UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

"LOS MICROARN Y SU IMPORTANCIA EN EL DESARROLLO, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER"

TRABAJO ESCRITO VÍA CURSOS DE EDUCACIÓN CONTINUA

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

IINDIRA ISELA BRITO ARELLANO

CIUDAD UNIVERSITARIA CDMX

AÑO 2024

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

VNIVERSIDAD NACIONAL AVTONOMA DE MEXICO

PROTESTA UNIVERSITARIA DE INTEGRIDAD Y HONESTIDAD ACADÉMICA Y PROFESIONAL
(Titulación o Graduación con trabajo escrito)

De conformidad con lo dispuesto en los artículos 87, fracción V, del Estatuto General, 68, primer párrafo, del Reglamento General de Estudios Universitarios y 26, fracción I, y 35 del Reglamento General de Exámenes, me comprometo en todo tiempo a honrar a la Institución y a cumplir con los principios establecidos en el Código de Ética de la Universidad Nacional Autónoma de México, especialmente con los de integridad y honestidad académica.

De acuerdo con lo anterior, manifiesto que el trabajo escrito titulado “Los microARN y su importancia en el desarrollo, diagnóstico y tratamiento contra el cáncer” que presenté para obtener el título/grado de Química Farmacéutica Bióloga, es original, de mi autoría y lo realicé con el rigor metodológico exigido por la Facultad de Química, citando las fuentes de ideas, textos, imágenes, gráficos u otro tipo de obras empleadas para su desarrollo.

En consecuencia, acepto que la falta de cumplimiento de las disposiciones reglamentarias y normativas de la Universidad, en particular las ya referidas en el Código de Ética, llevará a la nulidad de los actos de carácter académico administrativo del proceso de titulación/graduación.

Atentamente

Indira Isela Brito Arellano
310000350

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	**Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño**
VOCAL:	**Profesor: Adelaida Díaz Vilchis**
SECRETARIO:	**Profesor: Lilian González Segura**
1er. SUPLENTE:	**Profesor: Mireya Rodríguez Penagos**
2° SUPLENTE:	**Profesor: Alberto Ortega Vázquez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

CONJUNTO E, EDIFICIO DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA, LABORATORIO 105

ASESOR DEL TEMA:

DRA. MARTHA PATRICIA COELLO COUTIÑO

SUSTENTANTE:

INDIRA ISELA BRITO ARELLANO

Índice

Lista de abreviaturas 5
Resumen 8
Introducción 10
Biogénesis de microARN 10
Sitio de unión 3´UTR y semillas 14
Unión *miARN*-ARNm 15
Los microARN y el cáncer 16
Mecanismos de expresión anormal de *miARN* en neoplasias 18
- Amplificación o eliminación de genes de *miARN* 18
- Regulación de la transcripción de *miARN*. 20
- Control epigenético de *miARN* 23
  - Metilación del ADN 23
  - Modificación de histonas 24
- Función anormal de genes en la biogénesis de *miARN* 25

microARN circulantes 29
Biomarcadores de *miARN* 31
Los microARN como terapia contra el cáncer 35
- Inhibición de *miARN* 35
  - Oligonucleótidos antisentido (ASO) y Oligonucleótidos anti-*miARN* (AMO) ... 36
  - Vectores de expresión (esponjas de *miARN*) 43
  - Moléculas pequeñas inhibidoras de *miARN* (SMIR) 44
- Imitadores de *miARN* 46

Entrega de microARN 49
- Vectores virales 51
- Vectores de lípidos 52
- Nanopartículas 53

Terapias basadas en *miARN* 57
Conclusiones 59
Bibliografía 60

Lista de abreviaturas

AGO: proteínas Argonautas

ARNm: ARN mensajero

ARNt: ARN de transferencia

ARNnc: ARN no codificantes

ASO: oligonucleótidos antisentido

AMO: oligonucleótidos anti-miARN

AAV: virus adenoasociados

BCL2: linfoma de células B 2

BLM: Bleomicinas

c-Myc: protooncogén MYC

CTGF: factor de crecimiento del tejido conectivo

CpG (islas): regiones genómicas con alta frecuencia de citosina y guanina

ccRcc: carcinoma renal de células claras

CE: carcinoma endometrial

CTCL: linfoma cutáneo de células T

DCP1: descapsulación del ARNm 1

DCP2: descapsulación del ARNm 2

DLBCL: linfoma difuso de células B grandes

D1151Y: mutación de Drosha

D1709: mutación de Dicer

DDX5: helicasa 5 de DEADbox

DDX7: polipéptido 7 de DEAD box

DEAD box: familia de proteínas conservadas de unión al ARN que pertenecen al grupo más amplio de las helicasas celulares DExD/H.

DBHS: proteínas de *Drosophila behavior/human splicing*. Regulan la transcripción

DOTAP: 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano

DOTMA: cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N, N, N-trimetilamonio

DOPC: 1,2-di-(9Z-octadecenoil) -sn -glicero-3-fosfocolina

DOPE: 1,2-Dioleoil -sn -glicero-3-fosfoetanolamina

DSPC: 1,2-diestearoil-sn-glicero-3-fosfocolina

eIF4E: factor de iniciación de la traducción eucariota 4E

E2F1: factor de transcripción E2F2

ERα: receptor de estrógeno alfa

E1147k: mutación de Drosha

E1705: mutación de Dicer

Evs: vesículas extracelulares

EGFR: factor de crecimiento epidérmico

G Kan A: kanamicina A guanidinilada

G Neo B: neomicina B guanidinilada

EC50: concentración media efectiva

HDAC: histonas desacetilasas

HDL: lipoproteínas de alta densidad

LLC-B: Leucemia Linfocítica Crónica de células B

LNA: ácidos nucleicos bloqueados

miARN: microARN

miARN*: hebra pasajera

m7G: 7-metilguanina

MHV68: gammaherpesvirus murino 68

MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos

Mdm2: proteína de unión a p53

Mutp53: mutante p53

NR: receptores nucleares

PAN: subunidad de ribonucleasa específica poli(A**)**

PS: fosforotioato

PMO: oligómeros de morfolino de fosforodiamidato

PNA: ácidos nucleicos peptídicos

PLL: polilisina

PEI: polieterimina

PBAE: poli(beta-amino ésteres)

PLGA: poli (ácido láctico-co-glicólico**)**

PLN: nanopartículas lipídicas poliméricas

PEG: Polietilenglicol

qPCR: PCR cuantitativo

RISC: complejo silenciador inducido por ARN

shRNA: ARN de horquilla pequeña

SMIR: Moléculas pequeñas inhibidoras de miARN

TP53: proteína tumoral p53

THBS1: trombospondina 1

TPF: Tripaflavina

UTR: región no traducida en los genes

VHC: virus de la hepatitis C

XPO5: exportina 5

XPO1: exportina 1

XRN1: exoribonucleasa 1

ZEN: grupo naftil-azo (N, N-dietil-4-(4-nitronaftalen-1-ilazo)-fenilamina)

Resumen

Los microARN (*miARN*) son ARN cortos no codificantes de aproximadamente 23 nucleótidos altamente conservados que modulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la unión con el ARNm y conducen a la inhibición de la traducción o a la degradación del ARNm objetivo.

Las moléculas de *miARN* están codificadas en el genoma humano, se procesan a partir de genes que codifican para *miARN* o intrones, son transcritos y procesados en el núcleo para después ser trasportados al citoplasma donde se integrarán a un complejo llamado RISC-Dicer y junto a la proteína AGO2 lo guiarán hacia las secuencias de ARNm blanco para inducir su degradación o inhibición de la traducción.

El mecanismo de degradación o inhibición de la traducción depende de la unión complementaria del *miARN* con el ARNm; la complementariedad perfecta conduce a la degradación y la complementariedad imperfecta conduce a la inhibición de traducción. Ya que un *miARN* puede unirse perfecta o imperfectamente puede tener diversos sitios diana y a su vez un ARNm puede ser receptor de varios miARN permitiendo que la regulación sea tanto especifica como a gran escala.

Debido a que los *miARN* desempeñan funciones reguladoras fundamentales en la actividad celular, como en el desarrollo, diferenciación, proliferación, metabolismo, apoptosis y estabilidad genómica, están estrictamente regulados, además de desempeñar un papel en muchos estados patológicos, lo que los convierte en candidatos como agentes terapéuticos. Durante las últimas décadas, se ha observado una desregulación de la expresión de *miARN* en diversos tumores.

Algunos *miARN* contribuyen directamente en la oncogénesis en diversos tejidos ya que funcionan como supresores de tumores u oncogenes y, por lo tanto, se cree que su desregulación es un mecanismo importante que apoya al desarrollo y progresión del cáncer además de ser marcadores de susceptibilidad génica al cáncer. Dicha desregulación podría ser causada por múltiples mecanismos, incluida la amplificación o eliminación de genes de *miARN*, control transcripcional anormal

de los *miARN*, cambios epigenéticos desregulados y defectos en la maquinaria de biogénesis de los *miARN*.

Las células cancerosas con expresión anormal de *miARN* desarrollan la capacidad de mantener la señalización proliferativa, evadir los supresores del crecimiento, resistir la muerte celular, activar la invasión y la metástasis e inducir la angiogénesis.

Actualmente se está investigando que los *miARN* tengan un gran papel en los métodos de pronóstico y diagnóstico ya que cumplen varios de los criterios para ser un biomarcador, como una alta especificidad, fácil accesibilidad y sensibilidad. Además en muchos estudios preclínicos e in vitro han inhibido los oncomiR o reintroducido los *miRNA* oncosupresores en células cancerosas, lo que demuestra que estas terapias son efectivas para dianas terapéuticas y terapias, sin embargo, todavía existen muchos problemas y desafíos con respecto a la sensibilidad, especificidad, selectividad y los efectos no dirigidos asociados de las terapias con *miAR*N, ya que al estar regulando más de un objetivo y cada objetivo está regulado por más de un *miARN*, puede conducir a una toxicidad no deseada.

Introducción

Los microARN (*miARN*) son ARN no codificantes cortos de 18 a 25 nucleótidos altamente conservados que regulan la expresión génica a nivel postranscripcional mediante la unión con la región 3´UTR del ARNm objetivo y conducen a la inhibición de la traducción o a la degradación de este.

El primer *miARN* que fue descubierto es *lin-4*, que inhibe *LIN-14* en *Caenorabditis elegans* en 1993. Desde entonces se han identificado cientos de *miARN* en plantas, animales y virus mediante clonación molecular y enfoques bioinformáticos. Se cree que controlan más del 50% de los genes codificantes de proteínas de mamíferos. [1, 2]

Los *miARN* desempeñan funciones reguladoras fundamentales para un desarrollo normal y participan en una variedad de procesos biológicos como el desarrollo, la diferenciación, la proliferación, la apoptosis y la estabilidad genómica. La expresión aberrante de *miARN* está asociada con muchas enfermedades humanas, como el cáncer o enfermedades cardiacas [3, 10]

Biogénesis de microARN

La biogénesis de *miARN* se clasifica en vías canónicas y no canónicas.
La vía de biogénesis canónica es la vía dominante por la cual se procesan los *miARN* (Figura 1A). Los *miARN* canónicos en animales se transcriben a partir de genes que codifican para *miARN*, intrones y algunos pocos exones de genes que codifican proteínas, mediante la ARN polimerasa II. El primer producto es un *miARN* primario (pri-*miARN*) que tiene una estructura de horquilla cuyo tamaño puede variar desde cientos de nucleótidos hasta decenas de kilobases. Esta estructura se procesa en pre-*miARN* y después en un *miARN* maduro mediante el complejo microprocesador conformado por una proteína con actividad de RNAsa III denominada Drosha unida a dos copias de su compañero DGCR8 [3-5].
Como paso inicial, DGCR8 se encarga de reconocer al pri-*miARN*, mientras que Drosha escinde el dúplex de pri-*miARN* en la base de la estructura en horquilla, liberando un *miARN* precursor (pre-*miARN*) de ~55 a 70 nucleótidos [5].

Una vez que se generan los pre-*miARN*, se exportan desde el núcleo al citoplasma mediante un complejo de exportina 5 (XPO5) / RanGTP. En el citoplasma la endonucleasaRNAsa III Dicer realiza la eliminación del bucle terminal que da como resultado un dúplex de *miARN*/*miARN* de 22 nt que puede interactuar con un miembro de la familia de proteínas Argonautas (AGO).

Ambas cadenas del dúplex de *miARN* maduro se pueden cargar en la familia de AGO. La selección de la cadena 5p o 3p (la hebra 5p del extremo 5 'de la horquilla del pre-*miARN*, mientras que la hebra 3p se origina en el extremo 3') se basa en parte en la estabilidad termodinámica en los extremos 5' del dúplex de *miARN* o la identidad del nucleótido 5'. Generalmente, la hebra con extremos 5' termodinámicamente inestables o uracilo 5' se carga preferentemente en AGO y se considera la hebra guía [4,3].

La proporción de cadenas 5p o 3p cargadas con AGO varía según el tipo de célula o el entorno celular. La cadena cargada, llamada cadena guía, es retenida para formar el complejo final *miARN*-AGO, denominado complejo silenciador inducido por ARN (RISC). El complejo miRISC resultante es guiado a su ARNm blanco y se une a él a través de la complementariedad de secuencias entre las secuencias semilla y los sitios blanco de los ARNm [3, 4].

La cadena descartada *miARN** (también llamada hebra pasajera) es escindida por AGO2 y es degradada por la maquinaria celular [3,5].

Las vías de *miARN* no canónicas utilizan diferentes combinaciones de las proteínas involucradas en la vía canónica, principalmente Drosha, Dicer, exportina 5 y AGO2 y se dividen principalmente en independientes de Drosha y/o independiente de Dicer. Los pre-*miARN* producidos por la vía independiente de Drosha/DGCR8 se parecen a los sustratos de Dicer e implican generar una horquilla de pre-*miARN*. Ejemplos de este caso son los mirtrones, que son horquillas derivadas de los intrones que se generan durante su procesamiento a través de la acción del espliceisoma (maquinaria encargada de la remoción de intrones) (Figura1 B1) [3, 5, 6].

Otro ejemplo es el pre-*miARN* que contiene 7-metilguanina (m^7G) en su extremo 5´. La presencia de m^7G-cap en los pre-*miARN* genera que no se sometan a escisión por el microprocesador Drosha/DGCR8 y dependen de Dicer para compretar su maduración citoplásmica (Figura 1 B2) [7].

A diferencia de los mirtrones que se exportan a través de Exportina 5/RanGTP, los pre-mi m^7G se exportan a través de Exportina 1 (XPO1). Existe un fuerte sesgo de la hebra 3p como hebra guía durante el ensamblaje de RISC, debido a que la tapa m^7G impide la carga de la hebra 5p en AGO. Aunque en algunos casos Dicer puede hacer una escisión en la hebra 5p [3, 7, 8].

También se pueden generar *miARN* funcionales independientes de Drosha/DGCR8 a partir de ciertos ARN nucleolares pequeños y ARNt como en la fusión de ARNt-shRNA de MHV68 transcritas con ARN poll III que son procesadas en horquillas similares a pre-*miARN* con extremos 5´y 3´definidos como resultado de la escisión de RNAsaZ y la terminación de pol III, respectivamente (Figura1 B3) [6, 10].

En el caso de los *miARN* independientes de Dicer suelen ser a partir de transcripciones endógenas de ARN en horquilla corta (shRNA), en éstos el complejo de microprocesador Drosha/DGCR8 escinde inicialmente el ARN en horquilla pequeña (shRNA) y lo exporta al citoplasma a través de Exportin5/RanGTP, donde requieren de AGO2 para completar su maduración dentro porque no tienen una longitud suficiente para ser sustratos de Dicer. Un ejemplo de esta vía es la maduración de *miR-451* (Figura1 C1) [3, 6. 9].

Todas las vías conducen en última instancia a un complejo miRISC funcional. La unión del miRISC a la UTR 3´del ARNm blanco conduce al silenciamiento de genes mediante la represión de la traducción y la degradación del ARNm.

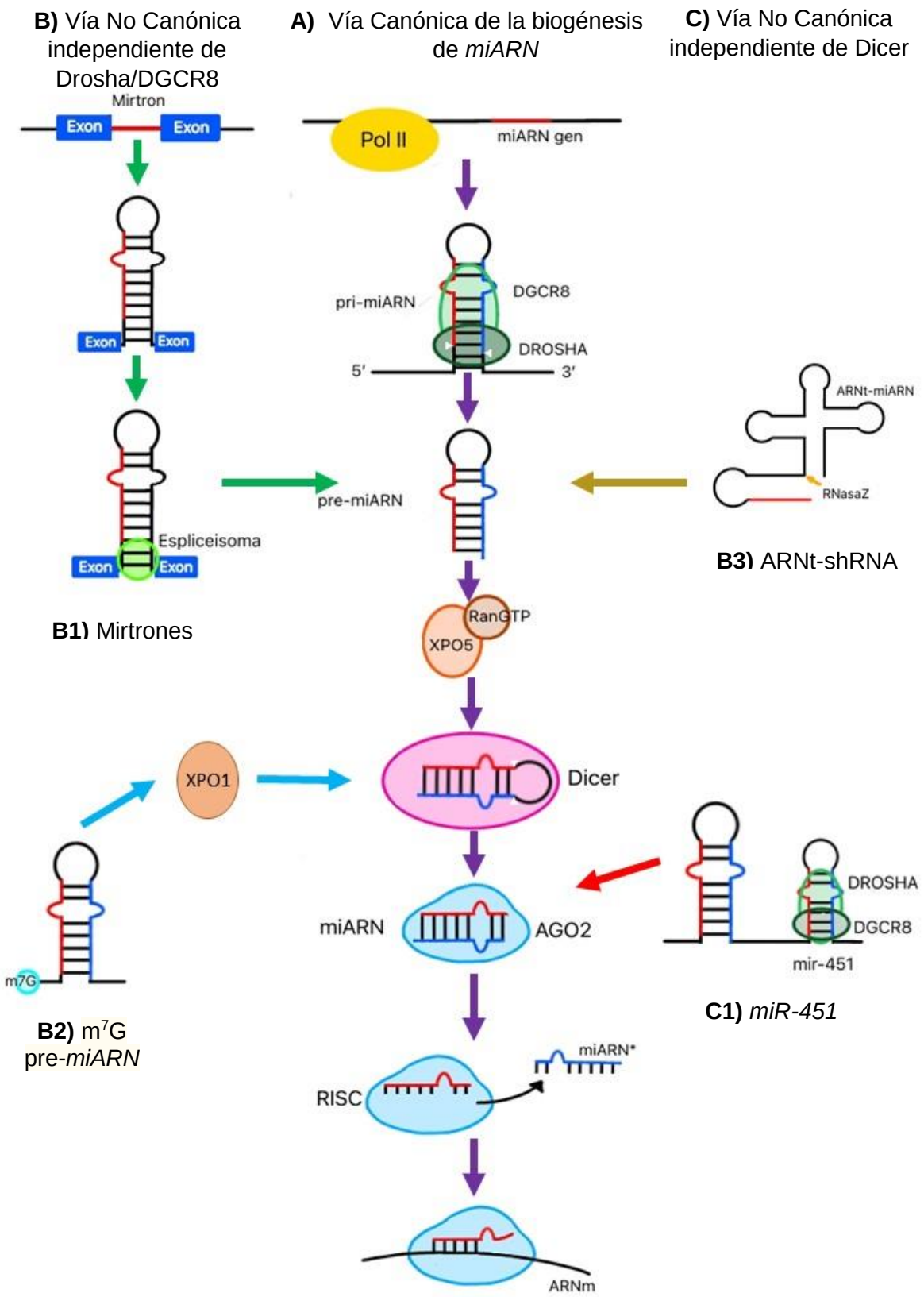


Figura 1. Biogénesis de *miARN*. Vía Canónica y Vías no canónicas [3-10].

Sitio de unión 3´UTR y semillas

En la mayoría de los casos, los *miARN* interactúan con la UTR 3 'de los ARNm blanco para suprimir la expresión, sin embargo, también existe la interacción en el extremo 5´UTR que es llamada región semilla y consta de 8 nucleótidos. El emparejamiento con la porción 5′ del *miARN*, particularmente los nucleótidos 2 a 8, parece ser más importante para el reconocimiento del objetivo por parte de los *miARN*. Además, los extremos 5' de los *miARN* relacionados tienden a estar mejor conservados que los extremos 3', aunque estos siguen siendo menos eficaces en cuanto al silenciamiento que los sitios de UTR 3' (Figura2) [13,14,17,19].

Estas secuencias semillas conservadas se clasifican en grupos llamados familias de *miARN*, debido a que esta secuencia compartida predice que estos grupos de *miARN* regularán ARNm blanco similares; sin embargo, los miembros individuales de la familia pueden tener blancos independientes, incluso cuando se coexpresan [16].

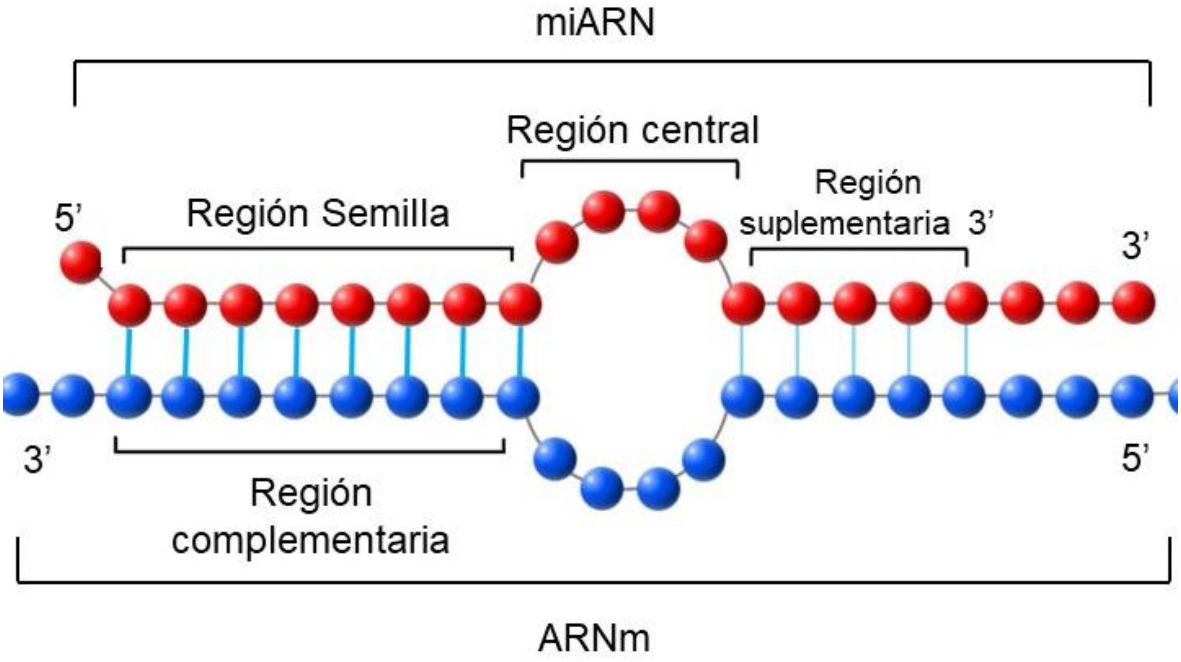


Figura 2. Interacción entre la región semilla del *miARN* con la región complementaria de su ARNm blanco. La región central muestra una unión imperfecta lo que conducirá a la inhibición de la traducción del ARNm.
Figura modificada de [19].

Unión *miARN*-ARNm

La escisión del ARNm o la represión de la traducción dependen de la unión complementaria del *miARN* al ARNm. La escisión no es el principal modo de acción de los *miARN* animales ya que requiere del apareamiento de bases casi perfecta del *miARN* con el ARNm blanco y estos se dan rara vez en animales. En la escisión, mayoritariamente en plantas, AGO tiene una función esencial por su actividad endonucleolítica que escinde el ARN blanco complementario en posición 10 y 11 utilizando la tétrada catalítica DEDH/D. Los *miARN* animales generalmente reprimen los ARN blanco por represión traduccional y degradación del ARNm. El modelo más aceptado es que la represión traduccional ocurre primero, seguida por la degradación del ARNm. Estos mecanismos no son mutuamente excluyentes, sino que pueden ocurrir simultáneamente o con diferentes cinéticas. El mecanismo predominante depende de la naturaleza de los ARNm blanco individuales, el tipo de célula, el momento del desarrollo y otros factores [19].

En la mayoría de los casos la unión imperfecta del *miARN* con el ARNm blanco induce la inhibición de la traducción (Figura2), al interferir con el reconocimiento de la proteína elF4F y el reclutamiento de la subunidad ribosomal pequeña 40S o al antagonizar la unión de la subunidad 60S y prevenir la formación del complejo ribosomal 80S [3, 6].

En el caso de la degradación del ARNm, el miRISC recluta proteínas de la familia GW182 y posteriormente a los complejos de deadenilasa CCR4-NOT y PAN2-PAN3 para facilitar la deadenilacion de la cola polo (a). después de la desadenilación, el extremo m7G-cap es removido por el complejo DCP1-DCP2, y al final el ARNm se degradará desde el extremo 5´mediente la exoribonucleasa 1 (XRN1) en dirección 5´ a 3´ [11,12].

Ya que el *miARN* puede unirse perfecta o imperfectamente, un *miARN* puede ejercer sus efectos al dirigirse a múltiples ARNm, algunos de los cuales pueden residir en la misma vía celular y a su vez un ARNm puede ser receptor de varios *miARN* permitiendo que la regulación sea tanto específica como a gran escala. Más allá de apuntar a genes individuales, los *miARN* regulan vías, generalmente pueden

tener diferentes conjuntos de blancos, pero al mismo tiempo regular la misma vía. En un estudio donde se calcularon las puntuaciones de similitud para 3,25 millones de pares de 2550 *miARN* humanos utilizando varias bases de datos, se encontró que *miR*-6886-5p y *miR*-3529-5p, que tienen diferentes secuencias semilla y *miARN* y se dirigen a diferentes conjuntos de genes, pero ambos controlan a la cascada de señalización MAPK. Además, un mismo *miARN* puede participar en vías distintas, teniendo diferentes efectos en la supervivencia celular, crecimiento y proliferación que dependen del tipo de célula y patrón de expresión génica, por lo que el potencial para la regulación de la expresión génica mediada por *miARN* es enorme ya que se predice que ~60% de los ARNm están bajo el control de *miARN* [15, 17, 18, 13, 21].

Los microARN y el cáncer

El cáncer es un defecto genético complejo que engloba anomalías estructurales y de expresión de genes en las células las cuales desarrollan crecimiento anormal y/o pérdida de la función de apoptosis, que resulta en la formación de tumores [20, 22, 23].

Existen factores reguladores que activan o desactivan genes que dirigen la proliferación y diferenciación celular. El daño a estos genes, denominados genes supresores de tumores y oncogenes, generalmente llevan al cáncer [20].

Se sabe que los *miARN* tienen un papel importante en la regulación de varios procesos biológicos como son el desarrollo, la diferenciación, la proliferación y la apoptosis por lo que su expresión desregulada es un mecanismo importante que apoya al desarrollo y progresión del cáncer. Dicha desregulación podría ser causada por múltiples mecanismos, incluida la amplificación o eliminación de genes de *miARN*, control transcripcional anormal de los *miARN*, cambios epigenéticos desregulados y defectos en la maquinaria de biogénesis de los *miARN*. Además, se ha demostrado que esta desregulación afecta varias de las características distintivas del cáncer, incluyendo el mantenimiento de la señalización proliferativa, evadir supresores de crecimiento, resistir la muerte celular, activar la invasión y metástasis e inducir la angiogénesis [22, 23, 25, 26].

Adicionalmente, los *miARN* extracelulares pueden regular la función de otras células en el nicho tumoral, ya que afectarían las comunicaciones intercelulares para crear un microambiente adecuado para que las células cancerosas crezcan y escapen de la respuesta inmune [23].

Algunos *miARN* contribuyen directamente en la oncogénesis en diversos tejidos ya que funcionan como supresores de tumores u oncogenes, además, se han considerado marcadores de susceptibilidad genética al cáncer [20, 22, 23].

Los *miARN* que están sobre-expresados en los tumores se les consideran oncogenes, éstos se encuentran en exceso de forma significativa en diferentes tipos de cáncer y son llamados “oncomiRs”. Los oncomiRs promueven el desarrollo de tumores inhibiendo negativamente los genes supresores de tumores y/o los genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis [22].

Por otro lado, la expresión de algunos *miARN* está disminuida en las células cancerosas. Estos tipos de *miARN* se consideran genes supresores de tumores. Los *miARN* supresores de tumores generalmente previenen el desarrollo de tumores al inhibir negativamente los oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis [22].

A pesar de ésta clasificación un *miARN* particular puede haber exhibido una función oncogénica en algunos tipos de cánceres, mientras que el mismo *miARN* actúa como un supresor tumoral en otros cánceres. Un buen ejemplo sería *miR*-29 que fue reportado como un oncogén en cáncer de mama mientras que actuó como un gen supresor de tumores en tumores de pulmón. Esto probablemente se deba a la capacidad de que un mismo *miARN* puede participar en varias vías teniendo diferentes efectos dependiendo del tipo de célula y patrón de expresión génica. Por lo que asociar un *miARN* particular y un tipo específico de cáncer es complicado por la diversidad genética de los tumores y en las líneas celulares derivadas de diferentes tumores [21, 23].

Mecanismos de expresión anormal de *miARN* en neoplasias

- Amplificación o eliminación de genes de *miARN*

Un número considerable de genes de *miARN* se encuentran en regiones genómicas asociadas con el cáncer, estos son llamados sitios frágiles que se eliminan, amplifican o translocan durante la enfermedad [25, 28].

Estas variaciones de los loci genómicos de *miARN* provocan alteración en el número de copias de *miARN,* ya sea sobre-expresándolos, expresándolos escasamente o eliminándolos por completo [26, 27].

En la Leucemia Linfocítica Crónica de células B (LLC-B), la deleción de 13q14 está presente en más de la mitad de los casos de la enfermedad, donde se encontró que dentro de la parte eliminada se encuentran los genes *mir-15a y mir-16a* que codifican para *miR-15a y miR-16a*, los cuales regulan al ARNm del gen antiapoptótico linfoma de células B 2 (BCL2), que es clave en muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo leucemias, linfomas y carcinomas. Un análisis de la deleción indicó que estos dos genes de *miARN* se encuentran dentro de la región que se pierden en pacientes con LCC, y el análisis de expresión indicó que *miR-15a y miR-16a* estaban ausentes o regulados a la baja en la mayoría de los pacientes con LCC (Figura3) [22, 24].

En varios tipos de linfoma incluyendo linfomas difusos de células B grandes (DLBCLs), linfomas de células del manto, linfomas de Burkitt y varios tipos de tumores se ha encontrado una amplificación de 13q31, específicamente el gen *c13orf25*. Una consecuencia de esta amplificación es el aumento en la abundancia del grupo de *mir-17-92*, una serie de seis *miARN*: *miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92a*, que promueven la proliferación, inhiben la diferenciación, aumentan la angiogénesis, además de trabajar junto a *c-myc* para promover el desarrollo agresivo del cáncer (Figura 3) [22, 37, 38].

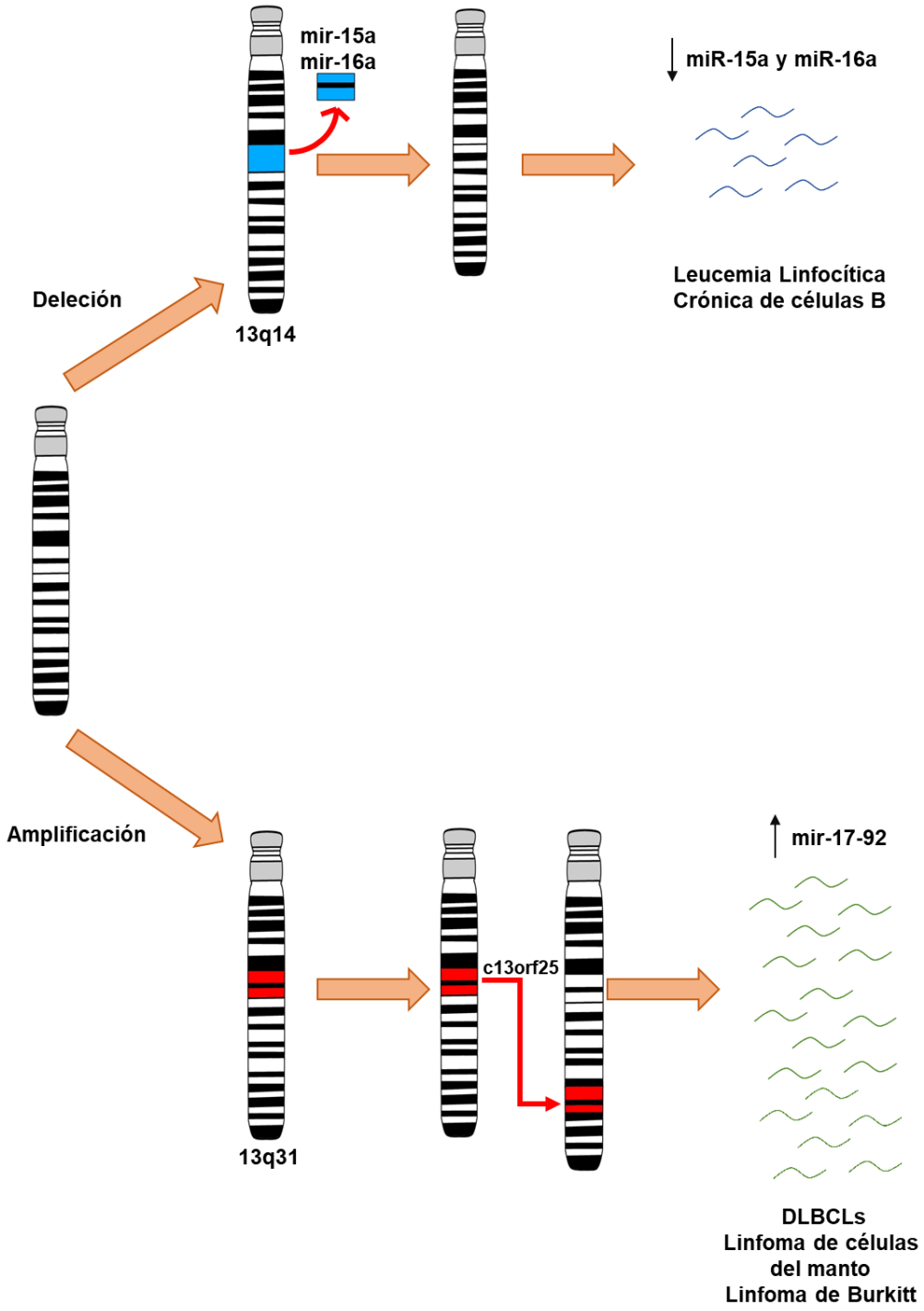


Figura 3. La deleción de 13q14 presenta la perdida de los genes *mir-15a* y *mir-16a* que codifican para *miR-15a y miR-16a* encargados de regular al ARNm del gen antiapoptótico BCL2, clave en muchos tipos de cánceres humanos, incluyendo leucemias, linfomas y carcinomas. La amplificación de 13q31 provoca diferentes tipos de linfoma como el DLBCL o el linfoma de Burkitt; al amplificar el gen *c13orf25* aumenta la abundancia de *miR-17-91*, un grupo de miR que promueven la proliferación, inhiben la diferenciación y aumentan las angiogénesis. [22, 24,37,38]

- Regulación de la transcripción de *miARN*.

Se ha mostrado en varios estudios que los cambios en los activadores o supresores de proteínas transcripcionales conducen a una transcripción anormal de *miARN* en cánceres humanos. Esta expresión anormal puede deberse a la desregulación de algunos factores de transcripción que están estrechamente regulados, como p53 y cMyc [23, 25].

p53 es una proteína supresora de tumores codificada por el gen *TP53*, que está regulada positivamente como respuesta al daño al ADN y al estrés oncogénico. Forma una red compleja para regular la progresión del ciclo celular y la apoptosis. También regula la expresión de muchos genes, incluidos los genes de *miARN* como la familia de *miR-34* que incluye *miR-34a/b/c*. Esta familia de *miARN* reprime genes promotores del crecimiento y se coordinan con otros miembros de la red supresora de tumores p53 para inhibir la proliferación celular descontrolada y promover la apoptosis. Las mutaciones en la vía p53 están presentes en casi todos los cánceres [23, 25, 27, 28, 29].

Otros miR regulados por p53 son *miR-145* (promueve la apoptosis*), miR-605 (*regula la expresión de Mdm2, regulador negativo de p53), *miR-1246 (*induce la apoptosis*)* y *miR-107* (media la regulación de la señalización hipóxica por p53 y la angiogénesis tumoral) [23, 25, 106, 107, 108].

c-Myc es codificado por el protooncogén *c-myc* y regula una variedad de genes que pueden o no codificar proteínas, entre estos se encuentra una variedad de *miARN*. Cuando c-myc se vuelve oncogénico y se sobreexpresa activa la transcripción del grupo oncogénico *miR-17–92* (también conocido como *oncomiR-1*). *miR*-17-92 es un grupo de *miARN* policistrónicos localizado en el cromosoma 13 humano y codifica seis *miARN* individuales: *miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 y miR-92a*. Éste promueve la progresión del cáncer al controlar la expresión de E2F1, trombospondina 1 (THBS1), factor de crecimiento del tejido conectivo (CTGF) y otros ARNm blanco para regular la progresión del ciclo celular y la angiogénesis [23, 27, 28, 30].

c-Myc también reprime la transcripción de algunos *miARN* supresores de tumores como las familias *mir-15a, mir-26, mir-29, mir-30 y let-7* [23, 27].

En el carcinoma hepatocelular, c-Myc se une a *miR-148a-5p* o *miR-363-3p* y reprime su expresión produciendo tumorigénesis hepatocelular. Estos *miARN* comprenden un ciclo de retroalimentación negativa que coopera para inhibir la traducción de c-Myc y promover la degradación de la proteína Myc preexistente (Figura 4A). *miR-148a-5p* se dirige directamente a c-Myc y lo inhibe, mientras que *miR-363-3p* funciona de forma más indirecta al desestabilizar a Myc (Figura 4B) [23, 25, 31].

Los receptores nucleares (NR) son factores de transcripción activados por ligando que regulan la expresión génica, su expresión depende del tipo celular y del tejido y la desregulación de su expresión está involucrada en varias enfermedades. Algunos estudios demuestran que los NR que pueden cambiar indirectamente la abundancia de *miARN* a través de vías de señalización además de regular su actividad transcripcional directamente en el cáncer.

En un gran porcentaje de los tumores de cáncer de mama está expresado el receptor de estrógeno α (ERα) asociado a un mejor pronóstico debido a la respuesta al tratamiento hormonal. Se ha encontrado que *miR-206* actúa sobre ERα reduciendo su expresión e inhibe la proliferación de células ERα-positivas. La sobreexpresión de *miR*-221-222 en células ER- positivas promueve la transición de tumores ER-positivos a ER-negativos, aumenta la proliferación, la actividad migratoria, además de suprimir varios genes con función de supresión tumoral y metástasis [27, 39, 40].

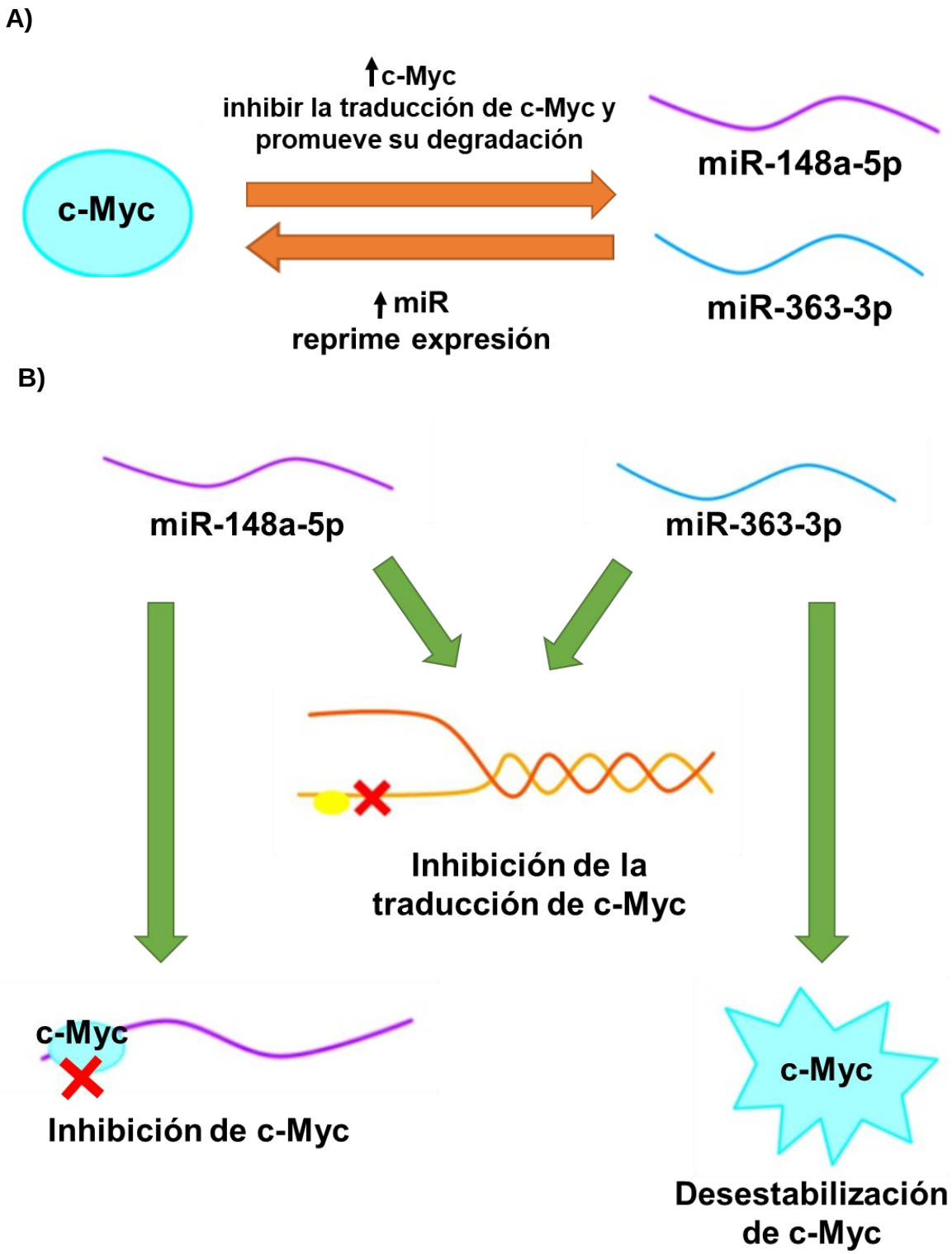


Figura 4. A) *miR-148a-5p* y *miR-363-3p* y c-Myc comprenden un ciclo de retroalimentación negativa. Estos *miARN* inhiben la traducción de c-Myc y promueven su degradación, así como c-Myc reprime la expresión de *miR-148a-5p* y *miR-363-3p*. B) *miR-148a-5p* se dirige directamente a c-Myc y lo inhibe, mientras que *miR-363-3p* funciona de forma más indirecta al desestabilizar a c-Myc [23, 25, 31].

.

- Control epigenético de *miARN*

La epigenética es el estudio de los cambios en la expresión genética, que son hereditarios y que no se atribuyen a alteraciones de la secuencia de ADN. Las marcas epigenéticas, cambian la forma como se expresan los genes. Las modificaciones epigenéticas más frecuentes son la metilación del ADN y la modificación de las colas de histonas (acetilación y metilación de histonas).

Una característica eminente del cáncer es la alteración epigenética y se cree que los *miARN* también son susceptibles a la modulación epigenética por lo que la alteración de los mecanismos epigenéticos da como resultado una expresión aberrante de *miARN* en células cancerosas [25, 23].

Metilación del ADN

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que ocurre en todas las células de vertebrados e implica la transferencia de un grupo metilo a la posición C5 de la citosina para formar 5-metilcitosina. Regula la expresión génica mediante el reclutamiento de proteínas de represión génica o por la inhibición de la unión de factores de transcripción al ADN. Las células diferenciadas desarrollan un patrón de metilación del ADN estable y único que regula la transcripción génica específica de los tejidos [32].

Las islas CpG son tramos de ADN de aproximadamente 1000 pb que tienen una mayor densidad de CpG en las que a menudo se encuentran los promotores de genes. Las islas CpG, especialmente las asociadas a los promotores génicos, rara vez están metiladas por lo que la metilación de genes promotores humanos CpG suele inhibirse [32].

Hay evidencia que sugiere que la modificación de la metilación del ADN afecta la expresión de *miARN* en el cáncer, afectando la transcripción de pri-*miARN*, particularmente por la metilación de la isla CpG asociada al promotor [27].

En un estudio, el cáncer de vejiga humano mostró que 17 de 313 *miARN* humanos están regulados positivamente más de tres veces en células de cáncer de vejiga

T24 después del tratamiento simultáneo con inhibidores de la metilación del ADN y de la acetilación de histonas. Entre estos *miR-127*, que se localiza en una isla CpG y que carece de expresión en células cancerosas, tuvo una expresión significativamente elevada después del tratamiento, además de la regulación negativa del proto-oncogén BCL6 [33].

En otro caso *miR-22* funciona como un modificador epigenético y suprime la expresión de *miR-200,* que es un supresor de tumores y regula negativamente diferentes tipos de cáncer, a través de la orientación directa de enzimas de remodelación de la cromatina que conducen a la hipermetilación del promotor *mir-200* lo que lleva al pluripotencialidad y metástasis en el cáncer de mama [34].

Modificación de histonas

En los eucariotas, el ADN está asociado con proteínas histonas que ayudan a empaquetar las largas cadenas de ADN en el pequeño compartimento nuclear. Estas proteínas suelen tener modificaciones químicas que incluyen metilación, acetilación, ubiquitinación y fosforilación en sus colas N-terminales, y ayudan a regular la replicación del ADN, la expresión genética y la reparación del daño del ADN. Las modificaciones que aflojan la asociación del ADN con las histonas brindan un entorno permisivo para la transcripción, mientras que las modificaciones que empaquetan firmemente el ADN y las histonas reprimen la expresión génica [32].

En la LLC hay una reducción de *miR-15a* y *miR-16a* debido a la deleción de 13q14, sin embargo, un porcentaje de casos con LLC expresan niveles bajos de estos *miARN* a pesar de la falta de deleciones observables en 13q. Estos hallazgos sugieren la existencia de mecanismos reguladores adicionales para mediar el silenciamiento de *miR-15a* y *miR-16* en la LLC.

Estas células de LLC se caracterizaron por niveles bajos de la modificación de la cromatina H3K4me2, que activa la transcripción, en los promotores de los genes *miR-15a* y *miR-16* por lo que expresaron niveles bajos de este grupo de microARN. Las HDAC (histonas desacetilasas) son enzimas moduladoras de la cromatina que catalizan la eliminación de grupos acetilo. Se encontró que su sobreexpresión

promueve la compactación de la cromatina impidiendo el acceso a los factores de transcripción y conduce al silenciamiento epigenético de genes, por lo que promueve el silenciamiento de *miR*-15a y *miR*-16 [35].

- Función anormal de genes en la biogénesis de *miARN*

La biogénesis de los *miARN* está controlada por varias enzimas y proteínas reguladoras que permiten la maduración correcta de los *miARN*, por lo que los defectos en el sistema de biosíntesis podrían conducir a una expresión anormal de los *miARN* y mejorar la oncogénesis [25, 23].

Las mutaciones en DICER y Drosha, la desregulación del microprocesador o de las proteínas asociadas al microprocesador implicadas en el procesamiento del pri-*miARN* contribuyen a las alteraciones de la expresión de *miARN* en el cáncer [27-28].

DICER y Drosha presentan mutaciones en los tumores de Wilms, el cáncer del tracto genitourinario infantil más común, las mutaciones E1147K y D1151Y de Drosha, y E1705 y D1709 de DICER alteran un residuo de unión a metal del dominio de la ARNAsa IIIA y ARNAsa IIIB respectivamente, y afecta la actividad de procesamiento. Estas mutaciones no cambian la expresión de las proteínas, sino que causan defectos en la función del dominio ARNAsa (Figura 5) [42].

Los tumores con mutaciones de DICER y Drosha pueden producir algunos *miARN* maduros competentes además de presentar una producción defectuosa de *miARN* específicos. Algunos de estos *miARN* fueron miembros de la familia de let-7 y algunos otros *miARN* que presentan actividad en la proliferación y diferenciación celular y han sido implicados como supresores de tumores en cánceres humanos. [28, 41-42].

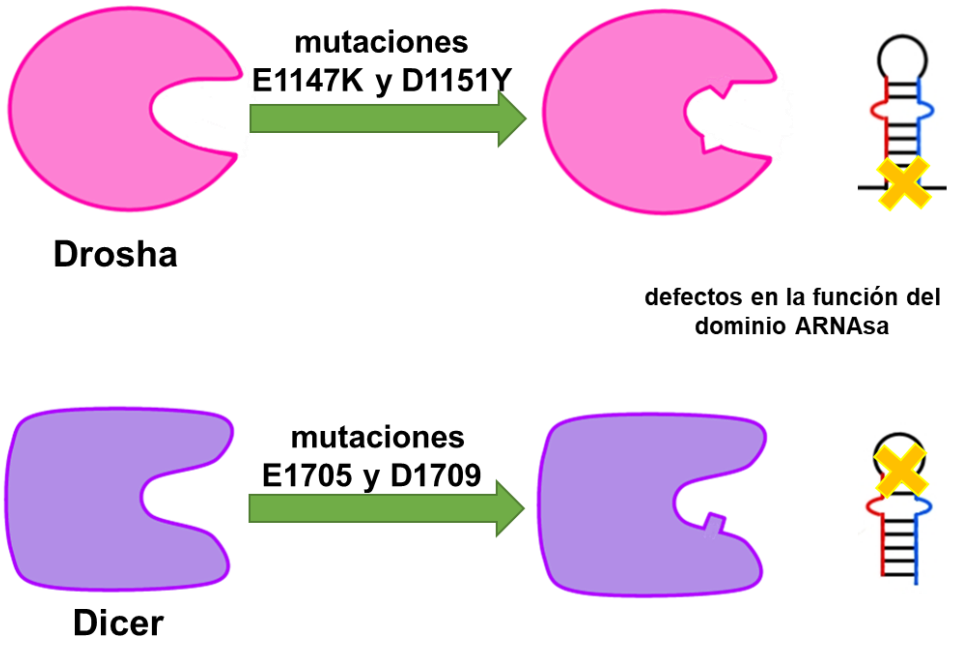


Figura 5. Las mutaciones E1147K y D1151Y de Drosha, y E1705 y D1709 de DICER alteran un residuo de unión a metal del dominio de la ARNAsa IIIA y ARNAsa IIIB respectivamente, afectando la actividad de procesamiento, causando defectos en la función del dominio ARNasa pero no cambiando la expresión de las proteínas. Se pueden producir algunos *miARN* maduros competentes además de una producción defectuosa de *miARN* específicos. [41-42]

La sobreexpresión de Drosha puede alterar el perfil de expresión global de *miARN* y promover la proliferación, migración e invasión celular que contribuye a la progresión del cáncer, como en el caso de los carcinomas de células escamosas cervicales avanzados donde en el 50% de los casos Drosha se encuentra sobre-expresado. También se ha relacionado la baja expresión con otro tipo de cánceres y provocando metástasis e invasión. En el carcinoma renal de células claras (ccRCC), que es el cáncer renal más común en adultos, además de ser muy agresivo y metastásico, se encontró que tanto Drosha y DGCR8 estaban regulados a la baja significativamente. Por lo que diferentes tipos cáncer tienen diferentes mecanismos genéticos o epigenéticos que controlan la expresión de Drosha que resulta en la expresión anormal de *miARN* oncogénicos o supresores de tumores en un tipo de cáncer determinado [27,28, 36, 37].

La biogénesis de *miARN* requiere además de sus enzimas de procesamiento centrales varios factores reguladores, como lo son las proteínas asociadas al microprocesador, que a menudo están desreguladas en las células cancerosas. Algunos de estos incluyen p68 (DDX5), p72/p82 (DDX17), pertenecen a la familia de proteínas DEAD box, son reclutados al complejo microprocesador Drosha y a través de la interacción física promueven el procesamiento de pri- a pre-*miARN* [28, 41,43].

El supresor tumoral p53 es un factor de transcripción que interactúa con el complejo Drosha a través de moléculas de ARN y p68, y forman un complejo regulador que induce la expresión de un grupo de *miARN* supresores (*miR*-15/16, *miR*-143, *miR*-145, *miR*-203 y otros). Además, que su expresión induce un aumento en la asociación de p68 al complejo microprocesador que a su vez aumenta la actividad de Drosha (Figura 6A) [28, 41, 43].

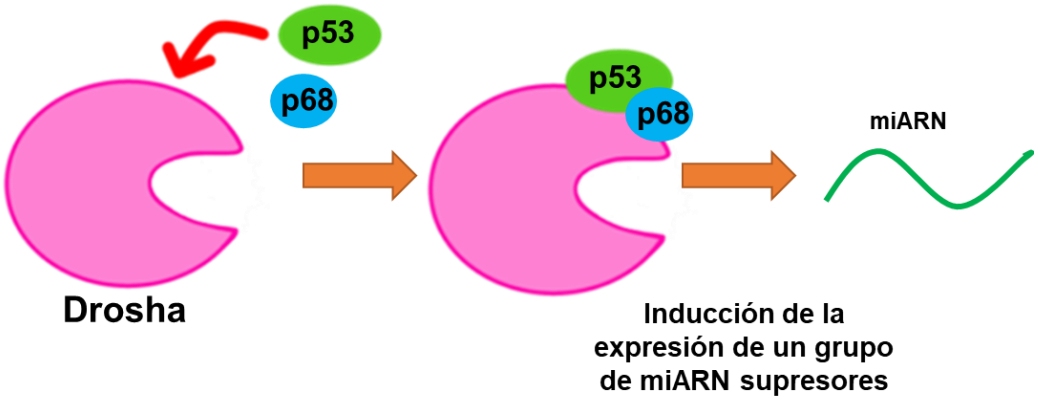
El p53 está mutado en varios cánceres humanos. El mutante p53 (mutp53) pierde sus funciones supresoras de tumores, además de adquirir ganancia de funciones oncogénicas. Existen evidencias que suprime la actividad de procesamiento de *miARN* de Drosha secuestrando p68 y uniéndose directamente a p72/82.
Tal es el caso del carcinoma endometrial (CE) donde mutp53 interfiere con las asociaciones entre el complejo Drosha y p68, que conduce a la disminución de *miR-26a* que puede inhibir la metástasis y la progresión tumoral (Figura6B) [43, 44].

Exportin-5 (XPO5) es la encargada de exportar el pre-*miARN* al citoplasma de manera dependiente de RanGTP por lo que las alteraciones estructurales en este transportador pueden afectar la expresión global del *miARN*, aumentando el riesgo de desarrollar cáncer [45].

Se han identificado algunas mutaciones en XPO5, estas impiden la exportación de pre-*miARN* provocando su acumulación en el núcleo, obstruyendo la biogénesis e impidiendo la maduración de los *miARN* en algunos tipos de cáncer. Además, se han encontrado alteraciones en el patrón de metilación de la región promotora de XPO5 que provocaron una expresión aberrante de XPO5 impactando en la tasa proliferativa de una célula en el cáncer de mama [28, 45, 46].

Por lo que la variación genética y epigenética conducen a la desregulación de XPO5 contribuyendo a defectos en el procesamiento de *miARN* y la tumorigénesis [45, 46].

A)



B)

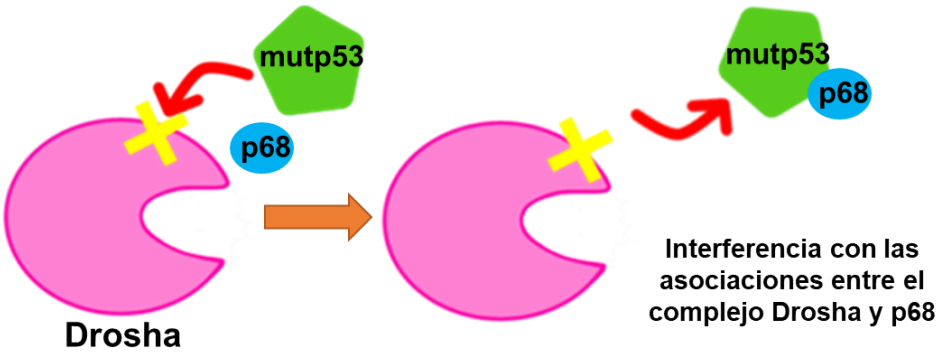


Figura 6. A) El supresor tumoral p53 interactúa con el complejo Drosha a través de moléculas de ARN y p68 formando un complejo regulador que induce la expresión de un grupo de *miARN* supresores. B) El mutante p53 (mutp53) secuestra e interfiere con la asociación entre el complejo Drosha y p68 suprimiendo la actividad de procesamiento de *miARN* de Drosha. Además de perder sus funciones supresoras de tumores y adquirir ganancia de funciones oncogénicas. [41, 43, 44]

microARN circulantes

Los microARN circulantes son microARN que migraron fuera de las células hacia los fluidos corporales. La mayoría salen formando complejos con proteínas, como AGO2, NPM 1 o con lipoproteínas de alta densidad (HDL). Una parte lo hace secretándose a través de exosomas, microvesículas y otra debido a la fuga pasiva durante la apoptosis, la necrosis o el entorno de la inflamación. A pesar de que se ha demostrado que los microARN son bastante estables y no se destruyen en condiciones desfavorables, la formación de complejos o empaquetamiento en exosomas es necesario para protegerlos de la digestión de las ARNasas en los fluidos corporales [49, 50].

Se han identificado a varios *miARN* en fluidos corporales y otros entornos extracelulares, incluidos plasma, suero, orina, saliva, semen, derrames pleurales amnióticos y líquido cefalorraquídeo [51].

Existe evidencia de que los *miARN* extracelulares pueden desempeñar funciones de comunicación celular, y que al igual que los *miARN* intercelulares, participan en la regulación de algunos procesos biológicos en las células receptoras, e incluso podrían servir como ligando para activar o suprimir el sistema inmunológico. Su desregulación se asocia al origen, progresión y respuesta terapéutica de varias enfermedades, sobre todo los *miARN* exosomales que están involucrados en varios procesos fisiológicos y patológicos como la inflamación, respuesta inmune y progresión del cáncer [49, 50, 60].

Los exosomas son vesículas extracelulares (Evs) que varían de 40 a 100 nm de diámetro y desempeñan un papel esencial en el transporte y la estabilidad de los *miARN* en fluidos biológicos. Los exosomas son estructuras encerradas en bicapa lipídica secretadas activamente por las células en el entorno extracelular y pueden empaquetar varias moléculas, como proteínas, lípidos, metabolitos y material genético (ARN mensajeros y ARNnc), para protegerlos de la degradación enzimática y facilitar su transporte a las células receptoras. Además, los exosomas son conservados y específicos del tipo de célula, dependiendo de la molécula y la célula de la que se desprenden [51, 60].

Aunque todavía no son totalmente claros los mecanismos que están involucrados con la incorporación de *miARN* a los exosomas, se ha identificado que la región 3´de los *miARN* puede ser crítica ya que se ha visto que la secuencia de *miARN 3´* con más poli (U) que poli (A) en ese extremo se clasifican preferentemente en los exosomas [58].

Se ha visto que los *miARN* exosomales pueden ingresar a las células vecinas a través de endocitosis o fagocitosis, la fusión de membranas o la identificación e integración de receptores en la superficie celular y pueden afectar objetivos de ARNm de forma remota desde su origen por lo que no solo afectan a las células circundantes, también a los tejidos distantes [47, 50].

Las células tumorales cancerosas a menudo liberan gran número de microvesículas y exosomas que contienen las firmas de *miARN* específicas que reflejan el perfil de *miARN* desregulado en las células cancerosas. Estas vesículas extracelulares pueden alcanzar áreas remotas y afectar a las células receptoras que las internalizan e incluso afectar al microambiente tumoral, pueden unirse como ligandos a los receptores tipo Toll en las células inmunes circundantes. Con todo esto facilitan y promueven la formación de un nicho metastásico en órganos distantes [48, 49, 52].

Los exosomas desempeñan un papel importante en la promoción del crecimiento tumoral y la metástasis ya que dependen en gran medida del microambiente y la señalización extracelular entre el cáncer y las células del estroma [52].

Inclusive se han detectado en sangre de pacientes con cáncer algunos *miARN* circulante relacionados con la metástasis (*miR*-373 en cáncer de mama) pero aún no se ha encontrado su rol en la circulación [52, 57].

Biomarcadores de *miARN*

Algunos de los métodos actuales de diagnóstico del cáncer suelen ser muy invasivos y de baja sensibilidad lo que no permite encontrar los tumores en una etapa temprana retrasando el tratamiento. Además, los biomarcadores proteicos más nuevos y mejorados, que son los más comunes, han resultado ser costosos, requieren invertir mucho tiempo debido a la baja cantidad de proteínas clínicamente significativas, sus estructuras son complejas y no cuentan con métodos de detección precisos. Los *miARN* circulantes tienen muchas características que los hacen buenos candidatos a biomarcadores del diagnóstico, pronostico y respuesta a la terapia al cáncer [53, 59].

Según el Instituto Nacional del Cáncer estadounidense un biomarcador es “una molécula biológica que se encuentra en la sangre, otros fluidos o tejidos del cuerpo, y cuya presencia es un signo de un proceso normal o anormal, de una afección o de una enfermedad que a veces se utiliza para determinar la respuesta del cuerpo a un tratamiento para una enfermedad o afección”. Además de esto, los biomarcadores deben cumplir algunos otros criterios como ser sensibles a los métodos de detección, ser estables, específicos, económicos y de fácil obtención mediante métodos no invasivos [53, 54, 55].

Esencialmente los *miARN* circulantes cumplen con estos criterios y se consideran biomarcadores prometedores para varias enfermedades humanas, ya que tienen fácil accesibilidad al poder determinarse en diferentes biofluidos con métodos mínimamente invasivos con bajo riesgo de complicaciones asociadas, cuentan con una alta estabilidad y especificidad para el tipo de tejido o célula de procedencia, inclusive se puede medir la variación de sus niveles de acuerdo con la progresión y cambio de la enfermedad en tiempo real y su respuesta a la terapia, además de ser cuantificables mediante métodos ya establecidos en la clínica como PCR cuantitativo (qPCR) [50, 53, 59, 60].

Desde el 2008, cuando se utilizaron para el examen de linfoma difuso de células B grandes en el suero de pacientes se ha considerado a los *miARN* como buenos

candidatos a biomarcadores y desde entonces se han identificado varios *miARN* circulantes desregulados en el plasma y suero de pacientes con cáncer [50, 59].

Se ha encontrado que los *miARN* circulantes de plasma y suero podrían usarse para discriminar a pacientes de cáncer de individuos sanos en diferentes tipos de cánceres como el de mama, colorectal, gástrico, pulmón y hepatocelular. Además, han mostrado concentraciones diferentes entre subtipos de cáncer y grados de diferenciación de cáncer de mama lo que contribuiría a un diagnóstico temprano [49, 57, 62, 63].

Además del plasma y suero se ha utilizado otros fluidos para la detección de *miARN* circulantes, como la orina en cánceres urológicos, saliva en cánceres orales y líquido cefalorraquídeo para cánceres cerebrales [51, 52].

Uno de los mejores candidatos para convertirse en biomarcador es *miR-21* circulante. Este oncomir, se ha demostrado que promueve el crecimiento, invasión y migración tumoral en distintos tipos de cáncer, fue encontrado en pacientes con metástasis en diferentes tumores, como en el cáncer de mama donde permitió distinguir los pacientes de cáncer metástasicos de aquellos con enfermedad localizada. Aunque se relacionan los niveles altos de *miR*-21 con un estado clínico avanzado, metástasis y mal pronóstico, no se han podido validar, posiblemente debido a las diferencias en las cohortes de pacientes o en los métodos de preparación o análisis [52, 57, 62].

La expresión desregulada de los *miARN* en el cáncer les otorga un perfil de expresión particular que beneficiaría a la detección temprana, además que los *miARN* asociados al padecimiento presentan una alta expresion. Estos perfiles particulares otorgan la ventaja de un modelo con multimarcadores, que mejora la precisión en el diagnóstico, la guía del tratamiento y la evaluación de la respuesta al tratamiento, además, el uso de paneles que incluyen una variedad de *miARN* proporciona un enfoque más rentable. Estos paneles pueden ser más efectivos que el uso de *miARN* único, pero ambos tienen una importancia destacada para los pacientes con cáncer [47, 60, 61].

También se ha visto que pueden ser marcadores de pronóstico debido a los cambios de nivel de *miARN* circulantes durante la quimioterapia y la recurrencia de la enfermedad. Darían una predicción de la sensibilidad a los medicamentos y a la quimioterapia por adelantado y reducir una innecesaria toxicidad, siendo una valiosa ayuda en la selección de estrategias de tratamiento, el pronóstico del cáncer y el seguimiento [50, 59].

A pesar de que los *miARN* son candidatos prometedores como biomarcadores hay varias razones para que todavía no sean aplicables clínicamente. Existen varios pasos clave para que un nuevo biomarcador entre en la práctica como la verificación, la validación y la aplicación clínica. Además, existen varios desafíos en el análisis como cantidades limitadas del analito, contaminación celular, riesgo de inhibición, estandarización inadecuada de métodos y análisis de datos, normalización e interpretación [53, 54, 59].

Aunque los *miARN* se han verificado con diferentes poblaciones y condiciones patológicas por el momento, los hallazgos en general carecen de reproducibilidad ya que existen discordancias entre diferentes equipos analizando los mismos tumores. Lo anterior puede deberse a la falta de estandarización de los diferentes procedimientos por lo que se deben desarrollar protocolos estandarizados desde las primeras etapas del proceso, como la recolección, transporte y almacenamiento de muestras, hasta el análisis de datos debido a la diversidad de métodos tecnológicos utilizados. Además de otros factores como la raza, la edad, el sexo y el tipo de muestra [50, 59].

No solo la población y la metodología son el problema que deben abarcar, algunos de los *miARN* identificados carecen de especificidad. Un buen número de *miARN* circulantes no son específicos de un tipo de cáncer, pero se identifican como biomarcadores de otros. Recordemos que el mismo *miARN* puede actuar como oncogén o gen supresor, dependiendo de los diferentes tipos de cáncer por lo que es importante descubrir los *miARN* expresados anormalmente correspondientes en cada tipo de cáncer [47, 50, 54].

Y aunque existen algunos *miARN* que se sobreponen para un cáncer determinado, encontrar una firma única podría ser difícil, por lo que usar un panel de *miARN* circulantes podría ser más factible. Tambien sería necesario realizar estudios sobre la base de estos paneles con poblaciones de muestras de pacientes bien categorizadas y diversas [50].

La inconsistencia de los niveles de *miARN* entre el plasma y el tejido es otro factor importante. Es muy probable que la cantidad de los *miARN* regulados positivamente en el tumor primario aumente en la circulación, debido al escape de las células cancerosas. Sin embargo, debe ser una cantidad significativa para detectar este aumento, si no sería difícil su detección. Además, los *miARN* regulados negativamente por el tumor no se pueden detectar directamente en circulación, el tumor tiene que afectar negativamente la expresión de *miARN* en otras células para que se regule a la baja en la circulación y pueda detectarse en un análisis [54].

Inclusive, otros varios parámetros, como los medicamentos, no necesariamente del tratamiento contra el padecimiento a tratar podrían afectan a los *miARN* circulantes [61].

Además, deben someterse a rigurosas pruebas de ensayos clínicos y obtener la aprobación de las autoridades regulatorias antes de su implementación clínica como biomarcadores y este proceso puede llevar mucho tiempo y ser costoso, por lo que no hay garantía de aprobación [60].

Los microARN como terapia contra el cáncer

Se ha demostrado que los *miARN* tienen gran participación en la carcinogénesis y la metástasis; además de su posible uso como biomarcadores, actualmente se investiga su potencial en el tratamiento contra el cáncer y otros padecimientos.

Existen estudios preclínicos e *in vitro* donde se han podido inhibir oncomiRs o reintroducir los *miARN* supresores de tumores en células cancerosas, ésto demuestra que los *miARN* podrían usarse como fármacos o blancos terapéuticos y que las terapias basadas en estos podrían ser efectivas para inhibir la migración y proliferación celular o mejorar la muerte celular. Además de poseer la capacidad de apuntar a múltiples vías y genes y disminuir considerablemente el riesgo de resistencia a la terapia al atacar genes críticos [23].

El objetivo de las terapias basadas en *miARN* es restaurar la función normal de las vías celulares desreguladas. Para esto existen dos tipos de terapias basadas en *miARN*: 1) inhibidores de *miARN* (también conocidos como antimiR) que inhiben la actividad de microARN oncogénicos y 2) imitadores de *miARN* que buscan restaurar la función de microARN supresores de tumores. Los antimiR son pequeñas moléculas sintéticas de ARN monocatenario basados en oligonucleótidos antisentido (ASO), que tienen una secuencia complementaria al *miARN* que se piensa inhibir para unirse fuertemente a él y bloquear su función. Los imitadores de *miARN* son pequeñas moléculas sintéticas de ARN bicatenario con la secuencia de *miARN* correspondiente que repondrá a la expresión perdida en la enfermedad [26].

Además, deben tenerse en cuenta otros factores extrínsecos a las células cancerosas para la introducción de los *miARN* en la terapia como la multiplicidad de *miARN* en las células cancerosas, interacción con el sistema inmune, las células del estroma tumoral e incluso con otras terapias contra el cáncer [26, 65].

- Inhibición de *miARN*

Existen una gran cantidad de *miARN* que se encuentran sobreexpresados en el cáncer por lo que la inhibición de éstos sería beneficioso para prevenir o revertir la

propagación de la enfermedad, es por eso que la investigación sobre éste tipo de terapia génica se ha vuelto un área de interés.

Las terapias de inhibición de *miARN* tienen como objetivo bloquear la interacción entre *miARN* y ARNm basándose en las propiedades de complementariedad entre los *miARN* y los ARNm objetivos para así poder silenciar oncogenes. Los principales *miARN* a inhibirse son los *miARN* con características de oncogénicas, éstos se pueden llegar a bloquear mediante el uso de oligonucleótidos antisentido (ASO) y oligonucleótidos anti-miR (AMO), ácidos nucleicos bloqueados (LNA) y esponjas de *miARN* [50, 65].

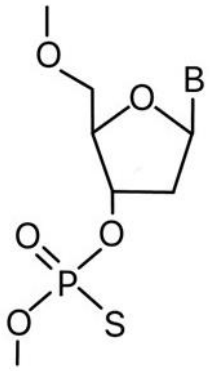
Oligonucleótidos antisentido (ASO) y Oligonucleótidos anti-*miARN* (AMO)

Los oligonucleótidos antisentido (ASO por sus siglas en inglés) son pequeños fragmentos de ADN o ARN sintético monocatenario en los que las bases nitrogenadas están modificadas químicamente y están diseñados para unirse selectivamente a través de apareamiento de bases complementarias al ARN que codifica el gen de interés. La unión con su objetivo puede desencadenar la degradación del ARN reclutando la RNAsa H, la prevención de la traducción de un ARN específico evitando su unión al ribosoma y alteración del empalme del pre-ARNm uniéndose a secuencias complementarias de pre-ARNm [66, 67].

Los ASO no modificados suelen ser más susceptibles a la degradación por nucleasas, además, su gran tamaño y su carga restringen su difusión pasiva en la célula. Por lo que se han modificado químicamente para aumentar su eficacia, su estabilidad y disminuir la respuesta inmunitaria y la toxicidad fuera del objetivo [68].

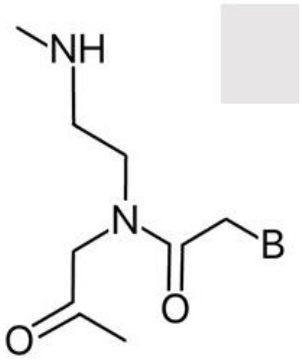
Los ASO de fosforotioato (PS) pertenecen a la primera generación, en éstos el oxígeno que no forma el puente del grupo fosfato se reemplaza por un átomo de azufre, lo que resulta en la formación de un enlace fosforotioato (Figura 7). Esta modificación lo hace resistente a la degradación de las nucleasas, reduce su depuración renal al unirse a proteínas séricas, muestra una distribución predominante en hígado, riñón y bazo y demuestran una buena captación celular. Sin embargo, existen toxicidades significativas asociadas con las capacidades de unión a proteínas que provoca reacciones inmunitarias [26, 68, 72].

Figura 7. Modificación con Fosforotioato (PS).



También hay modificaciones con oligómeros de morfolino de fosforodiamidato

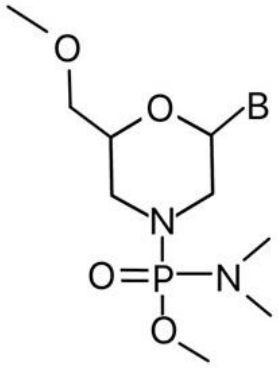
Figura 8. Modificación con oligómeros de morfolino de fosforodiamidato (PMO).



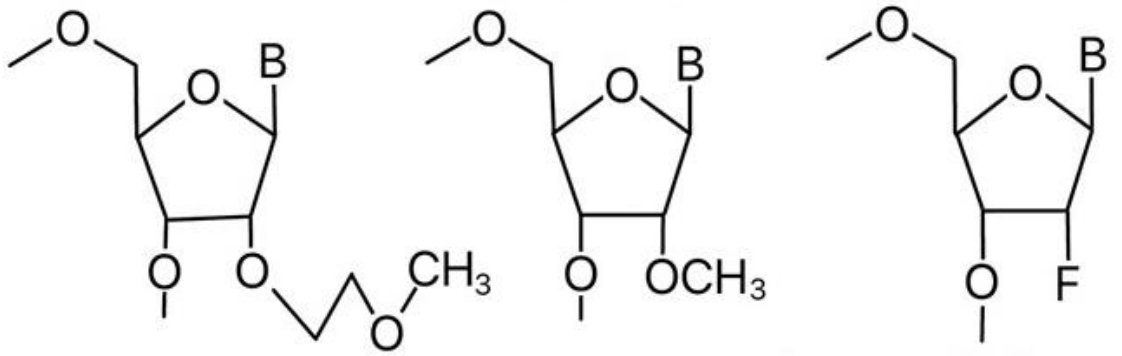
(PMO), donde la fracción del azúcar de cinco miembros se sustituye con una subunidad de morfolina de seis miembros, y cada anillo de morfolina está interconectado con un enlace de fosforodiamidato (Figura 8). Los PMO tienen carga neutra y ejercen su efecto por impedimento estérico o modulación de empalme. El anillo de morfolina aumenta su solubilidad en agua y la ausencia del grupo carbonilo proporciona resistencia contra proteasas y esterasas [68, 71, 83].

Los ácidos nucleicos peptídicos (PNA) son imitadores sintéticos de ácidos nucleicos que contienen unidades neutras de N-2-aminoetilglicina, con nucleobases conectadas por un enlace de metilcarbonilo flexible (Figura 9). Los PNA poseen una fuerte afinidad de unión con secuencias de ARN y son resistentes a la degradación enzimática, sin embargo, poseen una baja solubilidad en agua y disminución de la captación celular [68].

Figura 9.
Modificación ácidos nucleicos peptídicos (PNA).



La modificación en la posición 2' de las ribosas de los nucleótidos mejora su afinidad de unión, tienen una mayor biodisponibilidad y proporciona resistencia a la degradación enzimática. Las modificaciones usadas más a menudo son 2' flúor (2'F), 2'-O-metil (2'-O-Me) y 2'-O-metoxietil (2'-O-MOE) (Figura 10). Sin embargo, los oligonucleótidos modificados en la posición 2' no favorecen la actividad de ARNasa H, pero esto puede cambiar al usar un diseño de oligonucleótidos modificados con una región central de nucleótidos antisentido sin modificar (diseño gapmer, Figura 8), flanqueada por extremos modificados en este caso modificaciones con nucleótidos 2'. Se ha establecido que este tipo de diseño estimula el mecanismo de escisión basado en la ARNasa H1 [68, 71, 73].



2’-O-metoxietil (2’-O-MOE) | 2’-O-metil (2’-O-Me) | 2’ fluor (2’F)

Figura 10. Modificación en la posición 2’ de las ribosas.

Aun se deben tener precauciones al usar las modificaciones 2’ ya que puede haber un aumento en la afinidad de unión a proteínas plasmáticas o intracelulares contribuyendo a efectos tóxicos *in vitro* e *in vivo*. Como el caso de 2' F que se asocia con una alta cantidad de proteínas celulares a nivel global lo que puede perjudicar la localización y las funciones de las proteínas intracelulares como las proteínas DBHS y conducir a la hepatotoxicidad [74].

Los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) son modificaciones que contienen un puente de metileno que une el 2’O al 4’C del anillo de Ribosa (Figura 11), que aumenta su afinidad de unión a las secuencias del ARN objetivo, debido a su estructura preorganizada y un aumento en la temperatura de fusión del dúplex (Tm),

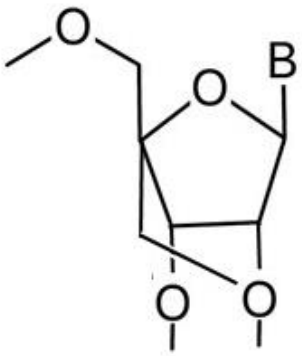


Figura 11. Ácidos nucleicos bloqueados (LNA).

además de poseer resistencia a las nucleasas muestran mayor solubilidad en agua y mayor estabilidad metabólica para la administración *in vivo* [68, 75].

Los LNA se pueden dividir en dos tipos de diseños: mixmers y gapmers (Figura 12). Los diseños de mixmer están conformados por nucleótidos no modificados interespaciados entre los nucleótidos modificados, en este caso LNA, a lo largo de la secuencia y no inducen la escisión de la ARNasa H1, sino que modulan la expresión del ARNm a través del mecanismo de impedimento estérico. Mientras que los gapmer estimulan la escisión basada en la ARNasa H1. Actualmente los diseños se realizan generalmente con enlaces internucleósidos PS [68, 64, 75].

Algunas de estas modificaciones pueden llegar a ser toxicas y provocar efectos no deseados debido al aumento en la afinidad de unión. [64]

Los ASO actúan principalmente escindiendo selectivamente los pre-ARNm por lo que uno de sus objetivos puede ser la transcripción de pri-*miARN*, sin embargo, estas transcripciones a menudo contienen precursores policistrónicos o están asociadas a otras moléculas de ARN lo que conduciría a una degradación involuntaria de otros ARN no específicos [69, 71].

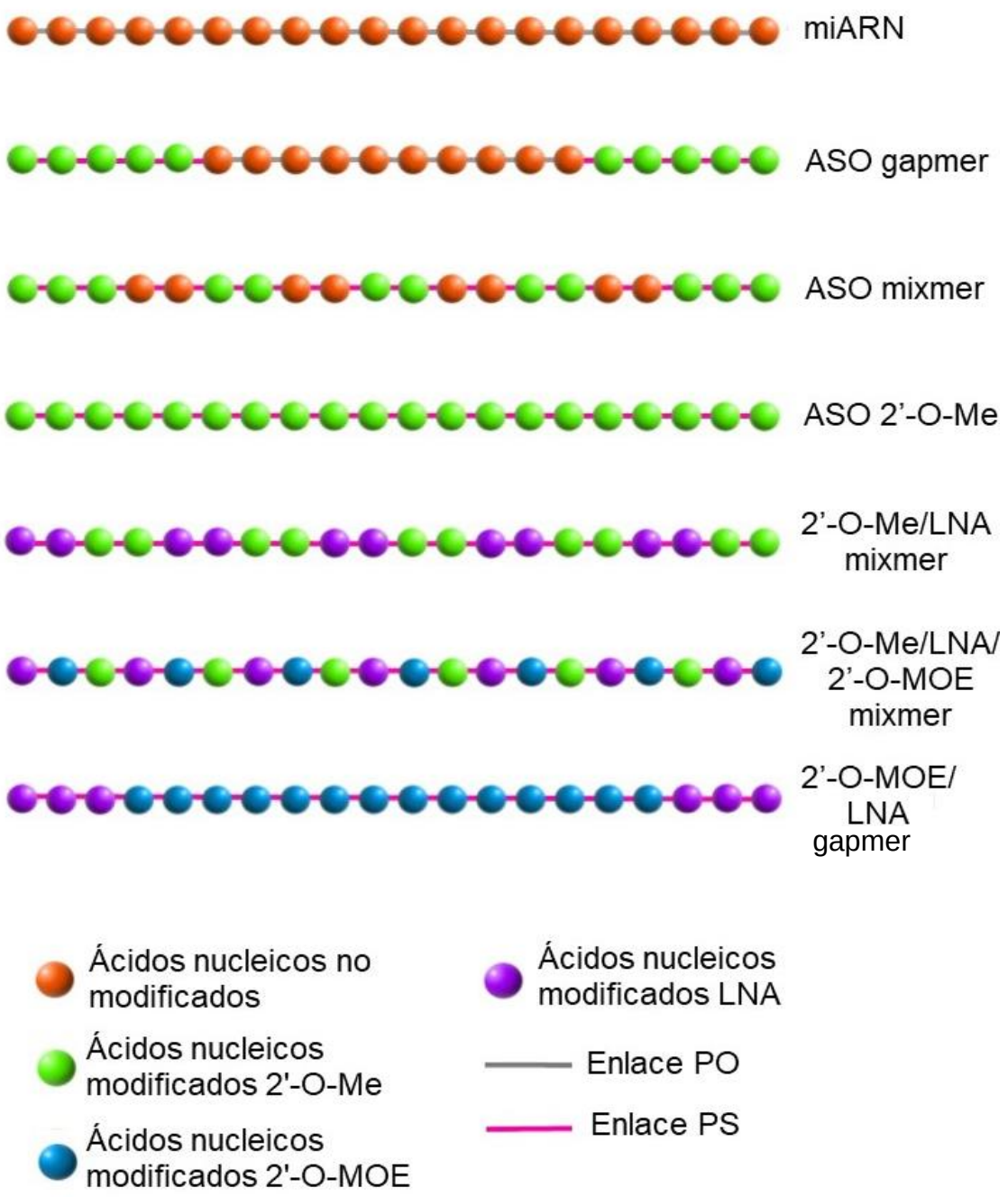


Figura 12. Diseño de Oligonucleótidos antisentido. Modificados químicamente para proporcionar resistencia a nucleasas y aumentar la afinidad. Los gapmer contienen una región central de nucleótidos antisentido sin modificar, flanqueada por extremos modificados. Mientras los mixmer están conformados por nucleótidos no modificados interespaciados entre los nucleótidos modificados. [68, 64, 69, 71, 75]

Aunque el bucle de pre-*miARN* también podría ser un objetivo para ASO posee poca accesibilidad para invadirlo, debido a su estructura en tallo-bucle y a las proteínas que suelen estar asociadas al pre-*miARN* en el proceso de maduración por lo que la etapa más accesible para inhibir la función de los *miARN* es en su etapa madura, cuando se carga en RISC en forma monocatenaria por lo que se crearon los oligonucleótidos anti-*miARN* (AMO) también conocidos como antagomirs [69].

Los AMO tienen la función de inhibir la función de *miARN* y están diseñados para ser el complemento inverso perfecto de su *miARN* maduro objetivo, uniéndose a la cadena guía e inactivando el *miARN* mediante la inhibición de la unión al ARNm objetivo o a través de la degradación por el reclutamiento de ARNasa H. Debido a su tamaño relativamente corto simplifica los requerimientos de diseño, un problema que los diseños de otros oligonucleótidos pueden tener. Al igual que los ASO necesitan modificaciones químicas ya sea en la base de nucleótidos, la cadena principal de fosfato, añadiendo modificadores de forma individual o en combinación para obtener las características deseadas como la mejora de la afinidad de unión, protección contra endo y exonucleasas presentes en el suero y el entorno intracelular, potencia, especificidad, facilidad de transfección y baja toxicidad resistencia a las nucleasas [64, 69].

Las modificaciones químicas en AMO suelen ser las mismas utilizadas en los ASO, solo que en los AMO se usan más frecuentemente las modificaciones en la posición 2’ de la ribosa de los nucleótidos y los LNA combinados con el Fosforotioato [64, 73].

Actualmente se está investigando la efectividad del diseño de ZEN-AMO. ZEN-AMO es una modificación que está formada por bases 2'OMe emparejadas con dos modificadores ZEN. Los restos 2'OMeARN no son tóxicos, son resistentes a las endonucleasas pero susceptibles a exonucleasas y aumentan la afinidad de unión. ZEN es un grupo naftil-azo (N, N-dietil-4-(4-nitronaftalen-1-ilazo)-fenilamina) (Figura 13), que es un modificador sin base que no es reconocido por exonucleasas por lo que bloquea su ataque, también aumenta la afinidad presumiblemente a través de interacciones de apilamiento hidrofóbico con las nucleobases [69].

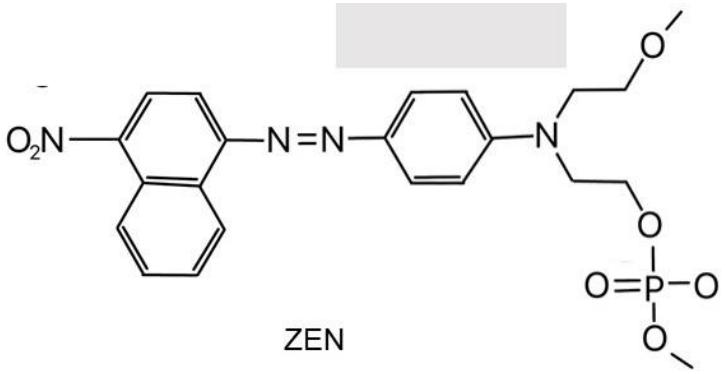


Figura 13. Grupo ZEN.
ZEN no contiene una base nitrogenada por lo que no puede ser reconocido por exonucleasas entonces protege a AMO de los posibles ataques.

Se ha estimado que las terapias con AMO sean menos tóxicas en comparación con otros fármacos contra el cáncer. Permiten una absorción más fácil en muchos tipos de tejidos y pueden tener vidas medias de hasta 4 semanas. Sin embargo, poseen baja potencia y necesitan dosis altas para ser eficaces [64, 65].

Los AMO son el área de mayor crecimiento para la terapia con *miARN*, por lo que muchos laboratorios estudian diferentes formas de aumentar su estabilidad y disminuir los efectos no deseados de manera económica.

Vectores de expresión (esponjas de *miARN*)

Se ha descubierto que las esponjas de *miARN* se encuentran naturalmente en plantas y animales, son elementos de respuesta de *miARN* colocados después de un gen, están en forma de ARN largo no codificante y actúan como señuelo para evitar la unión al ARNm blanco [64].

Las esponjas sintéticas suelen ser vectores plasmídicos o virales con numerosos sitios de unión antisentido en tándem de entre 4 y 10 sitios separados por unos cuantos nucleótidos, mediante los cuales se produce un emparejamiento [76, 81].

Para evitar la escisión por ARNasa H de las esponjas por la interacción perfecta entre las secuencias se debe hacer un desajuste en las secuencias de unión de 1 o

2 pares de bases para evitar su emparejamiento perfecto, además, de aumentar su vida útil, ayudan a formar una interacción más estable con el *miARN*. Incluso pueden utilizar las secuencias semilla para inhibir una familia completa de *miARN* e inhibir varios *miARN* a la vez [81, 82].

Las esponjas de *miARN* han sido eficaces para determinar las funciones de *miARN in vivo*, sin embargo, ha sido difícil llevarlas al campo terapéutico debido a la seguridad y los efectos fuera del objetivo creados por el exceso de plásmidos exógenos, además que muestran diferentes grados de inhibición en diferentes contextos y es difícil evaluar su grado de silenciamiento [50].

Moléculas pequeñas inhibidoras de *miARN* (SMIR)

Debido al costo elevado de producir y probar los AMO, además de las dificultades que se han tenido en la entrega de vectores de expresión y los oligonucleótidos antisentido, se han estado investigando a las moléculas pequeñas inhibidoras de miARN (SMIR) como posibles inhibidores de la expresión génica.

Los SMIR son compuestos químicos de moléculas pequeñas que interfieren en la maduración o biogénesis de los *miARN* para regular los procesos celulares y la expresión génica. Estas moléculas apuntan a la interferencia de la transcripción de pri-*miARN*, la inhibición de los procesos de pre-*miARN* mediante DICER y RISC o inhiben la interacción entre RISC y el ARNm blanco a través de mecanismos, como el control del empalme, la inhibición de la traducción y la desactivación de estructuras funcionales del ARN no codificante [64, 76, 78].

La forma en que ocurre la supresión de la expresión de *miARN* es mediante la unión a los sitios de Drosha o de Dicer ya sea induciendo cambios estructurales obstaculizando la biogénesis o conduciéndolo a la degradación. (Figura 14) [78].

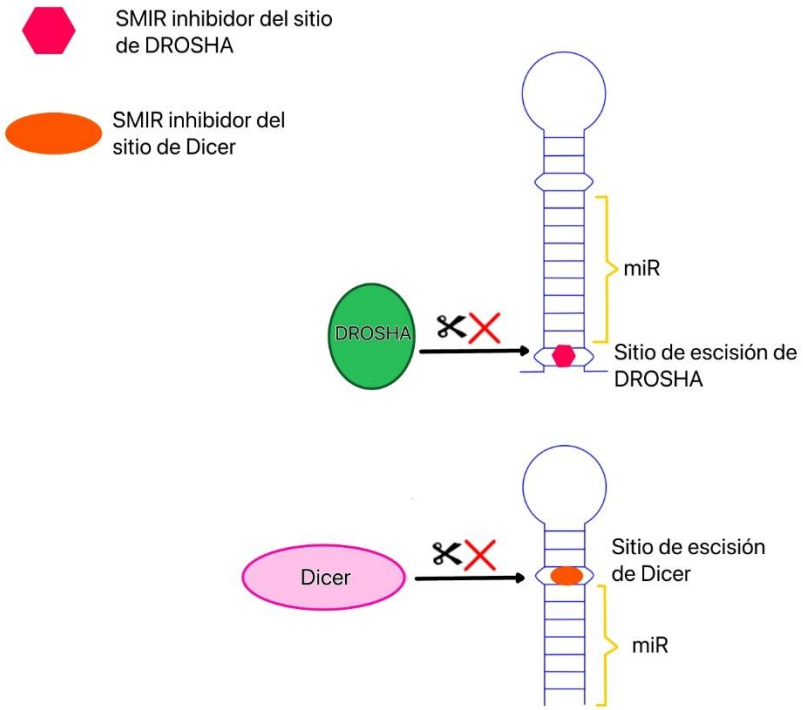


Figura 14. Los SMIR son compuestos químicos de moléculas pequeñas que interfieren en la maduración o biogénesis de los miARN. Apuntan principalmente los sitios de unión de Drosha o Dicer obstaculizando la biogénesis o conduciéndolo a la degradación.
Figura modificada de [78]

El primer SMIR descubierto fue un azobenceno que demostró inhibir al precursor de *miR*-21. *MiR*-21 tiene una participación importante en varios tipos de cáncer, y es un buen objetivo para los SMIR [79].

Con el fin de reducir costos en el proceso de selección y desarrollo de SMIR se han utilizado herramientas bioinformáticas para identificar moléculas pequeñas dirigidas a *miARN* a través de la simulación de la afinidad de unión de SMIR a los *miARN*.

El desarrollo de nuevos algoritmos ha ayudado a los investigadores a comprender mejor los efectos de los SMIR en la función y expresión de los *miARN* con el objetivo de desarrollar nuevas técnicas terapéuticas [76, 78].

Utilizando estas herramientas bioinformáticas se ha logrado identificar a algunas moléculas pequeñas con potencial terapéutico. Uno de estos es el ROBOTAC, estas moléculas están diseñadas para reconocer y unirse selectivamente a secuencias de ARN específicas que lleva a la degradación del objetivo o las Bleomicinas (BLM) que tienen el poder de afectar y escindir los ARN uniéndose al sitio de escisión de Dicer [78].

Un modelo de AC1MMYR2 inhibió la tumorigénesis y la invasividad interactuando con el sitio funcional de Dicer. Pruebas con Polilisina (PLL) y Tripaflavina (TPF) suprimieron la actividad tumorigénica inhibiendo Dicer y AGO2, respectivamente. La Kanamicina A guanidinilada (G Kan A) y la Neomicina B guanidinilada (G Neo B), mostraron una reducción en los niveles de *miR*-10b maduro debido a la unión al sitio de Drosha inhibiendo su procesamiento [76, 77, 78, 80].

A pesar del potencial que pueden llegar a tener los SMIR cuentan con algunas dificultades al igual que los AMO. Una de las principales es su problema con la especificidad, ya que pueden dirigirse a múltiples *miARN* en lugar de a uno específico. Como la estreptomicina que puede dirigirse tanto a *miR*-21 como a *miR*-27a, además de estar limitados por su concentración media efectiva (EC50) relativamente alta [64, 76].

Los SMIR han podido usarse para restablecer el equilibrio de *miARN* inhibiendo oncomiRs sobreexpresados, sin embargo, aún existen desafíos que obstaculizan su uso en la clínica. Algunos de estos incluyen efectos fuera del objetivo, administración especifica de tejido comprometida, mala captación celular e inestabilidad *in vivo*, a pesar de que se han desarrollado numerosos sistemas de administración, han sido ineficaces o tóxicos para uso clínico, incluso las nanopartículas y los liposomas [76].

- Imitadores de *miARN*

Si bien la mayoría de las investigaciones se han enfocado en la terapia de inhibidores de *miARN*, la terapia de reposición de *miARN* no se ha dejado de lado. Se sabe que en la mayoría de los cánceres la expresión de los *miARN* supresores

de tumores está disminuida lo que conduce a la proliferación celular, metástasis e inhibición de la apoptosis. La reintroducción de estos *miARN* a través de un imitador busca restaurar la pérdida de función restableciendo los niveles de expresión de *miARN* represores de tumores que están regulados a la baja en las células cancerosas para inhibir el estado patológico [64, 76, 84].

Los imitadores de *miARN* son oligonucleótidos de ARN de doble cadena sintéticos con la misma secuencia del *miARN* que imitan la función de su contraparte: el *miARN* natural. Al igual que los inhibidores de *miARN*, los imitadores son modificados químicamente para que posean mayor estabilidad, mejore su absorción, disminuyan la respuesta inmune y también evitar la degradación por nucleasas. Las modificaciones más comunes son en la posición 2’ de la ribosa del nucleótido, y las más usadas son las modificaciones 2'-OMe y la 2’-OF junto con los ácidos nucleicos bloqueados (LNA) [50, 85].

En los imitadores de *miARN* la cadena guía es igual al *miARN* de interés que se dirigirá al ARNm, mientras que la cadena pasajera se degradará. Sin embargo, puede que en algunos casos la cadena pasajera se dirija a los ARNm o se una a RISC lo que causaría efectos secundarios no deseados, por lo que se suele modificar la cadena pasajera agregándole colesterol (que también mejorará la absorción) o dividiendo la cadena en dos partes que son demasiado pequeñas para interactuar con el ARNm o RISC. La cadena guía debe mantenerse lo más parecido posible del *miARN* nativo [50, 64, 85, 86].

Ya que los niveles basales de *miARN* se ven disminuidos en la patología, aumentarlos hasta sus niveles normales debería ser seguro, además, al tener la misma secuencia del *miARN* agotado que se produce de forma natural se espera que el imitador se dirija al mismo ARNm regulado. Aun con esta hipótesis la posible toxicidad causada en los tejidos normales debido a una acumulación de *miARN* exógeno, la sobrecarga de RISC y la activación o hiperactivación de otras vías celulares que podrían intervenir con el bienestar celular normal todavía provoca preocupación. Por lo que buscar una vía de entrega dirigida es esencial para la terapia [64, 76, 84].

La terapia puede administrase mediante inyección local, pero en algunos casos sería difícil tener acceso al lugar afectado por lo que se han investigado varios vehículos de reparto diferentes. Una de las más utilizadas son los vectores virales con adenovirus y lentivirus, aunque también se han utilizado emulsiones lipídicas, liposomas y nanopartículas que mejoran su estabilidad y mejoran su captación. Además, las nanopartículas pueden recubrirse de anticuerpos específicos del tumor para mejorar los efectos específicos [65, 76, 85].

Entrega de microARN

Para el desarrollo de una terapia eficaz con *miARN*, no solo se requieren moléculas moduladoras de la expresión correctas, también se debe tener una estrategia de administración apropiada que sea segura y eficaz. A pesar de que las modificaciones en la estructura química de los *miARN* han demostrado ser eficaces en ciertos entornos, hay tejidos que necesitan un sistema adicional para facilitar la entrega, ya que a pesar de su pequeño tamaño y de su estabilidad en circulación, todavía existen diversos obstáculos que dificultan la entrega del *miARN* al sitio blanco. No solo debe ser especifico al sitio correcto, también debe evitar su degradación en circulación y una rápida excreción a través del riñón, debe superar múltiples barreras fisiológicas, la mala captación celular y evitar provocar respuestas inmunes no deseadas o toxicidad [64, 66, 87].

La falta de vehículos de administración con una vida media circulante prolongada, silenciamiento génico y acumulación en el tejido blanco efectiva han dificultado que la administración sea eficaz y no toxica. Esto ha sido una barrera importante para la aplicación terapéutica de *miARN* [87, 91].

<u>Métodos de entrega locales</u>

En la administración local se aplica directamente la terapia de *miARN* al tejido blanco por lo que se tendrían menos efectos secundarios que en la administración sistémica al no dirigirse a lugares no deseados, además de evitar varios pasos de absorción a través de barreras y tendrá mayor biodisponibilidad. Sin embargo, no todos los objetivos pueden tratarse con una administración local, ya que muchas veces el sitio de la patología a tratar (por ejemplo, un tumor maligno) es inaccesible. [91]

Las modificaciones químicas son las utilizadas en este tipo de administración, sobretodo la modificación 2’OMe y las colas de colesterol que ayudan a la estabilidad y a una buena absorción [64].

Métodos de administración sistémica

En la administración local se tiene accesibilidad directa al objetivo a tratar, sin embargo, muchos tejidos solo pueden ser alcanzados mediante una administración sistémica. La administración sistémica se administra al torrente sanguíneo a través de una inyección intravenosa (en la mayoría de los casos). Este tipo de administración es más compleja ya que el *miARN* debe viajar a través del torrente sanguíneo hasta el sitio blanco evitando la captación por otros tejidos no blanco, la filtración renal, la degradación por nucleasas endógenas, evitar reacciones inmunes no deseadas o la agregación con proteínas séricas. Además de tener que difundirse a través de la matriz extracelular donde puede encontrar resistencia al transporte y ralentizar o incluso detener el proceso de administración [64, 66, 91].

En la administración sistémica difícilmente se utiliza *miARN* desnudo o modificado químicamente por lo que usualmente se administran asociados a un vector. Esos vectores están diseñados para facilitar la captación en el tejido objetivo, inhibir la captación no especifica y proteger la carga de *miARN*. Algunos de estos vectores pueden ser virales, estar formados de lípidos, nanopartículas de polímeros o metales e incluso ser una mezcla de estos. Para la creación de estos vectores se debe considerar su tamaño, carga electrostática, cantidad de *miARN* que puede cargar, interacciones con otras moléculas y por supuesto, su seguridad [64, 66, 90, 91].

La carga superficial de las nanopartículas y liposomas puede influir en la forma en que interactúan con el entorno. En sistemas *in vitro* los vehículos cargados positivamente promueven la formación de complejos con los *miARN* y facilitan la captación al asociarse con la membrana, sin embargo, en sistemas *in vivo* pueden unirse a proteínas séricas cargadas negativamente en el torrente sanguíneo que los volverá ineficaces [91].

La biodistribución puede verse afectada por la formulación del vehículo de administración, por lo que se pueden aprovechar ciertas de sus propiedades para internalizar y concentrar los *miARN* en ciertos tejidos (como el hígado, el bazo o los ganglios linfáticos) o evitar la filtración glomerular a través de los riñones [66, 91].

Uno de los mayores problemas con la administración sistémica es la toxicidad provocada por algunos de los vectores ya que pueden causar reacciones inmunes fuertes como es el caso de los vectores virales, por lo que los vectores lipídicos y de polímeros sintéticos se han estado desarrollando para evitar la estimulación del sistema inmune. Además, la falta de orientación especifica que aumenta la probabilidad de tener efectos fuera del objetivo ya que los *miARN* pueden tener apuntar a múltiples blancos su coincidencia imperfecta puede provocar toxicidad [64, 87, 91].

- Vectores virales

Los vectores virales son los que han tenido la mayor eficacia en la administración de *miARN*. Éstos están modificados para que haya una expresión y empaquetamiento eficiente, son autoinactivantes y pueden infectar una gran variedad de células, además, de poder modificar la cápside para aumentar la afinidad por tejidos específicos [64, 66].

Se pueden utilizar Lentivirus, Adenovirus y virus Adenoasociados (AAV) en modelos *in vivo*. Los lentivirus infectan células e integran su genoma al ADN cromosómico de la célula huésped proporcionando una expresión estable del gen de *miARN* a largo plazo. Sin embargo, se consideran poco seguros ya que la integración de su material genético al genoma puede alterar la función genética endógena si la integración se da en una secuencia codificante o reguladora dentro del genoma llevando incluso a la activación de oncogenes o al silenciamiento de genes supresores de tumores aumentando el riesgo de cáncer [64, 66, 67, 88].

Se ha intentado reducir los riesgos mediante un anclaje artificial que los dirige a un sitio genómico específico y seguro para integrarse. Algunos de estos modelos han demostrado éxito [64, 66].

Los adenovirus y los virus adenoasociados al contrario de los lentivirus, no integran su material genético al genoma por lo que son más seguros en ese aspecto, pero su expresión génica es demasiado a corto plazo. Además de que la respuesta

inmune a los adenovirus es aguda y su aplicación solo se aplica a unos tejidos como el hígado, pulmón o cáncer localizado [67, 88].

Los virus adenoasociados son similares en características a los vectores adenovirales pero tienen alguna deficiencia en su replicación y patogenicidad y no están asociados a ninguna enfermedad por lo que son más seguros. Además, poseen la capacidad de integrarse a un sitio especifico en el cromosoma 19 sin efectos indeseados. Su principal desventaja es su complejo proceso de producción. Sin embargo, se ha convertido en el vector más prometedor de los anteriormente mencionados [67, 88].

Aunque se ha demostrado la eficacia de la administración de *miARN* asociados a virus, su aplicación clínica sigue siendo limitada por temas relacionados a la seguridad por lo que los sistemas de administración no virales parecen más prometedores [50].

- Vectores de lípidos

En la actualidad los vectores lipídicos son uno de los métodos no virales más utilizados y adecuados para administrar ácidos nucleicos *in vivo* (incluido el *miARN*), debido a su alta eficiencia de encapsulación que protege al *miARN* de ser degradado y sus propiedades fusiógenicas que ayudan a la transferencia a través de la membrana celular. Este tipo de vectores pueden estar formados por lípidos ionizables o catiónicos, fosfolípidos, lípidos de polietilenglicol (PEG) y colesterol (Figura15A) [66, 89, 90].

Los *miARN* son hidrófilicos cargados negativamente, por lo que se pueden unir directamente a los lípidos catiónicos y formar complejos estables, además que la carga positiva también ayuda la absorción en la membrana celular que está cargada negativamente. Pero se ha visto que los liposomas catiónicos pueden causar toxicidad a través de respuestas inmunes y receptores tipo peaje. Por lo que se ha optado formar liposomas catiónicos alterados utilizando lípidos catiónicos como DOTAP o cloruro de N-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-N, N, N-trimetilamonio (DOTMA) como componentes principales mezclados con otros lípidos auxiliares como DOPC,

DOPE, DSPC y colesterol, para formar una bicapa lipídica a través de interacciones hidrofóbicas, en esta forma facilitaran la adsorción del *miARN* y les dará flexibilidad adicional a la hora de optimizar las propiedades físicas y químicas. Este tipo de liposomas alterados son lípidos ionizables, tienen una carga neutra superficial que reduce la toxicidad y prolongan su vida útil en circulación. Cuando se encuentran en el ambiente ácido de los endosomas, estos lípidos modificados se ionizan liberando los *miARN* encapsulados al citoplasma aumentando la entrega de *miARN*. [64, 90, 91].

Los lípidos catiónicos suelen acumularse preferentemente el hígado, los lípidos ionizables tienen mayor afinidad por el pulmón. Estas propiedades se han utilizado para dirigirlos específicamente a estos órganos. Sin embargo, también se han utilizado ligandos y anticuerpos dirigidos a un receptor específico para relocalizarlos en células particulares. Estos conjugados están limitados por su dispensación y dosis, ya que necesitan administración de dosis altas, además de generar agregados de *miARN* en el hígado [50, 64].

- Nanopartículas

Las nanopartículas son otra de las estrategias usadas más comunes para la entrega de *miARN*. Aunque el uso de polímeros sintetizados son los principales materiales para la formación de nanopartículas, también pueden estar formadas por partículas inorgánicas, que son mezclas de polímeros y lípidos [64].

Las nanopartículas, como en otros vectores, suelen tener un elemento catiónico para formar complejos con los *miARN* aniónicos que deben protegerlos de la degradación y facilitar su captación celular. Además, los polímeros utilizados en la creación de las nanopartículas deben ser biocompatibles y biodegradables para evitar la citotoxicidad y evitar la acumulación en células y tejidos. Deben de tener un tamaño menor a los 100 nm para evitar captación y excreción no específicas. Se pueden adicionar ligandos a la superficie de las nanopartículas al igual que con otros vectores para proporcionarles especificidad además de necesitar un mecanismo de liberación del *miARN* del polímero una vez internalizada la nanopartícula,

regularmente dependen del entorno reductor del citoplasma para liberar el *miARN* [64, 65, 66].

Algunos de los polímeros más investigados para la administración de terapias basadas en nucleótidos son PEI (polieterimida), PBAE (poli(beta-amino ésteres)) y PLGA (poli(ácido láctico-co-glicólico)). PEI y PBAE poseen una carga positiva que les permite unirse a los *miARN* y formar complejos; los grupos amina en los PBAE les permiten amortiguar los entornos ácidos, su biodegradabilidad mejora su perfil de seguridad, pero puede limitar su capacidad para mantener la administración durante largos períodos de tiempo (Figura 15B) [68, 91, 92].

Sin embargo, el uso de estos polímeros está limitado por su citotoxicidad asociada a su carga positiva, además de tener múltiples interacciones no especificas con proteínas séricas y tisulares y eficiencia de encapsulación limitada. Se han estado desarrollando estrategias para disminuir su toxicidad modificando sus estructuras sin perder su capacidad de transfección [68, 90, 91].

El PLGA es un polímero aprobado por la FDA, muy conocido y ampliamente utilizado en fórmulas de nanopartículas en la administración de varios fármacos. El PLGA es un polímero alifático con una cadena principal de poliéster que se forma a través de la copolimerización de monómeros de ácido láctico y ácido glicólico, se puede polimerizar en varias formulaciones basadas en la composición de ácido láctico y glicólico. Gracias a esto se pueden modificar algunas de sus características ajustándolas según el uso que se les vaya a dar, aumentando o disminuyendo la cantidad de los ácidos en su composición. Tiene gran biocompatibilidad, biodegradabilidad y buena cinética de liberación y ya se ha utilizado en la liberación de otros fármacos y moléculas como hormonas, citosinas, antibióticos, péptidos y proteínas y vacunas. Su degradación es a través de la escisión hidrolítica de su cadena principal de poliéster y sus productos de degradación no son tóxicos ya que el cuerpo puede metabolizar ácido láctico y ácido glicólico [68, 93].

Las nanopartículas híbridas formadas por lípidos y polímeros tienen las propiedades tanto de las partículas poliméricas como de las lipídicas. Las nanopartículas lipídicas poliméricas (PLN) están formadas por un núcleo polimérico hidrofóbico

biocompatible, una monocapa de fosfolípidos y una capa externa de polietilenglicol (PEG) (Figura 15C). Mientras los polímeros regulan la liberación del fármaco los lípidos mejoran la permeabilidad y la carga. La liberación del fármaco puede estar mediada por diversos factores como el pH del microambiente, la temperatura o la composición de la matriz. Además de tener un tamaño relativamente pequeño que les permite no ser excretadas rápidamente y tener un tiempo de circulación más prolongado, tienen una mayor acumulación en el tejido blanco y cruzan más eficientemente la microvasculatura permeable. Los PLN son estables, biocompatibles y fáciles de preparar. Los PNL pueden ser aplicados en la terapia génica, vacunas y la obtención de imágenes biomédicas [87, 94].

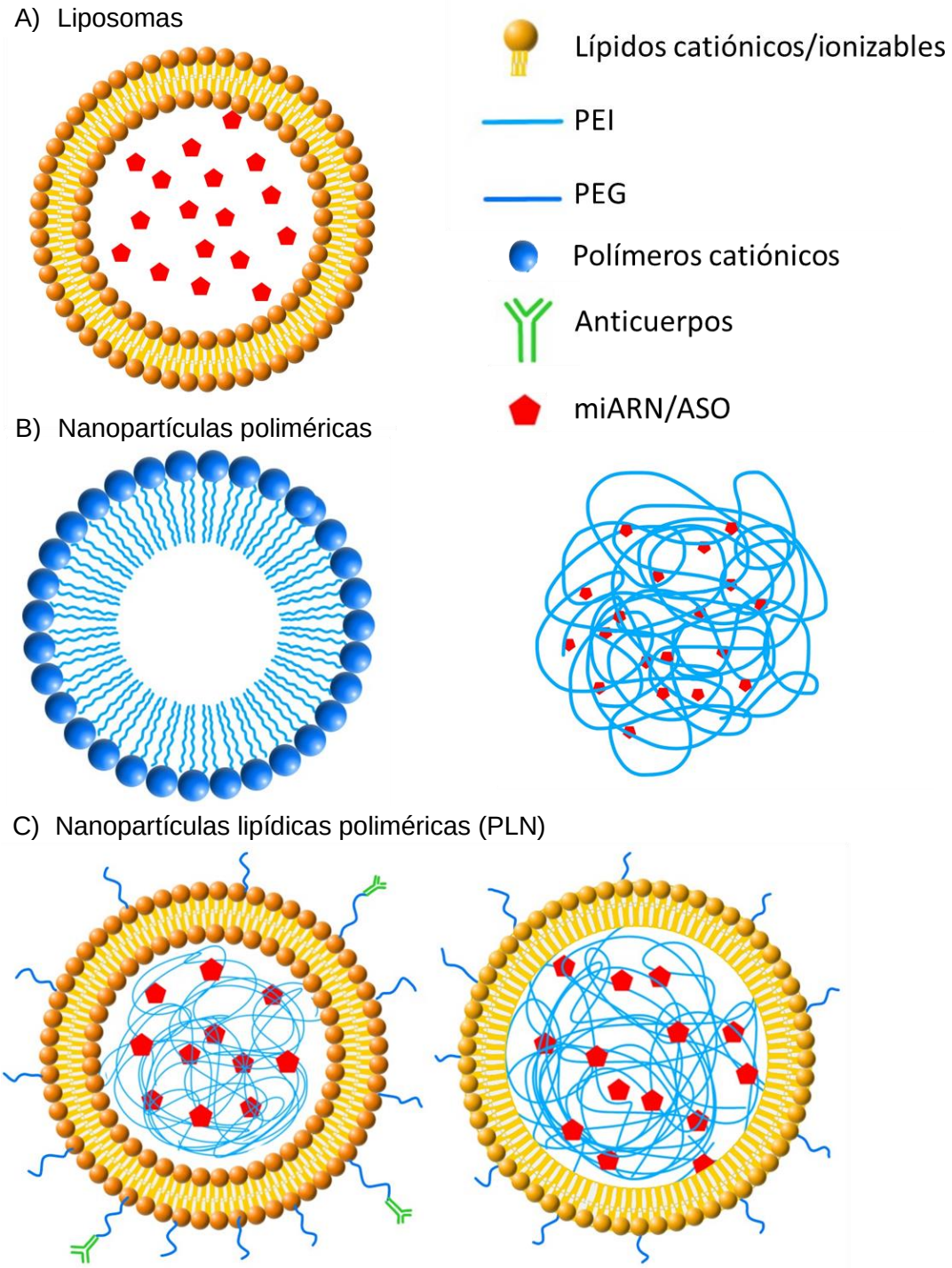


Figura 15. Vectores no virales.
A) Los liposomas están formados por lípidos ionizables o catiónicos, fosfolípidos, lípidos de polietilenglicol (PEG) y colesterol, que pueden acomodarse en 1 o 2 capas lipídicas B) Las nanopartículas poliméricas son la forma más común de entrega de miARN, pueden estar formadas de 1 o más polímeros y pueden formar micelas o agregados. C) Las nanopartículas lipídicas poliméricas (PLN) están formadas por un núcleo polimérico hidrofóbico, una capa de fosfolípidos y una capa externa de PEG y pueden incluir ligandos específicos para una entrega más eficaz [66, 68, 87, 89, 90-94].

Terapias basadas en *miARN*

En la actualidad existen varias terapias potenciales de *miARN* que han alcanzado la fase I y fase II de los ensayos clínicos; sin embargo, ninguna ha podido ser aprobada por la FDA, aunque existen varias más en desarrollo. [66]

Una de ellas es el Miravirsen que es un antagomiR dirigido al *miARN-122* modificado con LNA y fosforotioato contra el virus de la hepatitis C (VHC). *miR-122* se expresa específicamente en el hígado por lo que VHC lo utiliza como factor de trascripción para aumentar la expresión de su genoma. Miravirsen se acumula fácilmente el hígado y no necesita de alguna estrategia de administración específica lo que es ventajoso para combatir la infección. Los resultados de los ensayos clínicos de fase 2 fueron positivos ya que resultó en niveles indetectables de ARN del VHC en bastantes pacientes. RG-101 es otro antagomiR de *miR-122* conjugado con N-acetil-D-galactosamina con una potencia 20 veces mayor al Miravirsen que actualmente se encuentra en ensayos clínicos, aunque presenta una eficacia considerable se encuentra en espera debido a diversos efectos adversos graves de ictericia severa [66, 95, 96, 97].

Algunas otras terapias basadas en *miARN* en desarrollo son RG-125 (antagomiR contra *miR-103*) para la Esteatohepatitis no alcohólica, RG-112 (antagomiR contra *miR-21*) para la Fibrogénesis de órganos asociada al síndrome de Alport, Remlarsen (imitador de *miR-34a*) para enfermedades fibróticas y MRG-107 (antagomiR contra *miR-155*) [50].

En cuanto a tratamientos contra el cáncer existen el Cobomarsen (MRG-106), MRX34 y el Mesomir.

El Cobomarsen (MRG-106) es un antagomiR dirigido a *miR-155* modificado con LNA desarrollado por Miragen Therapeutics. MRG-106 está desarrollado para combatir varios subtipos de linfoma, entre ellos el linfoma difuso de células B grandes y además de algunas leucemias, en donde *miR-155* está regulado positivamente. El *miR-155* regula la diferenciación y proliferación de células sanguíneas y está altamente expresado en neoplasias malignas principalmente de

células B. Actualmente tiene varios ensayos clínicos en fase 2 para tratamientos de linfoma cutáneo de células T (CTCL), leucemia linfocítica crónica, linfoma difuso de células B grandes y la leucemia/linfoma de células T del adulto. A pesar de haber completado los ensayos de fase 1, dos de estos se encuentran interrumpidos no por razones de eficacia o seguridad, si no por razones comerciales [98, 99].

MRX34 es un imitador de *miR-34* desarrollado por MiRNA Therapeutics Inc.

miR-34 es un miARN con capacidad supresora tumoral, puede regular la expresión génica y controlar procesos críticos como la proliferación celular, la apoptosis y la metástasis, además de estar regulado a la baja en una gran cantidad de cánceres, lo que lo convierte en un buen objetivo terapéutico. MRX34 fue administrado en una nanopartícula liposomal a pacientes con varios tipos de cáncer como carcinoma hepatocelular, melanoma, carcinoma de células renales, cáncer de pulmón (incluyendo de células pequeñas, adenocarcinoma y escamoso), tumor del estroma gastrointestinal, neuroendocrino, entre otros. Desafortunadamente los ensayos de fase 1 tuvieron que detenerse debido a efectos adversos graves relacionados con el sistema inmunitario, donde perdieron la vida algunos pacientes. El desarrollo del fármaco se detuvo e incluso MiRNA Therapeutics cesó sus operaciones [66, 98, 100, 101].

MesomiR1 es un imitador de *miR*-16 dirigido a células cancerosas que expresan el factor de crecimiento epidérmico (EGFR) para el tratamiento de mesotelioma pleural maligno y el cáncer de pulmón de células no pequeñas desarrollado por EnGeneIC Limited. *miR*-16 es un supresor de tumores encargado principalmente de suprimir oncogenes como BCL2, CDK1 y JUN. Regulado a la baja en diversas neoplasias malignas, como el neuroblastoma, el osteosarcoma, el carcinoma hepatocelular, el cáncer de cuello uterino, el cáncer de mama, los tumores cerebrales, los cánceres gastrointestinales, el cáncer de pulmón y el cáncer de vejiga [66, 102, 103].

MesomiR1 se administra como un TargomiR. Los TargomiR son nanopartículas de minicélulas bacterianas no vivas, que pueden empaquetar una variedad de moléculas incluidos los *miARN* y otros ácidos nucleicos. Para evitar efectos no deseados, los TargomiR son dirigidos por anticuerpos bioespecíficos, en el caso de

MesomiR 1 contiene anticuerpos para EGFR. El MesomiR1 mostró tasas de respuestas variables además de toxicidad dependiente de la dosis que incluyen anafilaxia, inflamación, y eventos cardiacos [66, 103, 104, 105].

Conclusiones

Los *miRNA* desempeñan funciones reguladoras fundamentales en la actividad celular, como en el desarrollo, diferenciación, proliferación, metabolismo, apoptosis y estabilidad genómica, además de desempeñar un papel en muchos estados patológicos, lo que los convierte en buenos candidatos como agentes terapéuticos.

Varios estudios preclínicos e *in vitro* han logrado inhibir los oncomiR por ejemplo reintroducido los *miRNA* oncosupresores en células cancerosas, lo que demuestra que estas terapias son efectivas para blancos terapéuticos y terapias. Sin embargo, todavía existen muchos problemas y desafíos con respecto a la sensibilidad, especificidad, selectividad y los efectos no dirigidos asociados a las terapias con *miARN*.

Aunque todavía queda mucho por descubrir y perfeccionar para desarrollar terapias de *miARN* seguras y eficaces, la llegada de algunas terapias a ensayos clínicos es prometedor y mientras la investigación en este campo siga creciendo, el desarrollo continuará mejorando.

Bibliografía

1. Bartel D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281–297. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00045-5

2. Griffiths-Jones, S., Grocock, R. J., van Dongen, S., Bateman, A., & Enright, A. J. (2006). miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic acids research*, *34*(Database issue), D140–D144. https://doi.org/10.1093/nar/gkj112

3. O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. *Frontiers in endocrinology*, *9*, 402. https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402

4. Komatsu, S., Kitai, H., & Suzuki, H. I. (2023). Network Regulation of microRNA Biogenesis and Target Interaction. *Cells*, *12*(2), 306. https://doi.org/10.3390/cells12020306

5. Shang, R., Lee, S., Senavirathne, G., & Lai, E. C. (2023). microRNAs in action: biogenesis, function and regulation. *Naturereviews. Genetics*, *24*(12), 816–833. https://doi.org/10.1038/s41576-023-00611-y

6. Yang, J. S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell*, *43*(6), 892–903. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.024

7. Xie, M., Li, M., Vilborg, A., Lee, N., Shu, M. D., Yartseva, V., Šestan, N., &Steitz, J. A. (2013). Mammalian 5'-capped microRNA precursors that generate a single microRNA. *Cell*, *155*(7), 1568–1580. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.027

8. Sheng, P., Fields, C., Aadland, K., Wei, T., Kolaczkowski, O., Gu, T., Kolaczkowski, B., &Xie, M. (2018). Dicer cleaves 5'-extended microRNA precursors originating from RNA polymerase II transcription start sites. *Nucleic acids research*, *46*(11), 5737–5752. https://doi.org/10.1093/nar/gky306

9. Yang, J. S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D., & Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(34), 15163–15168. https://doi.org/10.1073/pnas.1006432107

10. Bogerd, H. P., Karnowski, H. W., Cai, X., Shin, J., Pohlers, M., & Cullen, B. R. (2010). A mammalian herpesvirus uses noncanonical expression and processing mechanisms to generate viral MicroRNAs. *Molecular cell*, *37*(1), 135–142. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.12.016

11. Jonas, S., &Izaurralde, E. (2015). Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature reviews. Genetics*, *16*(7), 421–433. https://doi.org/10.1038/nrg3965

12. Fabian, M. R., &Sonenberg, N. (2012). The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC. *Nature structural & molecular biology*, *19*(6), 586–593. https://doi.org/10.1038/nsmb.2296.

13. Kehl, T., Backes, C., Kern, F., Fehlmann, T., Ludwig, N., Meese, E., Lenhof, H. P., & Keller, A. (2017). About miRNAs, miRNA seeds, target genes and target pathways. *Oncotarget*, 8(63), 107167–107175. https://doi.org/10.18632/oncotarget.22363

14. Gebert, L. F. R., &MacRae, I. J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology*, *20*(1), 21–37. https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7

15. Filipowicz, W., Bhattacharyya, S. N., &Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight?. *Nature reviews. Genetics*, *9*(2), 102–114. https://doi.org/10.1038/nrg2290

16. Broughton, J. P., Lovci, M. T., Huang, J. L., Yeo, G. W., &Pasquinelli, A. E. (2016). Pairing beyond the Seed Supports MicroRNA Targeting Specificity. *Molecular cell*, *64*(2), 320–333. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.004

17. Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., &Burge, C. B. (2003). Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, *115*(7), 787–798. https://doi.org/10.1016/s0092-8674(03)01018-3

18. Plotnikova, O., Baranova, A., &Skoblov, M. (2019). Comprehensive Analysis of Human microRNA-mRNA Interactome. *Frontiers in genetics*, *10*, 933. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00933

19. Iwakawa, H. O., &Tomari, Y. (2022). Life of RISC: Formation, action, and degradation of RNA-induced silencing complex. *Molecular cell*, *82*(1), 30–43. https://doi.org/10.1016/j.molcel.2021.11.026

20. Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. (2006). Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews. Cancer*, *6*(4), 259–269. https://doi.org/10.1038/nrc1840

21|.Reddy K. B. (2015). MicroRNA (miRNA) in cancer. *Cancer cell international*, *15*, 38. https://doi.org/10.1186/s12935-015-0185-1

22. Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., & Anderson, T. A. (2007). microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental biology*, *302*(1), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2006.08.028

23. Hussen, B. M., Hidayat, H. J., Salihi, A., Sabir, D. K., Taheri, M., & Ghafouri-Fard, S. (2021). MicroRNA: A signature for cancer progression. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, *138*, 111528. https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.111528

24. Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(24), 15524–15529. https://doi.org/10.1073/pnas.242606799

25. Peng, Y., & Croce, C. M. (2016). The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, *1*, 15004. https://doi.org/10.1038/sigtrans.2015.4

26. Rupaimoole, R., & Slack, F. J. (2017). MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature reviews. Drug discovery*, *16*(3), 203–222. https://doi.org/10.1038/nrd.2016.246

27. Ali Syeda, Z., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory Mechanism of MicroRNA Expression in Cancer. *International journal of molecular sciences*, *21*(5), 1723. https://doi.org/10.3390/ijms21051723

28. Lin, S., & Gregory, R. I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nature reviews. Cancer*, 15(6), 321–333. https://doi.org/10.1038/nrc3932

29. He, L., He, X., Lim, L. P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A. L., Linsley, P. S., Chen, C., Lowe, S. W., Cleary, M. A., & Hannon, G. J. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, *447*(7148), 1130–1134. https://doi.org/10.1038/nature05939

30. Concepcion, C. P., Bonetti, C., & Ventura, A. (2012). The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)*, *18*(3), 262–267. https://doi.org/10.1097/PPO.0b013e318258b60a

31. Han, H., Sun, D., Li, W., Shen, H., Zhu, Y., Li, C., Chen, Y., Lu, L., Li, W., Zhang, J., Tian, Y., & Li, Y. (2013). A c-Myc-MicroRNA functional feedback loop affects hepatocarcinogenesis. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *57*(6), 2378–2389. https://doi.org/10.1002/hep.26302

32. Moore, L. D., Le, T., & Fan, G. (2013). DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology : official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, *38*(1), 23–38. https://doi.org/10.1038/npp.2012.112

33. Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J. M., Chuang, J. C., Coetzee, G. A., & Jones, P. A. (2006). Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer cell*, *9*(6), 435–443. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.04.020

34. Song, S. J., Poliseno, L., Song, M. S., Ala, U., Webster, K., Ng, C., Beringer, G., Brikbak, N. J., Yuan, X., Cantley, L. C., Richardson, A. L., &Pandolfi, P. P. (2013). MicroRNA-antagonism regulates breast cancer stemness and metastasis via TET-family-dependent chromatin remodeling. *Cell*, *154*(2), 311–324. https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.026

35. Sampath, D., Liu, C., Vasan, K., Sulda, M., Puduvalli, V. K., Wierda, W. G., & Keating, M. J. (2012). Histone deacetylases mediate the silencing of miR-15a, miR-16, and miR-29b in chronic lymphocytic leukemia. *Blood,* 119(5), 1162–1172. https://doi.org/10.1182/blood-2011-05-351510

36. Lee, S. S., Min, H., Ha, J. Y., Kim, B. H., Choi, M. S., & Kim, S. (2019). Dysregulation of the miRNA biogenesis components DICER1, DROSHA, DGCR8 and AGO2 in clear cell renal cell carcinoma in both a Korean cohort and the cancer genome atlas kidney clear cell carcinoma cohort. *Oncology letters*, *18*(4), 4337–4345. https://doi.org/10.3892/ol.2019.10759

37. He, L., Thomson, J. M., Hemann, M. T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S. W., Hannon, G. J., & Hammond, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043), 828–833. https://doi.org/10.1038/nature03552

38.Olive, V., Jiang, I., & He, L. (2010). mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *The international journal of biochemistry & cell biology,* 42(8), 1348–1354. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2010.03.004

39.Di Leva, G., Gasparini, P., Piovan, C., Ngankeu, A., Garofalo, M., Taccioli, C., Iorio, M. V., Li, M., Volinia, S., Alder, H., Nakamura, T., Nuovo, G., Liu, Y., Nephew, K. P., &Croce, C. M. (2010). MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor alpha interactions in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *102*(10), 706–721. https://doi.org/10.1093/jnci/djq102

40.Adams, B. D., Furneaux, H., & White, B. A. (2007). The micro-ribonucleic acid (miRNA) miR-206 targets the human estrogen receptor-alpha (ERalpha) and represses ERalpha messenger RNA and protein expression in breast cancer cell lines. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.),* 21(5), 1132–1147. https://doi.org/10.1210/me.2007-0022

41.Hata, A., & Kashima, R. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis machinery in cancer. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology*, *51*(3), 121–134. https://doi.org/10.3109/10409238.2015.1117054

42. Rakheja, D., Chen, K. S., Liu, Y., Shukla, A. A., Schmid, V., Chang, T. C., Khokhar, S., Wickiser, J. E., Karandikar, N. J., Malter, J. S., Mendell, J. T., &Amatruda, J. F. (2014). Somatic mutations in DROSHA and DICER1 impair microRNA biogenesis through distinct mechanisms in Wilms tumours. *Nature communications*, 2, 4802. https://doi.org/10.1038/ncomms5802

43. Gurtner, A., Falcone, E., Garibaldi, F., &Piaggio, G. (2016). Dysregulation of microRNA biogenesis in cancer: the impact of mutant p53 on Drosha complex activity. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR,* 35, 45. https://doi.org/10.1186/s13046-016-0319-x

44. Jiang, F. Z., He, Y. Y., Wang, H. H., Zhang, H. L., Zhang, J., Yan, X. F., Wang, X. J., Che, Q., Ke, J. Q., Chen, Z., Tong, H., Zhang, Y. L., Wang, F. Y., Li, Y. R., & Wan, X. P. (2015). Mutant p53 induces EZH2 expression and promotes epithelial-mesenchymal transition by disrupting p68-Drosha complex assembly and attenuating miR-26a processing. *Oncotarget*, 6(42), 44660–44674. https://doi.org/10.18632/oncotarget.6350

45. Leaderer, D., Hoffman, A. E., Zheng, T., Fu, A., Weidhaas, J., Paranjape, T., & Zhu, Y. (2011). Genetic and epigenetic association studies suggest a role of microRNA biogenesis gene exportin-5 (XPO5) in breast tumorigenesis. *International journal of molecular epidemiology and genetics*, 2(1), 9–18.

46.Melo, S. A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G. A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A. F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., Yamamoto, H., Schwartz, S., Jr, &Esteller, M. (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer cell,* 18(4), 303–315. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2010.09.007

47. Cui, M., Wang, H., Yao, X., Zhang, D., Xie, Y., Cui, R., & Zhang, X. (2019). Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Frontiers in genetics*, *10*, 626. https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00626

48. Turchinovich, A., Weiz, L., &Burwinkel, B. (2012). Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends in biochemicalsciences*, *37*(11), 460–465. https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.08.003

49**.** Cheng G. (2015). Circulating miRNAs: roles in cancer diagnosis, prognosis and therapy. *Advanced drug delivery reviews*, *81*, 75–93. https://doi.org/10.1016/j.addr.2014.09.001

50. Ho, P. T. B., Clark, I. M., & Le, L. T. T. (2022). MicroRNA-Based Diagnosis and Therapy. *International journal of molecular sciences*, *23*(13), 7167. https://doi.org/10.3390/ijms23137167

51. Weber, J. A., Baxter, D. H., Zhang, S., Huang, D. Y., Huang, K. H., Lee, M. J., Galas, D. J., & Wang, K. (2010). The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clinical chemistry*, *56*(11), 1733–1741. https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.147405

52.Alečković, M., & Kang, Y. (2015). Regulation of cancer metastasis by cell-free miRNAs. *Biochimica et biophysica acta*, *1855*(1), 24–42. https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2014.10.005

53. Valihrach, L., Androvic, P., &Kubista, M. (2020). Circulating miRNA analysis for cancer diagnostics and therapy. *Molecular aspects of medicine*, *72*, 100825. https://doi.org/10.1016/j.mam.2019.10.002

54. Andersen, G. B., &Tost, J. (2020). Circulating miRNAs as Biomarker in Cancer. *Recent results in cancer research. Fortschritte der Krebsforschung. Progresdans les recherches sur le cancer*, *215*, 277–298. https://doi.org/10.1007/978-3-030-26439-0_15

55. Cancer.gov. (s. f.). Biomarcador. En *NCI Dictionary of Cancer Terms.* Recuperado el 22 de Julio de 2021 https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/biomarker

56. Mitchell, P. S., Parkin, R. K., Kroh, E. M., Fritz, B. R., Wyman, S. K., Pogosova-Agadjanyan, E. L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K. C., Allen, A., Lin, D. W., Urban, N., Drescher, C. W., Knudsen, B. S., Stirewalt, D. L., Gentleman, R., Vessella, R. L., Nelson, P. S., Martin, D. B., &Tewari, M. (2008). Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *105*(30), 10513–10518. https://doi.org/10.1073/pnas.0804549105

57. Jordan-Alejandre, E., Campos-Parra, A. D., Castro-López, D. L., & Silva-Cázares, M. B. (2023). Potential miRNA Use as a Biomarker: From Breast Cancer Diagnosis to Metastasis. *Cells*, *12*(4), 525. https://doi.org/10.3390/cells12040525

58. Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., &Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of biological chemistry*, 285(23), 17442–17452. https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821

59. Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suciu, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. *Cells*, *9*(2), 276. https://doi.org/10.3390/cells9020276

60. Felekkis, K., Pieri, M., & Papaneophytou, C. (2023). Exploring the Feasibility of Circulating miRNAs as Diagnostic and Prognostic Biomarkers in Osteoarthritis: Challenges and Opportunities. *International journal of molecular sciences*, *24*(17), 13144. https://doi.org/10.3390/ijms241713144

61. He, B., Zhao, Z., Cai, Q., Zhang, Y., Zhang, P., Shi, S., Xie, H., Peng, X., Yin, W., Tao, Y., & Wang, X. (2020). miRNA-based biomarkers, therapies, and resistance in Cancer. *International journal of biological sciences*, *16*(14), 2628–2647. https://doi.org/10.7150/ijbs.47203

62. Song, M. Y., Pan, K. F., Su, H. J., Zhang, L., Ma, J. L., Li, J. Y., Yuasa, Y., Kang, D., Kim, Y. S., & You, W. C. (2012). Identification of serum microRNAs as novel non-invasive biomarkers for early detection of gastric cancer. *PloS one*, *7*(3), e33608. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0033608

63. Li, C., Ni, Y. Q., Xu, H., Xiang, Q. Y., Zhao, Y., Zhan, J. K., He, J. Y., Li, S., & Liu, Y. S. (2021). Roles and mechanisms of exosomal non-coding RNAs in human health and diseases. *Signal transduction and targeted therapy*, *6*(1), 383. https://doi.org/10.1038/s41392-021-00779-x

64. Simonson, B., & Das, S. (2015). MicroRNA Therapeutics: the Next Magic Bullet?. *Mini reviews in medicinal chemistry*, *15*(6), 467–474. https://doi.org/10.2174/1389557515666150324123208

65. Szczepanek, J., Skorupa, M., & Tretyn, A. (2022). MicroRNA as a Potential Therapeutic Molecule in Cancer. *Cells*, *11*(6), 1008. https://doi.org/10.3390/cells11061008

66. Bajan, S., & Hutvagner, G. (2020). RNA-Based Therapeutics: From Antisense Oligonucleotides to miRNAs. *Cells*, 9(1), 137. https://doi.org/10.3390/cells9010137

67. Rossor, A. M., Reilly, M. M., & Sleigh, J. N. (2018). Antisense oligonucleotides and other genetic therapies made simple. *Practical neurology*, 18(2), 126–131. https://doi.org/10.1136/practneurol-2017-001764

68. Dhuri, K., Bechtold, C., Quijano, E., Pham, H., Gupta, A., Vikram, A., & Bahal, R. (2020). Antisense Oligonucleotides: An Emerging Area in Drug Discovery and Development. *Journal of clinical medicine*, 9(6), 2004. https://doi.org/10.3390/jcm9062004

69. Lennox, K. A., Vakulskas, C. A., & Behlke, M. A. (2017). Non-nucleotide Modification of Anti-miRNA Oligonucleotides. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.*), 1517, 51–69. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6563-2_3

70. Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., & Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by antimiR oligonucleotides. *Silence*, *3*(1), 1. https://doi.org/10.1186/1758-907X-3-1

71. Juliano R. L. (2016). The delivery of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic acids research*, 44(14), 6518–6548. https://doi.org/10.1093/nar/gkw236

72. Eckstein F. (2014). Phosphorothioates, essential components of therapeutic oligonucleotides. *Nucleic acid therapeutics*, *24*(6), 374–387. https://doi.org/10.1089/nat.2014.0506

73. Davis, S., Lollo, B., Freier, S., & Esau, C. (2006). Improved targeting of miRNA with antisense oligonucleotides. *Nucleic acids research*, *34*(8), 2294–2304. https://doi.org/10.1093/nar/gkl183

74. Shen, W., De Hoyos, C. L., Sun, H., Vickers, T. A., Liang, X. H., & Crooke, S. T. (2018). Acute hepatotoxicity of 2' fluoro-modified 5-10-5 gapmer phosphorothioate oligonucleotides in mice correlates with intracellular protein binding and the loss of DBHS proteins. *Nucleic acids research*, *46*(5), 2204–2217. https://doi.org/10.1093/nar/gky060

75. Hagedorn, P. H., Persson, R., Funder, E. D., Albæk, N., Diemer, S. L., Hansen, D. J., Møller, M. R., Papargyri, N., Christiansen, H., Hansen, B. R., Hansen, H. F., Jensen, M. A., & Koch, T. (2018). Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug discovery today*, *23*(1), 101–114. https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.09.018

76. Wen, D., Danquah, M., Chaudhary, A. K., & Mahato, R. I. (2015). Small molecules targeting microRNA for cancer therapy: Promises and obstacles. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, *219*, 237–247. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.011

77. Watashi, K., Yeung, M. L., Starost, M. F., Hosmane, R. S., & Jeang, K. T. (2010). Identification of small molecules that suppress microRNA function and reverse tumorigenesis. *The Journal of biological chemistry*, *285*(32), 24707–24716. https://doi.org/10.1074/jbc.M109.062976

78. Tadesse, K., & Benhamou, R. I. (2024). Targeting MicroRNAs with Small Molecules. *Non-coding RNA*, *10*(2), 17. https://doi.org/10.3390/ncrna10020017

79. Gumireddy, K., Young, D. D., Xiong, X., Hogenesch, J. B., Huang, Q., & Deiters, A. (2008). Small-molecule inhibitors of microrna miR-21 function. *Angewandte Chemie (International ed. in English),* 47(39), 7482–7484. https://doi.org/10.1002/anie.200801555

80. Velagapudi, S. P., & Disney, M. D. (2014). Two-dimensional combinatorial screening enables the bottom-up design of a microRNA-10b inhibitor. *Chemical communications (Cambridge, England),* 50(23), 3027–3029. https://doi.org/10.1039/c3cc00173c

81. Ebert, M. S., & Sharp, P. A. (2010). MicroRNA sponges: progress and possibilities. *RNA (New York, N.Y.)*, *16*(11), 2043–2050. https://doi.org/10.1261/rna.2414110

82. Kluiver, J., Gibcus, J. H., Hettinga, C., Adema, A., Richter, M. K., Halsema, N., Slezak-Prochazka, I., Ding, Y., Kroesen, B. J., & van den Berg, A. (2012). Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PloS one*, *7*(1), e29275. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029275

83. Summerton, J., & Weller, D. (1997). Morpholino antisense oligomers: design, preparation, and properties. *Antisense & nucleic acid drug development*, *7*(3), 187–195. https://doi.org/10.1089/oli.1.1997.7.187

84. Bader, A. G., Brown, D., & Winkler, M. (2010). The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer research,* 70(18), 7027–7030. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-2010

85. Barger, J. F., & Nana-Sinkam, S. P. (2015). MicroRNA as tools and therapeutics in lung cancer. *Respiratory medicine*, 109(7), 803–812. https://doi.org/10.1016/j.rmed.2015.02.006

86. Søkilde, R., Newie, I., Persson, H., Borg, Å., & Rovira, C. (2015). Passenger strand loading in overexpression experiments using microRNA mimics. *RNA biology*, *12*(8), 787–791. https://doi.org/10.1080/15476286.2015.1020270

87. Zhu, X., Xu, Y., Solis, L. M., Tao, W., Wang, L., Behrens, C., Xu, X., Zhao, L., Liu, D., Wu, J., Zhang, N., Wistuba, I. I., Farokhzad, O. C., Zetter, B. R., & Shi, J. (2015). Long-circulating siRNA nanoparticles for validating Prohibitin1-targeted non-small cell lung cancer treatment. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 112(25), 7779–7784. https://doi.org/10.1073/pnas.1505629112

88. Nayerossadat, N., Maedeh, T., & Ali, P. A. (2012). Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. *Advanced biomedical research*, *1*, 27. https://doi.org/10.4103/2277-9175.98152

89. Dammes, N., Goldsmith, M., Ramishetti, S., Dearling, J. L. J., Veiga, N., Packard, A. B., & Peer, D. (2021). Conformation-sensitive targeting of lipid nanoparticles for RNA therapeutics. *Nature nanotechnology*, *16*(9), 1030–1038. https://doi.org/10.1038/s41565-021-00928-x

90. Yan, Y., Liu, X. Y., Lu, A., Wang, X. Y., Jiang, L. X., & Wang, J. C. (2022). Non-viral vectors for RNA delivery. *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*, *342*, 241–279. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.01.008

91. Whitehead, K. A., Langer, R., & Anderson, D. G. (2009). Knocking down barriers: advances in siRNA delivery. Nature reviews. Drug discovery, 8(2), 129–138. https://doi.org/10.1038/nrd2742

92. Karlsson, J., Rhodes, K. R., Green, J. J., & Tzeng, S. Y. (2020). Poly(beta-amino ester)s as gene delivery vehicles: challenges and opportunities. *Expert opinion on drug delivery*, *17*(10), 1395–1410. https://doi.org/10.1080/17425247.2020.1796628

93. Hines, D. J., & Kaplan, D. L. (2013). Poly(lactic-co-glycolic) acid-controlled-release systems: experimental and modeling insights. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*, *30*(3), 257–276. https://doi.org/10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.2013006475

94. Sivadasan, D., Sultan, M. H., Madkhali, O., Almoshari, Y., & Thangavel, N. (2021). Polymeric Lipid Hybrid Nanoparticles (PLNs) as Emerging Drug Delivery Platform-A Comprehensive Review of Their Properties, Preparation Methods, and Therapeutic Applications. *Pharmaceutics*, *13*(8), 1291. https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081291

95. Lindow, M., & Kauppinen, S. (2012). Discovering the first microRNA-targeted drug. *The Journal of cell biology*, *199*(3), 407–412. https://doi.org/10.1083/jcb.201208082

96. Gebert, L. F., Rebhan, M. A., Crivelli, S. E., Denzler, R., Stoffel, M., & Hall, J. (2014). Miravirsen (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. *Nucleic acids research*, *42*(1), 609–621. https://doi.org/10.1093/nar/gkt852

97. van der Ree, M. H., van der Meer, A. J., van Nuenen, A. C., de Bruijne, J., Ottosen, S., Janssen, H. L., Kootstra, N. A., & Reesink, H. W. (2016). Miravirsen dosing in chronic hepatitis C patients results in decreased microRNA-122 levels without affecting other microRNAs in plasma. *Alimentary pharmacology & therapeutics*, *43*(1), 102–113. https://doi.org/10.1111/apt.13432

98. Seyhan A. A. (2024). Trials and Tribulations of MicroRNA Therapeutics. *International journal of molecular sciences*, *25*(3), 1469. https://doi.org/10.3390/ijms25031469

99. Anastasiadou, E., Seto, A. G., Beatty, X., Hermreck, M., Gilles, M. E., Stroopinsky, D., Pinter-Brown, L. C., Pestano, L., Marchese, C., Avigan, D., Trivedi, P., Escolar, D. M., Jackson, A. L., & Slack, F. J. (2021). Cobomarsen, an Oligonucleotide Inhibitor of miR-155, Slows DLBCL Tumor Cell Growth *In Vitro* and *In Vivo*. *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research*, *27*(4), 1139–1149. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-20-3139

100. Fu, J., Imani, S., Wu, M. Y., & Wu, R. C. (2023). MicroRNA-34 Family in Cancers: Role, Mechanism, and Therapeutic Potential. *Cancers*, 15(19), 4723. https://doi.org/10.3390/cancers15194723

101. Hong, D. S., Kang, Y. K., Borad, M., Sachdev, J., Ejadi, S., Lim, H. Y., Brenner, A. J., Park, K., Lee, J. L., Kim, T. Y., Shin, S., Becerra, C. R., Falchook, G., Stoudemire, J., Martin, D., Kelnar, K., Peltier, H., Bonato, V., Bader, A. G., Smith, S., … Beg, M. S. (2020). Phase 1 study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, in patients with advanced solid tumours. *British journal of cancer*, *122*(11), 1630–1637. https://doi.org/10.1038/s41416-020-0802-1

102. Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Abdullah, S. T., Taheri, M., & Samadian, M. (2022). A review on the role of mir-16-5p in the carcinogenesis. *Cancer cell international*, *22*(1), 342. https://doi.org/10.1186/s12935-022-02754-0

103. Viteri, S., & Rosell, R. (2018). An innovative mesothelioma treatment based on miR-16 mimic loaded EGFR targeted minicells (TargomiRs). *Translational lung cancer research*, *7*(Suppl 1), S1–S4. https://doi.org/10.21037/tlcr.2017.12.01

104. MacDiarmid, J. A., & Brahmbhatt, H. (2011). Minicells: versatile vectors for targeted drug or si/shRNA cancer therapy. *Current opinion in biotechnology*, *22*(6), 909–916. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.04.008

105. van Zandwijk, N., Pavlakis, N., Kao, S. C., Linton, A., Boyer, M. J., Clarke, S., Huynh, Y., Chrzanowska, A., Fulham, M. J., Bailey, D. L., Cooper, W. A., Kritharides, L., Ridley, L., Pattison, S. T., MacDiarmid, J., Brahmbhatt, H., & Reid, G. (2017). Safety and activity of microRNA-loaded minicells in patients with recurrent malignant pleural mesothelioma: a first-in-man, phase 1, open-label, dose-escalation study. *The Lancet. Oncology*, *18*(10), 1386–1396. https://doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30621-6

106. Xiao, J., Lin, H., Luo, X., Luo, X., & Wang, Z. (2011). miR-605 joins p53 network to form a p53:miR-605:Mdm2 positive feedback loop in response to stress. *The EMBO journal*, *30*(3), 524–532. https://doi.org/10.1038/emboj.2010.347

107. Zhang, Y., Liao, J. M., Zeng, S. X., & Lu, H. (2011). p53 downregulates Down syndrome-associated DYRK1A through miR-1246. *EMBO reports*, *12*(8), 811–817. https://doi.org/10.1038/embor.2011.98

108. Yamakuchi, M., Lotterman, C. D., Bao, C., Hruban, R. H., Karim, B., Mendell, J. T., Huso, D., & Lowenstein, C. J. (2010). P53-induced microRNA-107 inhibits HIF-1 and tumor angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(14), 6334–6339. https://doi.org/10.1073/pnas.0911082107