

## Micro-ARN. Posibles implicaciones terapéuticas en las enfermedades hepáticas

BRUNO SANGRO

Unidad de Hepatología. Departamento de Medicina Interna. Clínica Universitaria de Navarra. Pamplona. Navarra. España.

El estudio del genoma humano ha demostrado que grandes porciones no guardan la información para fabricar proteínas, sino para la formación de fragmentos de ARN no codificantes pero activos<sup>1</sup>. De entre estos fragmentos, los micro-ARN (miARN) son moléculas de ARN de cadena sencilla pequeñas (de 21 a 23 nucleótidos), que existen en la célula de forma natural y en ella contribuyen a regular la expresión de genes<sup>2,3</sup>. El primer miARN, denominado *lin-4*, fue identificado en 1993<sup>4</sup>, pero el mundo de los miARN no despegó hasta el año 2000 en paralelo al desarrollo de otro tipo de moléculas pequeñas de ARN, los ARN de silenciamiento, como herramientas para estudiar las propiedades de los genes. Hasta la fecha se han

descrito en humanos 1.048 miARN (miRBase release 16.0, diciembre de 2010). La expresión de miARN es, en general, específica de órgano y sus funciones incluyen la regulación de procesos celulares importantes como la diferenciación, el desarrollo tisular, la apoptosis, el metabolismo o la proliferación celulares, la respuesta inflamatoria y la iniciación y progresión del cáncer<sup>2,3,5-7</sup>.

### Papel de los miARN en la regulación génica

Como se ilustra en la figura 1, en los animales los miARN se transcriben inicialmente como largos transcritos (pri-miARN), que después son procesados dentro del núcleo por la ARNasa Drosha, dando lugar a fragmentos horquilla de 70-100 nucleótidos. Estos fragmentos son trasladados al citoplasma por la exportina-5 y allí son procesados por la ARNasa Dicer, dando lugar a pequeños duplos de miARN de unos 22 nucleótidos. Estos duplos contienen una hebra de miARN maduro y otra de miARN llamado pasajero. Una vez deshibridado, el miARN maduro se incorpora a un complejo llamado RISC (complejo de silenciamiento inducido por ARN). En este complejo, la interacción entre un miARN y su mARN complementario resulta en un bloqueo de la iniciación de la traducción, en una escisión del mARN, o en ambas cosas. El resultado es que el miARN es capaz de dificultar o abrogar, de forma selectiva, la traducción de su ARN complementario<sup>8</sup>.

De esta manera, los miARN contribuyen a silenciar determinados genes en determinadas situaciones. Según predicciones bioinformáticas<sup>9</sup>, cada mARN puede ser regulado por diversos miARN y se estima que un mismo miARN puede interferir con la expresión de decenas o centenares de genes<sup>10,11</sup>. Este hecho tiene una importante implicación práctica ya que la inhibición de la función de un miARN utilizando una nueva generación de fármacos denominados *antagomirs* podría traducirse en efectos terapéuticos muy diversos. Los *antagomirs* son oligonucleótidos ingenierizados que pueden silenciar de forma específica un miARN<sup>12</sup>, silenciamiento que puede ser muy duradero debido a la larga vida media de los miARN endógenos<sup>10</sup>.

#### Puntos clave

- Los micro-ARN (miARN) son pequeñas moléculas de ARN de cadena sencilla de unos 22 nucleótidos que contribuyen a regular la expresión de genes.
- En el citoplasma, el miARN maduro se incorpora a un complejo y bloquea de forma específica la expresión de su mARN complementario.
- Se considera que más de un centenar de miARN podrían tener un papel importante en la regulación de funciones hepáticas, siendo miR-122 el más abundante.
- La expresión de miR-122 tiene un papel importante en la infección por el virus C, ya que su unión al mARN viral parece estimular la replicación viral y su expresión es muy baja en los pacientes no respondedores.
- Diversos miARN están desregulados en el hepatocarcinoma y pueden interferir en las distintas vías de señalización celular alteradas en este tumor.
- Los *antagomirs* son oligonucleótidos ingenierizados capaces de silenciar de forma específica un miARN, cuyo uso en distintas enfermedades está siendo desarrollado.

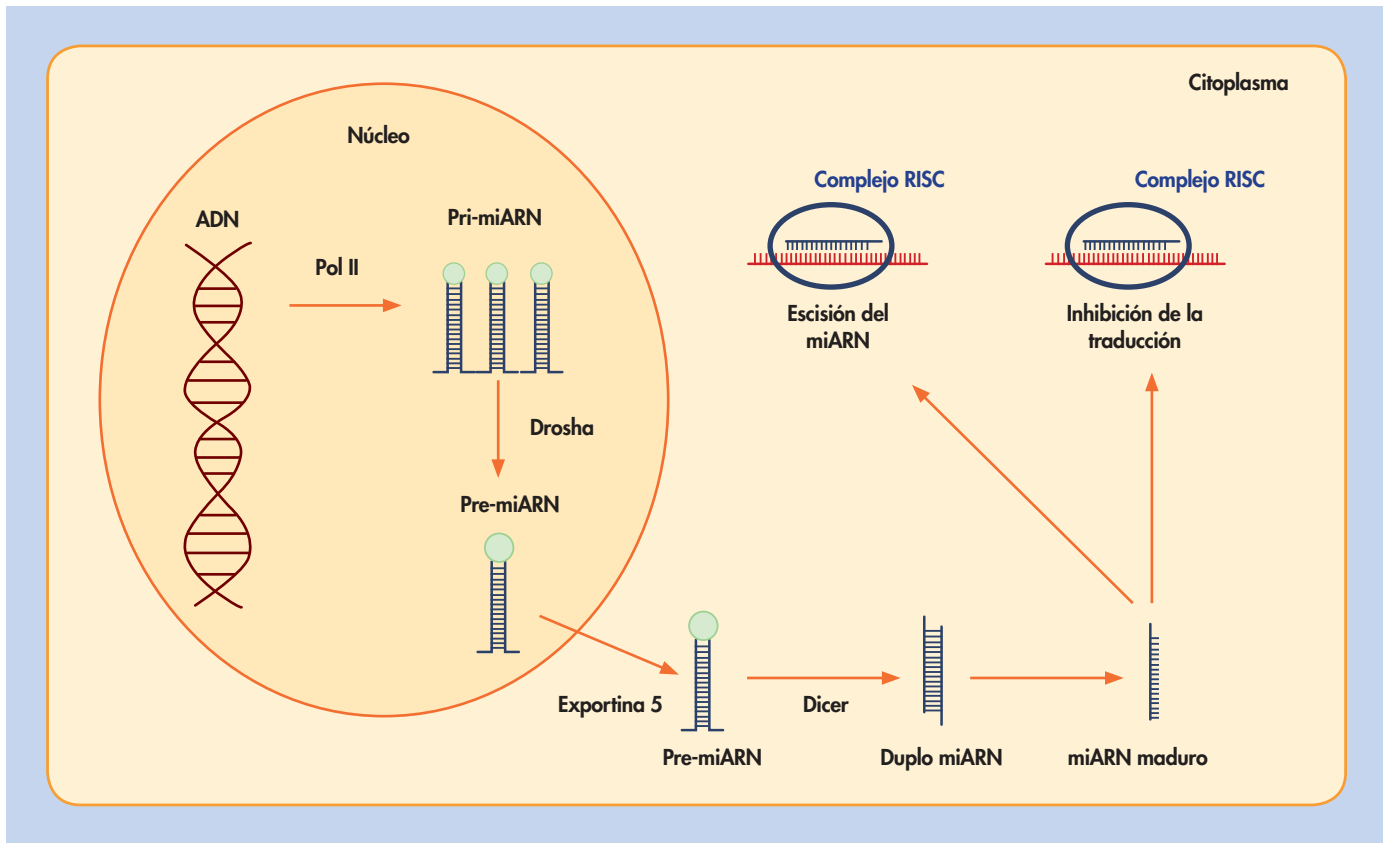


Figura 1. Representación esquemática de la producción y acción de los miARN.

## miARN y funciones hepáticas

miR-122 se expresa específicamente en el hígado y es el más abundante en este órgano (alrededor del 70% de todo el miARN hepático). Muchos otros, como miR-1, miR-16, miR-27b, miR-30d, miR-126, miR-133, miR-143 y la familia let-7, también se expresan abundantemente en el hígado. De hecho, son más de un centenar los miARN sobre los que se predice un papel en la regulación de funciones hepáticas<sup>13</sup>. Es importante tener en cuenta, sin embargo, que cada tipo celular presente en el hígado, de los hepatocitos a las células estelares hepáticas, puede tener su propio perfil de miARN. Y también que se desconoce prácticamente todo de cómo se regula la expresión de los miARN en el tejido hepático. Como ejemplo de papel regulador, entre las funciones conocidas de miR-122 está el metabolismo lipídico. Su silenciamiento en ratones alimentados con dieta rica en grasa produce una reducción significativa de la esteatosis hepática asociada a una reducción de la síntesis de colesterol y a la estimulación de la oxidación de ácidos grasos<sup>14</sup>. De hecho, se está desarrollando la posible aplicación de *antagomirs* para el tratamiento de la hipercolesterolemia. Los miARN también pueden estar implicados en la respuesta de los colangiocitos a las citocinas proinflamatorias, como interferón gamma, y participar en la regulación de la respuesta inflamatoria biliar<sup>15</sup>.

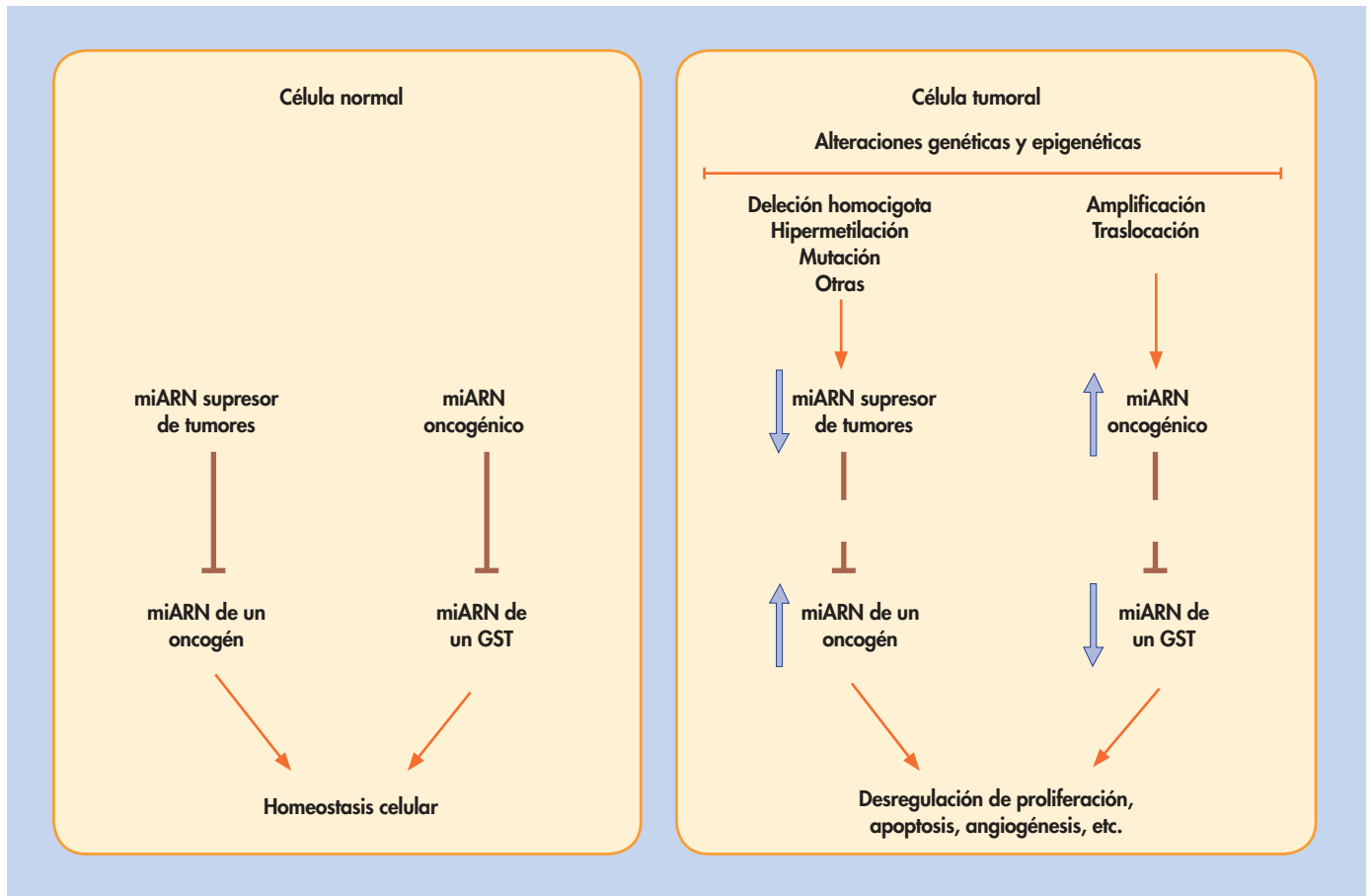
## miARN y hepatitis virales

La expresión de miR-122 tiene un papel muy importante en la infección por virus C y, aunque el mecanismo por el que

esto ocurre aún no está claro del todo, parece que su unión al mARN viral estimula la replicación del virus. En cultivos celulares, la inhibición de miR-122 reduce la replicación viral<sup>16</sup>. Por otro lado, los interferones modulan la expresión de varias decenas de miARN en hepatocitos infectados con el virus C y 8 de ellos, con complementariedad casi perfecta para secuencias del virus C (miR-1, miR-30, miR-128, miR-196, miR-296, miR-351, miR-431 y miR-448), se ven sobreexpresados por la acción del interferón y son capaces de inhibir la replicación del virus C<sup>17</sup>. Analizando biopsias de pacientes con hepatitis crónica C sometidos a terapia antiviral, se ha observado que la expresión de miR-122 no se correlaciona con la carga viral antes del tratamiento, pero es muy baja en los pacientes no respondedores<sup>18</sup>.

## miARN y hepatocarcinoma

Más de la mitad de los miARN humanos conocidos se localizan en puntos del genoma implicados en el desarrollo del cáncer, lo que señala que algunos miARN podrían estar implicados en la tumorigénesis. Teóricamente, un miARN subexpresado que regula un oncogén podría actuar como un gen supresor de tumores y, a la inversa, un miARN sobreexpresado que regula un gen supresor de tumores podría actuar como un oncogén (fig. 2). Como queda resumido en la tabla 1, en las células de hepatocarcinoma se conoce que algunos miARN están sobreexpresados y otros están subexpresados en comparación con el tejido hepático no maligno u otros tumores hepáticos benignos, como el adenoma o la hiperplasia nodular



**Figura 2.** Comportamiento de los miARN como oncogenes o genes supresores de tumores (GST).

focal<sup>19-23</sup>. Además, otros miARN se correlacionan con el grado de diferenciación, lo que apunta a que podrían estar involucrados en la progresión de la enfermedad<sup>24</sup>. La alteración de la expresión de miARN en el hepatocarcinoma puede ser la consecuencia de la transformación maligna, pero en otros casos puede ocurrir que los propios miARN tengan un papel en el proceso de transformación. Entre los genes

potencialmente diana de miARN-122, habitualmente subexpresado en hepatocarcinoma<sup>19,20</sup>, hay al menos dos implicados en la transformación maligna, como N-myc y ciclina G1. En el modelo de HCC de la marmota, N-myc está frecuentemente reordenado por acción del virus de la hepatitis de la marmota, similar al virus de la hepatitis B humana, y existe una correlación inversa entre la expresión de miR-122 y ciclina G1 en HCC humanos<sup>21</sup>.

En conjunto, los miARN pueden interferir en distintas vías de señalización celular alteradas en el HCC<sup>25</sup>. La sobreexpresión de miR-21 y miR-17-92<sup>26-28</sup> puede contribuir al desarrollo de HCC a través de la regulación de la vía de TGFβ/SMAD. La supresión de PTEN mediada por miR-21<sup>29,30</sup> puede contribuir a activar la vía de PI3K/AKT/mTOR. La subexpresión de la familia miR-200<sup>21,24,26</sup> puede afectar a su regulación negativa de la señalización de Wnt. Estos datos señalan la actuación sobre los miARN como una potencial herramienta de enorme interés en el tratamiento del cáncer hepático.

**Tabla 1.** Micro-ARN involucrados en la carcinogénesis hepática

Micro-ARN sobreexpresados
let-7a, miR-21, miR-224, miR-34a, miR-221/222, miR-106a, miR-23a, miR-203, miR-21
Micro-ARN subexpresados
miR-122, miR-125b, miR-422b, miR-145, miR-198 y miR-199a, miR-223, miR-101
Micro-ARN asociados con metástasis
miR-30c-1, miR-1-2, miR-34a, miR-148a, miR-124a-2
Micro-ARN asociados con diferenciación
miR-222, miR-106a, miR-92, miR-17-5p, miR-20, miR-18
Micro-ARN asociados con etiología
miR-126 (alcohol), miR-96 (VHB)

## miARN y otras hepatopatías

Los miARN también pueden tener un papel importante en enfermedades hepáticas congénitas. Como ejemplo, está la enfermedad fibropoliquística. Los valores de miR-15a son bajos en pacientes con distintas variantes de esta enfermedad. El resultado es un aumento en la expresión de Cdc25A, un regu-

lador del ciclo celular que, *in vitro*, produce un aumento de la proliferación celular y la citogénesis<sup>31,32</sup>.

Además, existen indicios de que los miARN podrían servir como marcadores de daño hepático. En un modelo animal de hepatitis por acetaminofen, los valores circulantes de miR-122 y miR-192 experimentan incrementos relacionados con la dosis y la duración de la exposición al fármaco que son similares a los observados en las transaminasas, pero se detectan más precozmente<sup>33</sup>. Ello apunta a que estas moléculas podrían ser marcadores precoces de hepatotoxicidad por fármacos.

Los miARN pueden ser importantes en el desarrollo de fibrosis hepática en diferentes procesos. Se ha observado una disminución de la expresión de miR-29a y miR-29b durante la activación de células estelares hepáticas en la rata, en biopsias de pacientes con infección por el virus C y en un modelo animal de fibrosis por ligadura del conducto biliar. Todo ello señala que la familia miR-29 puede tener un efecto antifibrogénico en el hígado<sup>34</sup>, como lo tiene en el corazón.

## Conclusiones: un futuro por descubrir

El empleo de *microarrays* de miARN ha hecho posible la realización de grandes estudios de perfiles en pacientes con cáncer, y ha confirmado que los miARN se expresan de forma diferente en los tejidos normales y alterados por distintos procesos como la inflamación, la degeneración o el cáncer. Sin embargo, desconocemos en gran medida cuál es el significado de esta desregulación y, aunque se ha avanzado en el conocimiento de la función de algunos miARN, la de la mayoría de ellos permanece ignota. La complejidad de la regulación de la expresión génica a través de miARN podría ser aún mayor de lo que imaginamos, ya que se han descrito otras familias de genes no codificantes con importantes funciones regulatorias y sabemos ya que existen interacciones entre unos miARN y otros. En cualquier caso, parece evidente que los miARN tienen un papel muy relevante en la regulación de las funciones celulares en el tejido sano y enfermo, y que el conocimiento de los mecanismos de esta regulación nos puede permitir desarrollar herramientas relevantes de diagnóstico, pronóstico y tratamiento de muchas enfermedades.

## Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

1. Kiss T. Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell*. 2002;109:145-8.
2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 2004;116:281-97.
3. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431:350-5.
4. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993;75:843-54.
5. Voinnet O. Induction and suppression of RNA silencing: insights from viral infections. *Nat Rev Genet*. 2005;6:206-20.
6. Nelson P, Kiriakidou M, Sharma A, Maniatakis E, Mourelatos Z. The microRNA world: small is mighty. *Trends Biochem Sci*. 2003;28:534-40.
7. Taganov KD, Boldin MP, Baltimore D. MicroRNAs and immunity: tiny players in a big field. *Immunity*. 2007;26:133-7.
8. Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol*. 2009;15:1665-72.
9. Griffiths-Jones S, Saini HK, Van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008;36:D154-8.
10. ●● Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2005;6:376-85.
11. Zeng Y. Principles of micro-RNA production and maturation. *Oncogene*. 2006;25:6156-62.
12. ●● Krützfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*. 2005;438:685-9.
13. Arora A, Simpson DA. Individual microRNA expression profiles reveal the effects of specific microRNAs. *Genome Biol*. 2008;9:R82.
14. Esau C, Davis S, Murray SF, Yu XX, Pandey SK, Pear M, et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by *in vivo* antisense targeting. *Cell Metab*. 2006;3:87-98.
15. Gong AY, Zhou R, Hu G, Li X, Splinter PL, O'Hara SP, et al. MicroRNA-513 regulates B7-H1 translation and is involved in IFN- $\gamma$ -induced B7-H1 expression in cholangiocytes. *J Immunol*. 2009;182:1325-33.
16. ● Jopling CL, Yi M, Lancaster AM, Lemon SM, Sarnow P. Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science*. 2005;309:1577-81.
17. Pedersen IM, Cheng G, Wieland S, Volinia S, Croce CM, Chisari FV, et al. Interferon modulation of cellular microRNAs as an antiviral mechanism. *Nature*. 2007;449:919-22.
18. Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med*. 2009;15:31-3.
19. Kutay H, Bai S, Datta J, Motiwala T, Pogribny I, Frankel W, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*. 2006;99:671-8.
20. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133:647-58.
21. Gramantieri L, Ferracin M, Fornari F, Veronese A, Sabbioni S, Liu CG, et al. Cyclin G1 is a target of miR-122a, a microRNA frequently down-regulated in human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2007;67:6092-9.
22. Wong QW, Lung RW, Law PT, Lai PB, Chan KY, To KF, et al. MicroRNA-223 is commonly repressed in hepatocellular carcinoma and potentiates expression of Stathmin1. *Gastroenterology*. 2008;135:257-69.
23. Varnholt H, Drebbler U, Schulze F, Wedemeyer I, Schirmacher P, Dienes HP, et al. MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008;47:1223-32.
24. Murakami Y, Yasuda T, Saigo K, Urashima T, Toyoda H, Okanoue T, et al. Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene*. 2006;25:2537-45.
25. Mott JL. MicroRNAs involved in tumor suppressor and oncogene pathways: implications for hepatobiliary neoplasia. *Hepatology*. 2009;50:630-7.
26. Jiang J, Gusev Y, Aderca I, Mettler TA, Nagorney DM, Brackett DJ, et al. Association of MicroRNA expression in hepatocellular carcinomas with hepatitis infection, cirrhosis, and patient survival. *Clin Cancer Res*. 2008;14:419-27.
27. Connolly E, Melegari M, Landgraf P, Tchakivkovskaya T, Tennant BC, Slagle BL, et al. Elevated expression of the miR-17-92 polycistron and miR-21 in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma contributes to the malignant phenotype. *Am J Pathol*. 2008;173:856-64.
28. Liu WH, Yeh SH, Lu CC, Yu SL, Chen HY, Lin CY, et al. MicroRNA-18a prevents estrogen receptor- $\alpha$  expression, promoting proliferation of hepatocellular carcinoma cells. *Gastroenterology*. 2009;136:683-93.
29. Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007;133:647-58.
30. Meng F, Henson R, Lang M, Wehbe H, Maheshwari S, Mendell JT, et al. Involvement of human micro-RNA in growth and response to chemotherapy in human cholangiocarcinoma cell lines. *Gastroenterology*. 2006;130:2113-29.
31. Chu AS, Friedman JR. A role for microRNA in cystic liver and kidney diseases. *J Clin Invest*. 2008;118:3585-7.
32. Lee SO, Masyuk T, Splinter P, Banales JM, Masyuk A, Stroope A, et al. MicroRNA15a modulates expression of the cell-cycle regulator Cdc25A and affects hepatic cystogenesis in a rat model of polycystic kidney disease. *J Clin Invest*. 2008;118:3714-24.
33. ● Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:4402-7.
34. Jiang X, Tsitsiou E, Herrick SE, Lindsay MA. MicroRNAs and the regulation of fibrosis. *FEBS J*. 2010;277:2015-21.

## Bibliografía recomendada

Chen XM. MicroRNA signatures in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15:1665-72.

*Una interesante revisión de los potenciales papeles de los miARN en las enfermedades hepáticas.*

Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med.* 2009;15:31-3.

*Una de las primeras asociaciones entre un miARN y un proceso médico, en este caso la respuesta al tratamiento antiviral combinado para el virus de la hepatitis C.*

Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, et al. Circulating microRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:4402-7.

*Descripción del posible papel de miARN circulantes como marcadores de daño hepático en relación con hepatotoxicidad.*

Ji J, Wang XW. New kids on the block: Diagnostic and prognostic microRNAs in hepatocellular carcinoma. *Cancer Biol Therapy.* 2009;8:1683-90.

*Una revisión completa y bien escrita sobre el posible papel de los miARN en el hepatocarcinoma.*