense repressors of mRNA translation, coding for the proteins needed for the development of *C. elegans* in the correct sequence.

When they were described, lin-4 and let-7 seemed to be exclusive for *C. elegans*, a rareness, since no other small RNA had been described with a regulating function in any species. Two discoveries, however, changed this perception. The first one was that the RNA of let-7 is phylogenetically preserved, in size and sequence, in all bilaterally symmetric animals [8]; and the second finding was that the small size antisense RNA, of approximately 22 nt (called siRNA) were essential for the RNA interference (RNAi) process [9].

RNAi is a genetically preserved surveillance mechanism that may degrade the mRNA, as a response to the presence of double strand RNA, corresponding to the target mRNA. The lin-4 and let-7 are not siRNA, since their action does not need the degradation of their target mRNA; but the ubiquity of the siRNA suggested that small size RNAs such as lin-4 and let-7 are quite stable in the eukaryotic environment, in which they remain for a relatively long period. In fact, the lin-4 and let-7 RNA, of approximately 22 nt, are processed by means of their precursors, in the stem-loop form, by the same Dicer enzyme generating the siRNA with a size of approximately 22 nt from double strand RNA, a mechanism that is explained later on. Considering that the Dicer enzyme is also widely distributed, it was presumed that molecules similar to lin-4 and let-7 may be found in other organisms besides *C. elegans*. This hypothesis was confirmed in

2001, which led to three papers published in the same issue of *Science*, describing more than 100 miRNAs in several metazoan cells [10-12]. These papers had a strong impact, since a new path in genetic regulation was opened on incorporating miRNA.

It is now known that the eukaryotic cells have siRNA or at least the cellular machinery necessary to produce them, with the exception of the *Saccharomyces cerevisiae* yeast. The miRNAs basically operate in multicellular organisms, since they were also identified in the unicellular algae *Chlamydomonas reinhardtii* [13]. And although it was not so surprising, in 2004, it was confirmed that some viruses contained miRNAs [14]. This demonstrated that they could be of great importance for the regulation of the transition from the latency to the replication and lysis stages; and they can even act in the attenuation of the immune response of the host against viral infection.

Most of the miRNAs characterized are located in the intergenic space, or in the opposite direction to neighboring genes. Therefore, it was thought that they were transcribed as independent units [15]. However, in some cases the miRNA is transcribed together with the neighboring gene. This indicates that the expression of the miRNA and of the protein-coding neighboring genes may be associated [16].

The large scale genomic analyses of the miRNAs show that most of them form clusters or groups of genes; they are polycistronic and are coexpressed with neighboring miRNAs [17]. It was also demonstrated that these clusters of miRNA cooperate and coordinate their functions, thereby being more efficient in the regulation of genes [18, 19] and their related proteins [20]. The hypothesis is that the grouped miRNAs are functionally related, because their target is the same gene or perhaps several genes, but they encode related proteins [21]. There is evidence supporting this hypothesis. For example, for a cell to proliferate and invade other tissues, it has to avoid the control mechanisms such as cellular arrest and apoptosis. It was demonstrated that miRNAs 15a and 16, which form a cluster in chromosome region 13q14 (frequently eliminated in several neoplasia), act as suppressors of prostate cancer tumors, because they have the *bcl-2* genes, of the cyclin D1 and *wnt3A* as their target. These genes codify proteins that inhibit apoptosis, promote cellular proliferation and invasion, respectively. In advanced prostate cancer the concentrations of miR15a and miR16-1 are very low, while those of Bcl-2, cyclin D1 and Wnt3A are high [22].

Nomenclature

The adoption of a system to identify miRNAs facilitated their study, together with the implementation of a miRNA database or registry [23]. The miRNA names are assigned following experts guidelines, which state that new miRNAs must be experimentally verified by cloning or through expression and function evidences [24]. The name starts with the mir- prefix followed by the number of its sequential identification. For instance, mir-100 preceded mir-101. The prefix mir- identifying the precursor miRNA is changed to miR (capital letter) to indicate the mature form of the molecule. When two miRNAs are almost-identical but differing in just one or two nucleotides, a lower

6. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 1993;75(5):843-54.

7. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 2000;403(6772):901-6.

8. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000;408(6808):86-9.

9. Sharp PA. RNA interference-2001. *Genes Dev*. 2001;15(5):485-90.

10. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.

11. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):858-62.

12. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*. 2001;294(5543):862-4.

13. Grosshans H, Filipowicz W. Molecular biology: the expanding world of small RNAs. *Nature*. 2008;451(7177):414-6.

14. Pfeffer S, Zavolan M, Grasser FA, Chien M, Russo JJ, Ju J, et al. Identification of virus-encoded microRNAs. *Science*. 2004;304(5671):734-6.

15. Gromak N. Intronic microRNAs: a crossroad in gene regulation. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(4):759-61.

16. Wang J, Xiang G, Zhang K, Zhou Y. Expression signatures of intragenic miRNAs and their corresponding host genes in myeloid leukemia cells. *Biotechnol Lett*. 2012;34(11):2007-15.

17. Sun J, Gao B, Zhou M, Wang ZZ, Zhang F, Deng JE, et al. Comparative genomic analysis reveals evolutionary characteristics and patterns of microRNA clusters in vertebrates. *Gene*. 2013;512(2):383-91.

18. Zhang Y, Zhang R, Su B. Diversity and evolution of MicroRNA gene clusters. *Sci China C Life Sci*. 2009;52(3):261-6.

19. Chhabra R, Dubey R, Saini N. Cooperative and individualistic functions of the microRNAs in the miR-23a~27a~24-2 cluster and its implication in human diseases. *Mol Cancer*. 2010;9:232.

20. Yuan X, Liu C, Yang P, He S, Liao Q, Kang S, et al. Clustered microRNAs' coordination in regulating protein-protein interaction network. *BMC Syst Biol*. 2009;3:65.

21. Yu J, Wang F, Yang GH, Wang FL, Ma YN, Du ZW, et al. Human microRNA clusters: genomic organization and expression profile in leukemia cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349(1):59-68.

22. Bonci D, Coppola V, Musumeci M, Addario A, Giuffrida R, Memo L, et al. The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nature medicine*. 2008;14(11):1271-7.

23. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(Database issue):D109-11.

case letter is added after the number, i.e., miR-123a is almost identical to miR-123b.

Moreover, those miRNAs located in different genomic regions but producing an identical mature miRNA are denoted by an additional hyphen at the end, followed by a sequential number. For example, mir-194-1 and mir-194-2 produce identical mature miRNAs, miR-194. Their genes are in different genome locations, though. The species are further indicated by a three-letter prefix, i.e., the hsa-miR-100 is the one-hundredth miRNA isolated in humans (*Homo sapiens*), while the mmu-miR-100 is the one-hundredth identified in mouse (*Mus musculus*).

The miRNA numbering is sequential, so, if the last discovered miRNA was miR-789 in mice, the next name published will be miR-790 regardless the species where it was discovered. If a sequence is submitted for a new miRNA identified in *Gallus gallus* but identical to that of the human miR-121, it will be named miR-121, with the prefix gga-121 different from the has-121 one.

If two different miRNAs are originated in opposite arms of the same precursor (or pre-mir), they will be denoted by the suffixes -3p or -5p. In those cases of known expression levels, an asterisk is added at the end of the name of the miRNA displaying the lowest expression level, compared to that in the other arm of the same precursor. For example, miR-234 and miR-234* share the same precursor, mir-234; but it is found at higher concentrations within the cell.

Biogenesis

The general mechanism of biogenesis of the miRNA is described in the figure. These are transcribed as part of the major primary transcripts (pri-miRNA), generated by the action of RNA polymerase II [25]. As in the other RNA polymerase II transcripts, the pri-miRNAs have their 5' and 3' ends modified with CAP and a polyA tail, respectively [26]. These pri-miRNAs form a stem-loop structure recognized by a multiprotein system with two main components, the Drosha enzyme and the DGCR8 protein (*Di George syndrome critical region gene 8*), capable of binding to double-stranded RNA. In this recognizing mechanism, DGCR8 is bound to the base of the stem-loop structure, thereby guiding the Drosha enzyme that is a type III RNAase, which has the catalytic activity of the complex [27]. Drosha cuts the double strand at the stem, at an approximate distance of 11 nt above the base and generates 3' ends with overhangs of 2 nt. This cut releases an RNA molecule, with the stem-loop form, of approximately 70 to 100 nt, which constitutes the precursor (pre-miRNA) and it is recognized by the nuclear receptor Exportin-5, and is exported from the nucleus to the cytoplasm [28]. After its arrival at the cytosol, the pre-miRNA is again processed by a type III RNAase, Dicer [29]. The PAZ domain of this enzyme is bound to the 3' end with the 2 nt overhang of the pre-miRNA (substrate), by which means the substrate is in the appropriate position for cutting, resulting in a double-stranded miRNA of 22 nt with 2 nt overhangs at the 3' ends [30]. One of the strands, the leading strand or mature miRNA, is transferred to a protein named Argonaute and a complex is formed called miRISC (miRNA induced silencing complex),

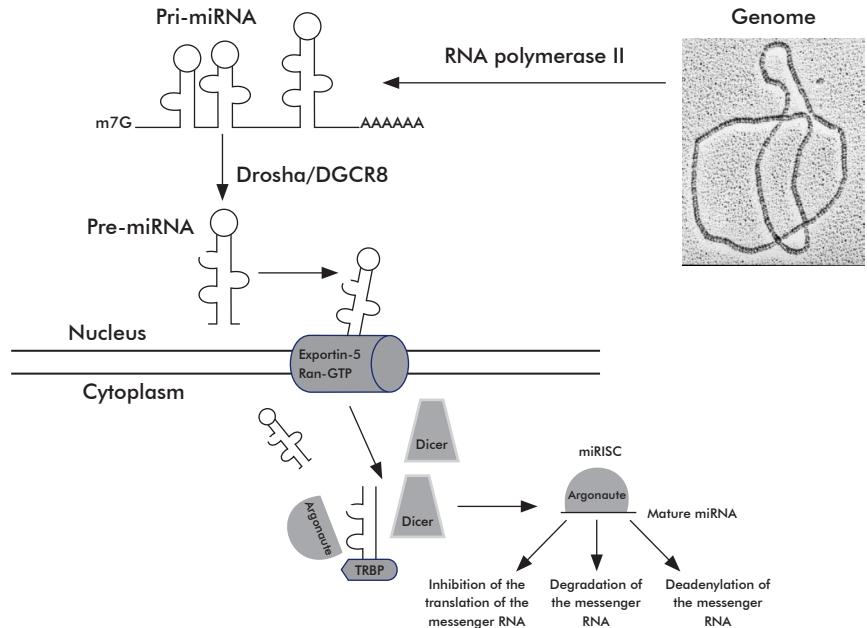


Figure. Biogenesis of the miRNA. The monocistronic or polycistronic miRNA are transcribed in the nucleus of the eukaryote cells by polymerase II RNA in primary transcripts, the pri-miRNA, which contain hundreds of nucleotides. Later these are processed by type III RNAase, Drosha and its cofactor DGCR8, which releases stem-loop type precursors of 70 nt, double strand RNA, the pre-miRNA. These are exported to the cytoplasm through the Exportin-5 and Ran-GTP complex. On arriving in the cytoplasm, a complex containing Dicer, a type III RNAase, processes the pre-miRNA and generates small size double-stranded RNA molecules, of approximately 22 nt and with a short mean life, which is a selected strand (mature miRNA) while the other one is degraded. The mature miRNA interacts with a member of the Argonaute protein family and it is incorporated to the RNA (miRISC) induced silencing complex. After the miRNA is bound to its target mRNA, three things may occur: 1) degradation of the mRNA; 2) inhibition of the translation of the mRNA to proteins, or 3) deadenylation and reduction of the levels of mRNA.

while the other one is degraded. In mammals, the complex formed contains mature miRNA, the Dicer enzyme, the Argonaute protein and another protein that binds to double stranded RNA, TRBP [31]. In general, the miRNA strand, having less stability in base-pairing at its 5' end, is the guide strand or mature miRNA [32].

Mechanism of action

After the formation of the RISC complex, it is bound to the 3' untranslated region (3'-UTR) of the mRNA, although it can also be bound to the 5' untranslated region (5'-UTR) and the promoter region. The sequence in the miRNA that recognizes the 3'-UTR of the mRNA is known as the "seed region" and it is located at the 5' region of the miRNA, of nucleotide 2 to 7 [33]. After the miRNA is bound to its mRNA target, there may be a degradation of the mRNA, or the inhibition of the translation of mRNA to proteins, or the deadenylation and reduction of the levels of mRNA [34].

The miRNAs as biomarkers in cancer

The early diagnosis of a primary tumor improves the prognosis and response to treatment. Since there is no system that can be used to screen lung cancer in its early stages within the population, it is mostly diagnosed at advanced stages. The first evidence of an aberrant expression of the miRNAs in lung cancer was reported in 2006, when a group of them was

24. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA*. 2003;9(3):277-9.

25. Lee Y, Kim M, Han J, Yeom KH, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004;23(20):4051-60.

26. Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004;10(12):1957-66.

27. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*. 2006;125(5):887-901.

28. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003;17(24):3011-6.

29. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*. 2001;106(1):23-34.

30. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*. 2009;136(2):215-33.

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

identified, which were expressed differently in the tumor tissue compared to healthy tissues [35]. This opened the possibility of their use as biomarkers of this type of cancer. Recent studies demonstrated that the increase in the expression of the miR-21 was significantly different in the sputum of patients with lung cancer compared to healthy persons, with a sensitivity of 70 % and a specificity of 100 % [36]. In experiments with rats it was also found that the exposure to cigarette smoke modified the levels of expression of the miRNA [37], indicating that the changes in the levels of the miRNA can be used as biomarkers for cancer diagnosis in smokers.

The ten miRNA with aberrant expressions in tumor tissues, which can be used to confirm the diagnostic of lung cancer through computerized tomography, and very valuable in discriminating neoplastic from healthy tissues are: let-7, miR-21, -200b, -210, -219-1, -324, which are (induced); and miR-30a, -126, -45 and -486, which are (repressed) [38]. To develop therapies for specific targets, tumors must be classified as: non-small-cell lung cancers (NSCLC), the adenocarcinoma histological subtypes (ADC) and the squamous cell carcinomas (SCC). This, however, is not easy to do, especially if the biopsy is small or the tumors are hardly differentiated. In this sense, two miRNA, miR-21 and -205 were successfully used to distinguish ADC from SCC [39]. A characteristic expression pattern of five miRNA (miR-25, -34c-5p, -191, let-7e and -34a) used for this differentiation was also described [40]. It is also necessary to distinguish the primary tumors from the metastases. The overexpression of miR-182 was detected in primary tumors, while miR-126 was expressed in high concentrations in the metastases [41].

The main cause of death of patients with breast cancer is due to the complications derived from the metastases [42]. In recent years, a group of studies were carried out to identify and characterize the very complex cellular events that rule the process of metastasis. The miRNAs affect cellular adherence, migration, invasion, motility and angiogenesis [43]. Those associated to the metastasis process are called metastamirs. The first metastamir was described by Robert Weinberg and his group, who found that miR-10b starts the invasion and the metastasis process in breast cancer [44]. The first metastasis suppressor metastamir was described by Joan Massagué and his group [45], revealing that miR-335 suppresses metastasis and migration through its action on the SOX4 transcriptional factor, found in stem cells and on the tenascin C protein, which forms part of the extracellular matrix.

Metastamirs are used in breast cancer as prognostic biomarkers. For example, in a microarray study of miRNA, the expression of 249 miRNA was quantified in 299 breast tumors (185 were positive to the estrogen receptor, RE+; 114 negative, RE-). The miRNAs -7, -128a, -210 and -516-3p were related to the aggressiveness of the tumor in RE+ tumors and negative nodules, while miR-210 was associated to an early relapse in patients with RE- and negative nodules [46]. In breast cancer it was observed that miRNA 27 and those of the 17-92 family (miR-17, -18a, -19a, -19b, -20a and -92) negatively regulate the concentrations

of the transcriptional factors of the ZBTB family, and that these concentrations are significantly associated to survival [47, 48].

The survival of 466 patients with invasive ductal carcinoma (IDC), the most frequently diagnosed histological subtype, was recently carried out through the integration of the expressions of mRNA, miRNA and methylated DNA [49]. In the analysis of this integrated genetic pattern, it was found that 37 mRNA and 7 miRNA, within the clinical and pathological subclasses, are associated to general survival and that their prognostic value is higher than other commercially available genetic patterns for the stratification of patients with breast cancer, such as Mammaprint® and Oncotype Dx®.

The progress in the knowledge of the altered signaling routes in colorectal cancer (CRC), laid the foundations for the application of therapies with specific targets. For example the cetuximab monoclonal antibody against the epidermal growth factor receptor (EGFR) is used as a monotherapy against the CRC [50], or it is combined with chemotherapy [51]. It was recently known that patients with mutations in the K-ras gene (approximately 38 %) are resistant to the anti-EGFR therapy [52]. This therapy is therefore restricted to the subgroup of patients with CRC not having the K-ras gene mutation, although this is not an effective treatment for all of them and it would be necessary to find new markers. It was recently described that the miRNA let-7 [53], miR-143 [54] and miR-18a [55], with reduced concentrations in CRC, have K-ras as one of their target genes. In this sense, the predictive ability of 18 miRNA (several of which have the K-ras as their target) in 32 patients with metastatic CRC (CRCm) treated with cetuximab and chemotherapy, was evaluated. The increase in the expression of miR-200 and the decrease in that of miR-143, were associated with a longer period of time in which the patients with the mutated K-ras gene were free from progression. There was no correlation between the expression of the miRNA with the K-ras gene as the target, and the time that the patients with non-mutated K-ras were free from progression. Therefore, the inhibition of the expression of the K-ras gene by the miRNA is only relevant in the context where there are high levels of K-ras; i.e., when there are activator mutations [56].

In a study of the expression profiles of miRNAs in 99 patients with CRCm, 33 of them with non-mutated K-ras/BRAF genes, to predict those having a favorable response with cetuximab and a longer survival, it was found that patients with the progressive disease had an overexpression of miR-31 and an inhibition of miR-592. Patients were also grouped on the basis of the miRNAs expression profile and significant differences between groups were found. The patients with short survival had the miRNAs of the let-7 family, the miR-140-5p overexpressed and the miR-1224-5p inhibited [57].

The standard treatment for those with locally advanced CRC (approximately one third of all patients with CRC), are the neoadjuvant radiochemotherapies with capecitabine or 5-fluorouracil, and later surgical resection. Unfortunately, a large percentage of these tumors do not respond to the neoadjuvants and patients have high probabilities of having tumor relapses.

32. Schwarz DS, Hufvagner G, Du T, Xu Z, Aronin N, Zamore PD. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*. 2003;115(2):199-208.

33. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*. 2005;3(3):e85.

34. Treiber T, Treiber N, Meister G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb Haemost*. 2012;107(4):605-10.

35. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006;103(7):2257-61.

36. Wang Q, Wang S, Wang H, Li P, Ma Z. MicroRNAs: novel biomarkers for lung cancer diagnosis, prediction and treatment. *Exp Biol Med* (Maywood). 2012;237(3):227-35.

37. Izzotti A, Calin GA, Arrigo P, Steele VE, Croce CM, De Flora S. Downregulation of microRNA expression in the lungs of rats exposed to cigarette smoke. *FASEB J*. 2009;23(3):806-12.

38. Boeri M, Verri C, Conte D, Roz L, Modena P, Facchinetti F, et al. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(9):3713-8.

39. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol*. 2009;27(12):2030-7.

40. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2010;16(2):430-41.

41. Barshack I, Lithwick-Yanai G, Afek A, Rosenblatt K, Tabibian-Keissar H, Zepeniuk M, et al. MicroRNA expression differentiates between primary lung tumors and metastases to the lung. *Pathol Res Pract*. 2010;206(8):578-84.

42. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277-300.

43. Dumont N, Tlsty TD. Reflections on miR-ing effects in metastasis. *Cancer Cell*. 2009;16(1):3-4.

44. Ma L, Teruya-Feldstein J, Weinberg RA. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*. 2007;449(7163):682-8.

45. Tavazoie SF, Alarcon C, Oskarsson T, Padua D, Wang Q, Bos PD, et al. Endogenous human microRNAs that suppress breast cancer metastasis. *Nature*. 2008;451(7175):147-52.

46. Foekens JA, Sieuwerts AM, Smid M, Look MP, de Weerd V, Boersma AW, et al. Four miRNAs associated with aggressiveness of lymph node-negative, estrogen receptor-positive human breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008;105(35):13021-6.

47. Kim K, Chadalapaka G, Lee SO, Yamada D, Sastre-Garau X, Defossez PA, et al. Identification of oncogenic microRNA-17-92/ZBTB4/specificity protein axis in breast cancer. *Oncogene*. 2012;31(8):1034-44.

In a recent study, the profiles of the miRNAs were analyzed in 20 patients with tumors classified as sensitive or resistant to that therapeutic variant. The levels of expression of eight miRNAs were significantly different between both groups. The miRNAs -215, -190b and -29b2* were overexpressed in patients with resistant tumors, while the let-7e, miR-196b, -450a, -450b-5p and -99a* were overexpressed in sensitive tumors. The levels of expression of these miRNA enabled the classification of nine patients (out of 10) as non-responders, and the same number as responders. It was concluded that the miRNA form part of the response mechanism of the cancer cells of the rectum to radiochemotherapy, and therefore, they are considered to have an important potential as predictive markers in patients diagnosed with this neoplasia [58].

The miRNAs as therapeutic targets in cancer

The miRNAs have two characteristics that make them attractive as therapeutic targets for cancer. One of them is that they regulate several metabolic pathways: the complexity and heterogeneity of cancer suggests that the only way to develop a successful treatment is considering multiple genes simultaneously as targets. The second one is that there are microRNAs that are aberrantly overexpressed in cancer and they are known as oncomirs. Therefore, it may be easier and economically more attractive to develop drugs against the miRNA, which would be potentially useful to treat malignant tumors in several localizations. The inhibition of the miRNA may be achieved by antisense oligonucleotides or antagomir [59, 60] or competitive inhibitors called miRNA "sponges" [61]. These contain several binding sites to the miRNA, whether in a non-codified transcript or in the 3'-UTR of a reporter gene, and they have advantages in relation to the antagomir.

First of all, the antagomirs depend, for their effectiveness, on an extensive complementarity zone with the miRNA target [62]. Therefore, to neutralize several miRNAs a mixture containing antagomirs that are complementary to these miRNAs must be prepared, while if an mRNA containing multiple binding sites (typically 4 to 10 sites) to the miRNA of interest is introduced into the cell, it will specifically inhibit all the miRNAs having a complementary sequence to these binding sites.

In the second place, many cells are resistant to the introduction of the antagomirs, while the genetic construction containing the sponge can be introduced in the cell through several types of vectors. Thirdly, the antagomirs must be periodically administered at high concentrations to inhibit the expression of the target miRNA; while the expression of the genetic construct of the sponge in germ cells of transgenic animals would make it possible for the miRNA of interest to be inhibited for the entire life span of the animal [63]. However, although the inhibition technology of the miRNA sponge has advantages in experimentation with biological models, the inhibition using antagomirs is considered to be more attractive and has a greater potential from the therapeutic viewpoint. In fact, the first molecule targeting a miRNA in human beings, for the treatment of hepatitis produced by the

hepatitis C virus (HCV), was Miravirsin [64] (originally called SPC3649 [65]; Santaris Pharma A/S). It is an antagomir against miR-122, a positive regulator of the replication of HCV and a tumor suppressor in liver carcinoma.

In 2005, it was demonstrated that the miR-122 has two seed sites, which interact with the 5'-UTR region of the RNA of the HCV, and produce the increase of viral RNA in infected liver cells. This evidence indicates that the miR-122 is an important factor in the host and a potential target for the treatment of infections due to the HCV; this is relevant considering there are approximately 170 million persons in the world infected with HCV and it is the main cause of liver failure [66]. The idea of developing an antiviral therapy, based on miR-122 as the target, was attractive because of the limitations of the current treatments for the infections due to HCV. Besides its importance as the first anti-miRNA drug, there are another two attractive characteristics of Miravirsin. This antagomir was used to demonstrate that on modulating a miRNA with this type of molecule, the genes downstream the miRNA are also regulated. Furthermore, Miravirsin is a molecule with a chemical structure having a modification to increase its stability, affinity and specificity. Such modification consists of closing the ribose ring through a methylene bridge, which connects the oxygen at position 2 with the carbon at position 4, producing a locked nucleic acid (LNA). The LNAs are nucleotides with a high hybridization capacity and affinity for the single stranded RNA [67]. Therefore, the miRNAs modified with LNA, such as Miravirsin, offer encouraging perspectives for clinical practice.

At present, the biotechnology companies are developing miRNA or antagomir mimetics, and strategies for their systemic administration in cancer treatment and other diseases [64]. Taking into account the strong relationship between the miRNA and the deregulation of the malignant processes, a faster approval for the use of therapeutic strategies based on its modulation in monotherapies or combined with radio-, chemo-, or immunotherapies, are foreseen.

Circulating miRNAs

The description of the circulating miRNA meant the discovery of new mediators of the genetic expression. Although most of them are found and function inside the cell, the circulating miRNAs can also be found outside cells: in fluids such as plasma, saliva, amniotic fluid, urine and others [68]. Their composition and concentrations are related to several diseases, and they can therefore be used as biomarkers, measured through pathways that are hardly invasive, to assess and keep watch over the physiological state of the body. It is important to highlight that these miRNAs may be found in large amounts in extracellular fluids, and may be very stable, even under conditions of extreme temperature, pH and storage. Their composition in the plasma is identical in all persons, not depending on sex or age, so they are considered to be good clinical biomarkers [69]. It is not well defined, however, how their action is exerted. It has been said that they could be signal mediators, allowing the tumor cells to 'communicate' with the non-transformed cells from the microenvironment, which is crucial in

48. Tang W, Zhu J, Su S, Wu W, Liu Q, Su F, et al. MiR-27 as a prognostic marker for breast cancer progression and patient survival. *PLoS One*. 2012;7(12):e51702.

49. Volinia S, Croce CM. Prognostic microRNA/mRNA signature from the integrated analysis of patients with invasive breast cancer. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(18):7413-7.

50. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC, et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008;359(17):1757-65.

51. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009;360(14):1408-17.

52. Lievre A, Bachelot JB, Boige V, Cayre A, Le Corre D, Buc E, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008;26(3):374-9.

53. Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*. 2005;120(5):635-47.

54. Chen X, Guo X, Zhang H, Xiang Y, Chen J, Yin Y, et al. Role of miR-143 targeting KRAS in colorectal tumorigenesis. *Oncogene*. 2009;28(10):1385-92.

55. Tsang WP, Kwok TT. The miR-18a* microRNA functions as a potential tumor suppressor by targeting on K-Ras. *Carcinogenesis*. 2009;30(6):953-9.

56. Mekenkamp LJ, Tol J, Dijkstra JR, de Krijger I, Vink-Borger ME, van Vliet S, et al. Beyond KRAS mutation status: influence of KRAS copy number status and microRNAs on clinical outcome to cetuximab in metastatic colorectal cancer patients. *BMC Cancer*. 2012;12:292.

57. Mosakhani N, Lahti L, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundstrom J, Ristamaki R, et al. MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genet*. 2012;205(11):545-51.

58. Svoboda M, Sana J, Fabian P, Kocakova I, Gombosova J, Nekvindova J, et al. MicroRNA expression profile associated with response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Radiat Oncol*. 2012;7:195.

59. Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomir'. *Nature*. 2005;438(7068):685-9.

60. Garzon R, Marcucci G, Croce CM. Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2010;9(10):775-89.

61. Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat Methods*. 2007;4(9):721-6.

62. Esau CC. Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. *Methods*. 2008;44(1):55-60.

63. Ebert MS, Sharp PA. MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA*. 2010;16(11):2043-50.

malignant progression. Therefore, the molecules that transport any type of information to the microenvironment, such as cytokines, chemokines and growth factors, are bound to circulating miRNAs [70].

Limitations in the use of miRNAs as biomarkers

The introduction of new biomarkers in clinical practice is limited because of insufficient sensitivity, specificity and stability of the potential markers.

Although miRNAs are considered biomarkers with a great potential, they also have certain limitations, such as their specificity. The miR-21 is high, not only in patients with pancreas cancer, but also in those with diffuse large B-cell lymphoma [71]. Another important aspect is how to obtain it, since no homogeneity is found in the protocols for their isolation and characterization, the starting material (whether it is plasma, serum, tissue or paraffin blocks), and the characteristics of the patients included in the studies. There is evidence that erythrocytes are an important source of circulating miRNAs and that hemolysis can alter up to 50 % the levels of a certain miRNA, as a biomarker in the plasma. Therefore, one must be very rigorous when interpreting the results of the mediation of the circulating miRNA associated with cancer, to figure out if they are really related to the malignant process and not to an event that is a consequence of cellular lysis. Another aspect that must be standardized is the quantification of the miRNAs. There is no consensus on which molecule to use as the gene for normalization: whether it is a miRNA that does not vary, another RNA molecule or another gene.

Final comments

In the last two decades, there has been a significant progress in the identification and characterization of genetic and epigenetic causes of cancer, in the assessment of possible biomarkers, and in the development of drugs against new targets, which had an impact on the relatively insufficient increase of survival time of oncological patients after their diagnosis.

A greater in-depth knowledge of cancer biology may help identify other alterations that, by causing or contributing to malignancy, may be used as new biomarkers or molecular targets and continue increasing survival time of the patients. In this sense, it was recently found that the miRNAs are essential molecules with important functions in the control of several physiological and pathological processes (including cancer), with a differentially modulated expression in healthy tissues or in those undergoing a pathological process not associated to malignancy, and correlated to clinical-pathological characteristics.

The high stability of the miRNAs in tissues and body fluids, and the possibility of being quantified, although they are found in small amounts, are advantages for diagnosis, prognosis, and stratification of patients, with the aim of increasing the objective responses to antineoplastic treatments. For example, the miRInform® Pancreas LDT (Asuragen® Inc) system [72] is already on the market; it was developed after the analysis of the differential expression of the miR-196a and the miR-217 [73, 74]. Through a biopsy, this system makes it possible to discriminate chronic pancreatitis from pancreatic adenocarcinoma. Furthermore, the ability of each miRNA to modulate the expression of multiple mRNA at the same time is also attractive, since it enables, for example, to re-establish functionality of a complete suppressor route that had been affected, in contrast to other strategies that would only allow to modulate the expression of a gene but not involve the entire route. This feature makes them very attractive as therapeutic targets themselves, or to decrease the resistance of other treatments; these are aspects under intense study by academic researchers or the industry.

In the next 2 to 5 years an increase in the systems based on miRNAs approved by the regulating agencies is foreseen. They may be introduced in routine clinical practice to increase the sensitivity and specificity of the diagnostic and prognostic tests, which may offer new opportunities for better personalized treatments.

64. Pereira DM, Rodrigues PM, Borralho PM, Rodrigues CM. Delivering the promise of miRNA cancer therapeutics. *Drug Discov Today*. 2013;18(5-6):282-9.

65. Branch AD, Rice CM. Antisense gets a grip on miR-122 in chimpanzees. *Science Translational Medicine*. 2010;2(13).

66. Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309(5740):1577-81.

67. Vester B, Wengel J. LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA. *Biochemistry*. 2004;43(42):13233-41.

68. Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010;56(11):1733-41.

69. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*. 2011;39(16):7223-33.

70. Allegra A, Alonci A, Campo S, Penna G, Petrucci A, Gerace D, et al. Circulating microRNAs: new biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (review). *Int J Oncol*. 2012;41(6):1897-912.

71. Gu L, Song G, Chen L, Nie Z, He B, Pan Y, et al. Inhibition of miR-21 induces biological and behavioral alterations in diffuse large B-cell lymphoma. *Acta Haematol*. 2013;130(2):87-94.

72. miRInform® Pancreas [Internet]. Austin, TX: Asuragen® Inc. c2013 [2013 Oct 17]. Available from: <http://asuragen.com/products-and-services/clinical-lab/mirinform-pancreas/>

73. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, et al. MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene*. 2007;26(30):4442-52.

74. Szafranska AE, Doleshal M, Edmunds HS, Gordon S, Luttges J, Munding JB, et al. Analysis of microRNAs in pancreatic fine-needle aspirates can classify benign and malignant tissues. *Clin Chem*. 2008;54(10):1716-24.

Received in October, 2013.

Accepted in March, 2014.