



**REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA SOBRE EL  
SIGNIFICADO CLÍNICO Y FUNCIONAL DEL  
microARN-199b EN CÁNCER HUMANO**

**Sofía Mariblanca Cesteros**

**TRABAJO DE FIN DE GRADO DE BIOTECNOLOGÍA**

Tutor académico: Cristina Reguant Miranda, Biotecnología, [cristina.reguant@urv.cat](mailto:cristina.reguant@urv.cat)

Supervisor: Ion Cristobal Yoldi, Grupo de investigación oncológica,  
[ion.cristobal@quirónsalud.es](mailto:ion.cristobal@quirónsalud.es)

Jo, Sofía Mariblanca Cesteros, amb DNI 03201054-Y, sóc coneixedor de la guia de prevenció del plagi a la URV Prevenció, detecció i tractament del plagi en la docència: guia per a estudiants (aprovada el juliol 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) i afirmo que aquest TFG no constitueix cap de les conductes considerades com a plagi per la URV.

Tarragona 10 de Julio de 2020.

Firma

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Sofía', with a large, stylized flourish that loops around the name.

## ÍNDICE:

RESUMEN.....	4
1-INTRODUCCIÓN.....	5
2-VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y DIANAS MOLECULARES REGULADAS POR EL miR-199b.....	8
2.1-Vía de señalización Notch .....	8
2.2-Vías PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2 .....	11
2.2.1-Vía PI3K/Akt .....	11
2.2.2-Vía MAPK/ERK1/2 .....	14
2.3-Otras dianas moleculares.....	15
2.3.1-Factor inducible de hipoxia.....	15
2.3.2-Proteína homeodominio de dedo de Zinc .....	17
2.3.3-Ciclina 1 .....	17
2.3.4-Receptor de discoidina 1.....	17
2.3.5-SET.....	18
2.3.6-Sirtuina 1 .....	19
2.3.7-Stonina 2 .....	20
3-VALOR CLÍNICO DEL miR-199b COMO BIOMARCADOR .....	23
3.1-Carcinoma de células renales .....	23
3.2-Carcinoma endometrial .....	23
3.3-Cáncer de ovario .....	24
3.4-Cáncer de mama .....	24
3.5-Carcinoma hepatocelular.....	24
3.6-Cáncer colorrectal .....	25
3.7-Carcinoma escamoso de cabeza y cuello.....	25
3.8-Leucemia mieloide aguda .....	25
3.9-Cáncer de pulmón de células no pequeñas .....	25
3.10-Meduloblastoma.....	26
3.11-Osteosarcoma .....	26
3.12-Carcinoma papilar de tiroides.....	26
3.13-Tumor paratiroides .....	27
3.14-Cáncer rectal localmente avanzado.....	27
4-CONCLUSIÓN.....	30
5-AUTOEVALUACIÓN.....	31
6-BIBLIOGRAFÍA.....	32

**RESUMEN:**

Los microARNs (miARNs) son un tipo de ARNs no codificantes capaces de regular la expresión génica a nivel post-transcripcional. Numerosos estudios sugieren que regulan hasta un tercio de los genes que codifican para proteínas. Durante estos últimos años, se ha estudiado mucho el papel de estos miARNs en diversos tipos de cánceres en los que se ha observado que actúan como oncogenes o supresores tumorales. Por tanto, estos miARNs se asocian con la progresión tumoral, la metástasis y el desarrollo de quimiorresistencia. Además, la identificación de cambios en los perfiles de expresión de los miARNs en el cáncer los convierte en unos potenciales biomarcadores para la detección temprana y el pronóstico de la enfermedad así como la predicción de los tratamientos. En esta revisión, nos centraremos en el papel del miR-199b y sus dianas moleculares, además de su implicación en procesos como la proliferación celular, migración y apoptosis en los distintos tipos de cánceres. También se hará referencia al potencial del miR-199b como biomarcador clínico de pronóstico, diagnóstico y predictivo en el cáncer.

*Palabras clave: miARN, miR-199b, cáncer, dianas moleculares, biomarcador.*

## **1-INTRODUCCIÓN**

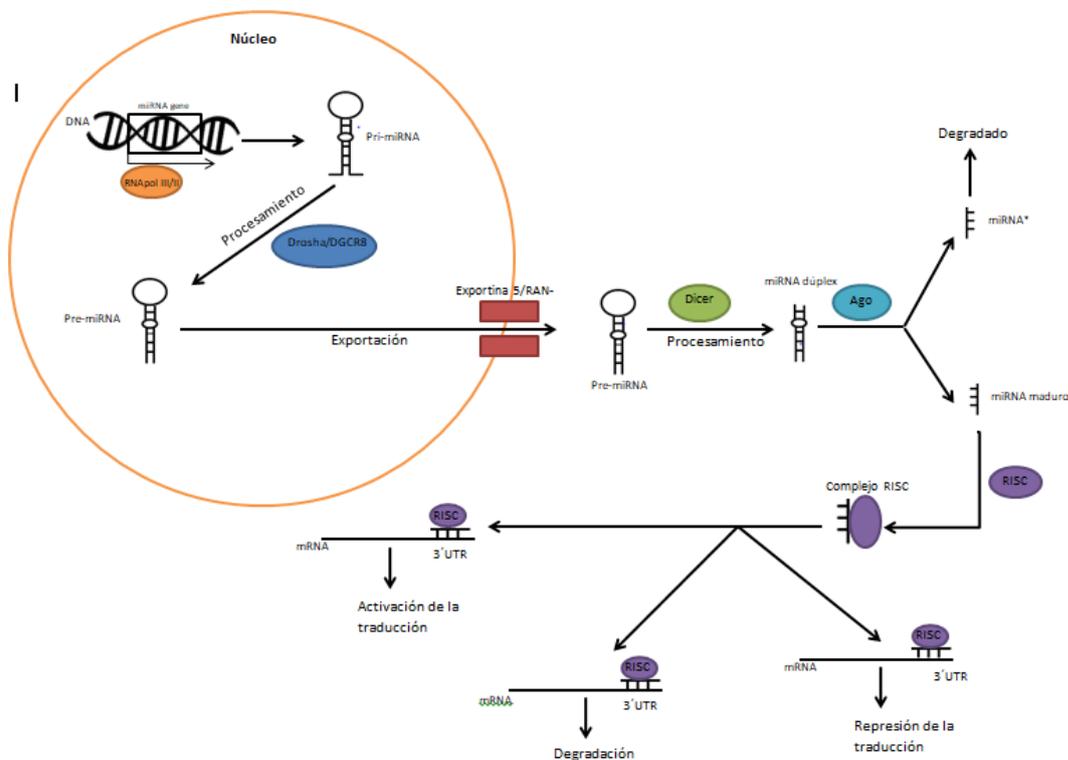
El cáncer representa actualmente una de las principales causas de muerte a nivel global. Se estima que en el año 2018 provocó 9,6 millones de fallecimientos. De entre todos los cánceres, el de pulmón fue el que mayor mortalidad presentó (18,4% del total de defunciones) seguido por el colorrectal (9,2%), el de estómago (8,2%) y el de hígado (8,2%) (1). El número de diagnósticos aumenta cada año debido al envejecimiento de la población y a cambios en el estilo de vida que incluyen tabaco, sobrepeso y nuevos patrones reproductivos, los cuales son reconocidos factores de riesgo (2). En 2018, se registraron 18,1 millones de nuevos casos, siendo el cáncer de pulmón el tumor con mayor incidencia (11,6% del total de casos), seguido por el de mama (11,6%), el de próstata (7,1%) y el colorrectal (6,1%) (1).

El cáncer tiene su origen en una acumulación progresiva de alteraciones moleculares que alteran la homeóstasis celular y conducen a una desregulación de las principales funciones de la célula normal. Suele definirse como una masa de células que crece de forma descontrolada, pero es mucho más que eso, se trata de un tejido complejo formado por una gran cantidad de células de distintos tipos que interactúan entre sí de forma heterotípica. En el proceso de la carcinogénesis, la transformación de las células normales en cancerígenas tiene lugar gracias a diferentes capacidades que las células van adquiriendo a medida que el tumor se desarrolla. Estas capacidades son: evitar señales supresoras de crecimiento, señalización proliferativa constante, evasión de la muerte celular, inducción de la angiogénesis, invasión, reprogramación celular del metabolismo energético, evasión del sistema inmune y metástasis. La adquisición de estas características es posible gracias a la inestabilidad genética de las células cancerígenas, que causa mutaciones y reordenamientos cromosómicos, además del estado de inflamación (3). Por lo tanto el concepto de cáncer engloba a un conjunto de enfermedades cada una de ellas provocadas por distintas causas y con sus propias particularidades (4).

Los microARNs (miARNs) son un tipo de ARN no codificante. Están formados por una cadena simple de ARN de unos 16-29 nucleótidos y juegan un papel importante en la regulación génica. Se estima que modulan la expresión de un tercio de los genes que codifican proteínas mediante el reconocimiento e inhibición específica de ARN mensajeros (ARNm) (5) (6).

La síntesis de estos miARNs comienza en el núcleo, donde se encuentran los genes que los codifican. Si estos se localizan en una región intergénica, suelen tener su propio promotor. Sin embargo, si están ubicados en un intrón o en una región no traducida (UTR) de un gen que codifica para una proteína, comparten promotor con el gen huésped. Normalmente la transcripción de estos genes a miARN primario (pri-miARN) es llevada a cabo por la polimerasa II (Pol II) y en raras ocasiones por la polimerasa III (Pol III). El pri-miARN es procesado por el complejo microprocesador constituido por la Ribonucleasa III Drosha (DROSHA) y la región crítica 8 de síndrome DiGeorge (DGCR8) dando lugar a un precursor miARN (pre-miARN) formado por unos 70 nucleótidos con estructura de horquilla. El pre-miARN es transportado del núcleo al citoplasma mediante el complejo Exportina 5-Ran-GTP. Una vez allí, el pre-miARN es procesado por la ribonucleasa Dicer, que escinde el pre-miARN dando lugar a una doble cadena de ARN de aproximadamente unos 21 nucleótidos. El dúplex de ARN

está constituido por la cadena de miARN maduro y su complementaria (miARN\*). La cadena de miARN maduro se une a la familia de proteínas argonata (AGO), normalmente Ago2, y recluta el complejo de inducción de silenciamiento del ARN (RISC). La cadena miARN\* en ocasiones es degradada, pero también se han descrito una gran cantidad de trabajos científicos que asignan funciones reguladoras importantes para estos miARN\*. Para diferenciar qué cadena es incorporada en este complejo, la del extremo 5' de la horquilla se denomina "5p" y la del extremo 3' "3p". El silenciamiento tiene lugar cuando la región "semilla" del miARN se une a la región 3'UTR de un ARNm determinado mediante complementariedad de bases. Si la secuencia "semilla" se encuentra en la parte central del miARN, el silenciamiento tendrá lugar mediante la degradación del ARNm por parte de la endonucleasa AGO2. Si no es así, el silenciamiento se producirá por la degradación y la represión de la traducción mediante los complejos TNRC6A/B/C y CCR4-NOT (5) (6). (Figura 1)



*Figura 1: Mecanismo de la biogénesis de miARNs en células de mamíferos: En el núcleo, los miARNs son transcritos por la polimerasa II o III. DROSHA corta el pri-miARN dando lugar al pre-miARN. El pre-miARN mediante el complejo Exportina5-Ran-GTP es exportado al citoplasma. Dicer en el citoplasma procesa el pre-miARN y forma un dúplex de ARN. El miARN maduro se une al complejo RISC gracias al cual reconoce al ARNm objetivo. La unión entre el miARN y el ARNm, resulta en la degradación del ARNm o la represión de la traducción (5) (6).*

Los miARNs están implicados en una gran cantidad de procesos biológicos fundamentales, por tanto, la desregulación de sus patrones de expresión se ha visto implicada en el desarrollo de numerosas enfermedades como diabetes, infecciones virales, enfermedades metabólicas y cáncer (5). Se han llevado a cabo numerosos estudios en los que se observa una desregulación de los miARNs en las células tumorales. En el proceso de la carcinogénesis y desarrollo tumoral, los miARNs pueden actuar como oncogenes (oncomiRs) o supresores de tumores. Incluso, en

algunos casos pueden tener una función dual según el tejido en el que se expresen (7). Los oncomiRs suelen estar sobre-expresados en el cáncer debido a que reprimen la expresión de los transcritos de genes supresores de tumores asociados con la homeostasis celular como la regulación del ciclo celular, proliferación, migración, resistencia a la quimioterapia, angiogénesis y apoptosis. Por el contrario, los miARNs supresores de tumores en los cánceres suelen presentar unos niveles de expresión inferiores a lo normal, y en consecuencia los oncogenes que éstos regulan tendrán unos mayores niveles de expresión (5) (8). Por ejemplo, los miembros de la familia let-7, son unos de los miARN supresores de tumores más estudiados y que en la mayoría de cánceres están poco expresados, lo cual provoca la sobre-expresión de los oncogenes que regulan (*HMGA2*, *MYC*, *RAS*, *ITGB3* y *IMP-1*). Por el contrario, el miR-21, que actúa como un oncogén, está sobre-expresado en muchos tipos de cánceres en los que silencia la expresión de supresores de tumores como la fosfatasa 2A, tropomiosina1 y el homólogo de tensina (9). Otros ejemplos son el *cluster* miR-17-92 que regula c-MYC en muchos tumores (10) y la familia miR-34 que activa el supresor tumoral p53 parando el ciclo celular y provocando apoptosis. Por otro lado, miembros de las familias de los miR-181 y miR-155, en el cáncer de mama, actúan como oncogenes estimulando la autorrenovación de las células y el desarrollo del tumor, en cambio el miR-200 en este tipo de cáncer al sobre-expresarse, suprime la tumorigénesis (9). (Tabla 1)

Tabla 1: miARN más frecuentes involucrados en el desarrollo tumoral (Ajustado de la referencia 11)

<b>Función</b>	<b>miARN</b>
Señales de proliferación constantes	miR-21, familia let-7, miR-7
Insensibilidad a señales que inhiben el crecimiento celular	MiR-25, miR-195, miR-17-92
Evasión de receptores de crecimiento	<i>Cluster</i> miR-17-92
Resistencia a la muerte celular	miR15/16, <i>cluster</i> miR-34, let-7
Inmortalidad celular	miR-34a, <i>cluster</i> miR-372/373, miR-21, miR-221/222, miR-16, familia let-7
Inducción de angiogénesis	miR-210, miR-125, miR-156, miR-155
Activación de la invasión y la metástasis	miR-10b, familia miR-200, miR-21, miR-15b
Evasión de la destrucción inmune	miR-520d, miR-124, miR-155, miR-17-19
Desregulación génica	miR-122, miR-210, miR-23a/b, miR-15b
Inflamación tumoral	miR-146, miR-155, miR-23b, let-7d
Inestabilidad genómica	miR-155, miR-21, miR-15b

El microARN-199b (miR-199b) es un miARN intragénico de 110 nucleótidos codificado en la cadena opuesta a la región intrónica de 2.2kb que se encuentra entre el exón 14 y 15 del gen de la Dinamina 1 (*DNM1*), localizado en el cromosoma 9 (9q34.11) (12). Pertenece a la familia de los miR-199, compuesta por 2 miembros, el miR-199a y el miR-199b. Ambos miARNs pueden presentarse en dos formas maduras distintas: miR-199a-5p o miR-199a-3p y miR-199b-5p o miR-199b-3p respectivamente (13).

El miR-199b suele presentar bajos niveles de expresión en tumores humanos como el cáncer de ovario (14), la leucemia mieloide (15), el meduloblastoma (16), el cáncer de pecho (17), el carcinoma hepatocelular (18), el cáncer colorrectal (19) y el cáncer de

pulmón (20). Durante el proceso del desarrollo tumoral, muchos estudios asocian este miARN con una disminución de la proliferación, migración, capacidad de invasión, metástasis y aumento de la apoptosis; indicando su papel como supresor tumoral (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20). A pesar de esto, también se ha observado la sobreexpresión del miR-199b en algunos tumores como en los paratiroides (21) y el osteosarcoma (22) en los que se asocia con un aumento de la proliferación, migración y metástasis. Por lo tanto, en función del tipo de cáncer actuará como un oncogén o un supresor tumoral. Además, mediante su interacción con distintas vías de señalización y genes implicados en funciones críticas como HER2, DDR1 (17), SET (19), HIF1 $\alpha$  (21), K-RAS (20) y Notch (16) entre otros, regulará distintas funciones biológicas que influirán en el proceso de la carcinogénesis.

Durante los últimos años se ha estado investigando mucho el potencial de los miARNs como biomarcadores (23) debido a la falta de métodos de identificación efectivos capaces de llevar a cabo un diagnóstico temprano de la enfermedad, determinación del estado del tumor y la progresión de éste. Las alteraciones en los niveles de expresión del miR-199b en los distintos cánceres, hacen que tenga un gran potencial como biomarcador de diagnóstico, pronóstico y predictivo. La baja expresión del miR-199b en tumores como meduloblastoma (16), osteosarcoma (22), cáncer de mama (17) y leucemia mieloide (12) se relaciona con una menor supervivencia y un pobre pronóstico. Los diferentes niveles de expresión del miR-199b en el cáncer de paratiroides permiten diferenciar entre nódulos benignos (baja expresión del miARN) y cáncer papilar paratiroides (alta expresión del miARN) (21), así como la baja expresión del miR-199b en el cáncer de ovario se asocia con la resistencia a tratamientos con cisplatino (14).

En esta revisión, nos centraremos en el miARN-199b. Llevaremos a cabo una recopilación de las dianas moleculares y las vías de señalización que regula, así como de su potencial y valor clínico como biomarcador.

## **2-VÍAS DE SEÑALIZACIÓN Y DIANAS MOLECULARES REGULADAS POR EL miR-199b** (Tabla 2)

### **2.1-Vía de señalización Notch**

La vía de señalización Notch permite la comunicación entre células vecinas durante el desarrollo del organismo y la homeostasis de tejidos adultos. Tiene lugar en numerosos tejidos distintos en los que está implicada en una gran cantidad de procesos biológicos fundamentales. Es por esto que en función del contexto celular en el que se produzca, induce o suprime la proliferación, muerte y diferenciación celular. En condiciones normales la vía se activa cuando el receptor Notch maduro heterodimérico localizado en la superficie celular se une al ligando de la célula vecina. El receptor maduro se forma en el aparato de Golgi, donde la enzima PC5/furina corta el péptido Notch por el sitio 1 (S1). Tras la unión al ligando la metaloproteasa ADAM lleva a cabo una rotura proteolítica del receptor Notch por el sitio 2 (S2), generando el fragmento Notch extracelular truncado anclado a la membrana (NEXT) que actúa de sustrato de la  $\gamma$ -Secretase. El dominio transmembranal de NEXT es cortado por la  $\gamma$ -Secretase por los sitios 3 y 4 (S3) (S4), liberando el péptido N $\beta$  y el dominio intracelular Notch (NICD) que entra al núcleo. En el núcleo la proteína de unión al ADN

CSL se encuentra asociada a la proteína correpresora (Co-R) y a histonas deacetilasas (HDACs), inhibiendo la transcripción de los genes diana. NICD se une a CSL liberándolo de los represores y activando la transcripción (24).

Los genes diana de esta vía cambian en función del tejido y el tipo celular, lo que desemboca en una gran variedad de respuestas. Algunos genes diana son: las familias de *HES*, *HEY*, *MMP-2*, *MMP-9*, *cyclin D1*, *Her2*, *c-Myc*, *p21* y genes relacionados con la apoptosis celular (25). Además, la vía de Notch interacciona con otras vías de señalización como Wnt, Akt, *Sonic hedgehog* y BMP/TGF entre otras, ampliando aún más sus efectos y respuestas (25) (26). Por tanto, alteraciones de la vía Notch por mutaciones o regulaciones atípicas de alguno de sus componentes, pueden provocar el desarrollo de un gran número de enfermedades como el síndrome de Alalige, disostosis espondilocostal, hipertensión arterial pulmonar, CADASIL y cáncer. En una gran cantidad de tumores se han encontrado mutaciones y mecanismos de regulación aberrantes en la vía Notch que la hiper o hipoactivan pudiendo provocar la aparición de un tumor. En leucemias como la linfoblástica de células T y la linfocítica crónica, se han identificado mutaciones activadoras en el gen *NOTCH1* y en el cáncer de pecho, la sobre-expresión de *JAGGED1* (*JAG1*) y *NOTCH*, favorece la transición de las células de epiteliales a mesenquimales (EMT) (26). (Figura 2)

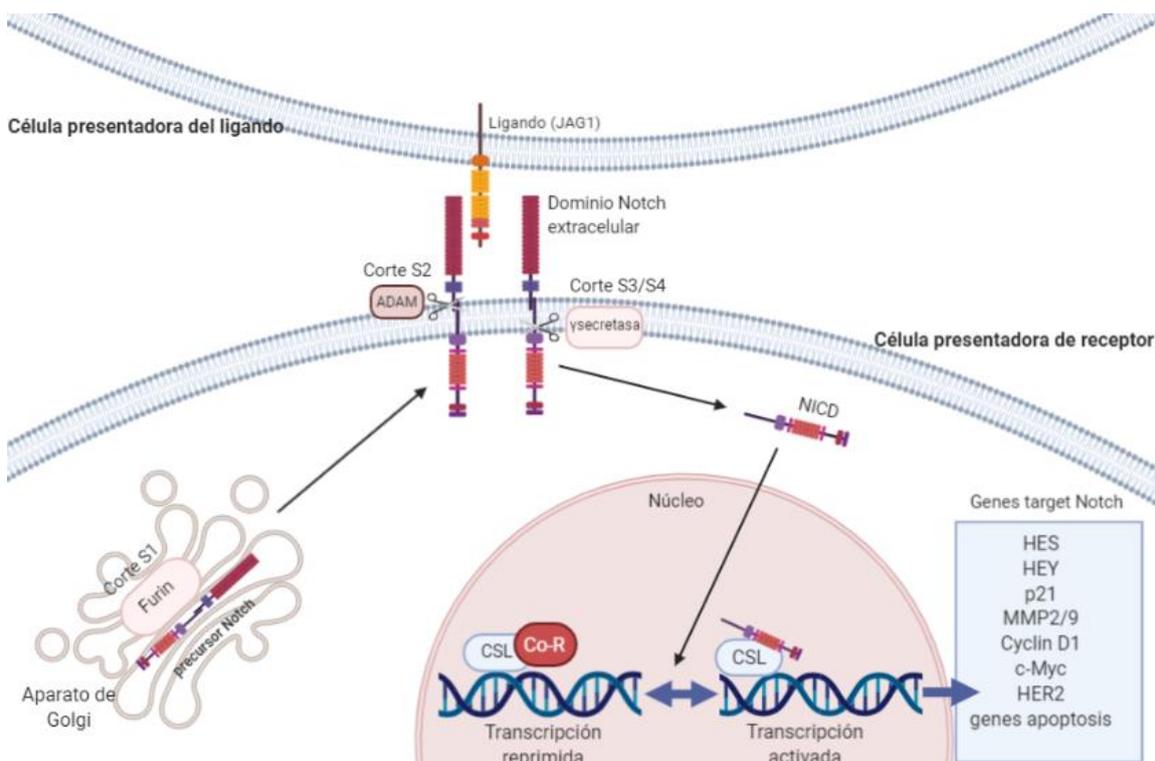


Figura 2. Vía de señalización Notch: En el aparato de Golgi la PC5/furina corta el precursor del receptor Notch por el sitio 1 (S1) y forma el receptor Notch maduro heterodimérico. Los receptores de Notch, en la membrana se unen al ligando de la célula vecina. Tras la unión, una proteína de la familia ADAM corta el receptor por el sitio 2(S2) dando lugar al fragmento Notch extracelular truncado anclado a la membrana (NEXT). La  $\gamma$ -secretasa corta el dominio transmembranal de NEXT por el sitio 3 y 4 (S3) (S4) y forma el dominio intracelular de Notch (NICD). NICD se transporta al núcleo donde se une a CSL activando la transcripción de los genes diana (24).

Se han llevado a cabo muchos estudios en los que se relaciona la vía de Notch con los niveles de expresión del miR-199b y el cáncer. Por ejemplo, en el cáncer de ovario, la adquisición de quimiorresistencia al cisplatino se asocia con la activación mediada por JAG1 de la vía de señalización Notch como consecuencia del silenciamiento epigenético del miR-199b durante el desarrollo tumoral. JAG1 es un ligando de los receptores Notch y una diana del miR-199b. Para determinar la relación entre JAG1 y el miR-199b, se llevó a cabo un análisis de la expresión de ambos en las líneas celulares de cáncer de ovario resistentes al cisplatino C13\* y SKOV3. Los resultados mostraron una sobre-expresión de JAG1 inversamente correlacionada con una baja expresión del miR-199b respecto a las líneas celulares sensibles al cisplatino OV2008 y A2780s. Estos resultados fueron confirmados mediante una hibridación *in situ* en un *array* comercial de tejido de cáncer de ovario. La reducción de la expresión del miR-199b durante el desarrollo tumoral se debe a la hipermetilación de su promotor que provoca su silenciamiento epigenético. Esto sucede de forma progresiva y aumenta paralelamente al estado del tumor, resultando un aumento de la expresión de su diana JAG1 que inicia la cascada de señalización Notch. Esta vía activa oncogenes como *HES1*, *c-Myc* y *HEY* que inducen el desarrollo de quimiorresistencia adquirida al cisplatino y el aumento de la proliferación en las células C13\* y SKOV3. Además, un estudio (14) demostró que la sobre-expresión forzada del miR-199b mediante la transfección de un plásmido en células quimiorresistentes (A2780cp, C13\*, SKOV3, ES-2 y OVCA433) no sólo las sensibilizó al cisplatino, sino que también disminuyó el crecimiento celular tanto *in vivo* como *in vitro* evidenciando el rol de supresor tumoral del miARN en el cáncer de ovario (14).

En el meduloblastoma (MB) la vía de Notch está desregulada debido a la elevada expresión de *HES1*, uno de sus factores de transcripción. Esto provoca un aumento del crecimiento celular, el crecimiento libre de anclaje y del número de células madre cancerígenas (CSC). El miR-199b es capaz de unirse al extremo 3'UTR de *HES1* y reprimir su traducción, pero en el MB presenta una baja expresión en muestras de tejido tumoral, especialmente en aquellos tumores con metástasis. Los bajos niveles de expresión del miR-199b en MB se deben al silenciamiento epigenético de su potenciador por hipermetilación y a la unión de *HES1* a su promotor. Para estudiar la relación entre *HES1* y el miR-199b, se inhibió la expresión de *HES1* en las líneas celulares de MB Daoy mediante un tratamiento con DAPT y mediante un silenciamiento con siARN (16). Se observó un aumento en la expresión del miR-199b. Por el contrario, la sobre-expresión mediante transfección de un vector con el miR-199b en la línea celular Daoy y en un modelo xenógrafo de ratón, provocó una disminución de *HES1* respecto a los controles con el vector vacío. Por tanto, *HES1* mediante la unión al promotor del miR-199b, regula negativamente la expresión de éste estableciendo entre ambos un circuito de retroalimentación negativa. Además, la expresión forzada del miR-199b redujo la proliferación celular, el crecimiento independiente de anclaje y la carga tumoral *in vivo* e *in vitro* evidenciando su rol como supresor tumoral en el MB (16).

Por otro lado, miR-199b y *HES1* también juegan un papel importante en el mantenimiento de las células CSC (CD133+/CD15+) del MB. Se observó una reducción de la población de células CD133+ gracias al silenciamiento de *HES1* por parte del miR-199b. Al silenciar *HES1*, la vía de señalización Notch activa la expresión

de genes *bHLHs* que promueven la diferenciación celular y reprime la de genes relacionados con la proliferación. Además, el *cluster* de diferenciación CD15 es otra diana del miR-199b, por lo que al sobre-expresarse en las células Daoy transfectadas, el porcentaje de células CD15+ disminuyó respecto al control. Mediante estos mecanismos, el miR-199b disminuye la capacidad de autorrenovación de las CSC en MB dificultando la progresión de la enfermedad (16) (27) (28) (29).

## 2.2-Vías PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2

### 2.2.1-Vía PI3K/Akt

La vía de señalización fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt también regula procesos biológicos como la progresión del ciclo celular, supervivencia, migración y crecimiento celular. Los PI3K son una familia formada por tres clases de lípidos quinasa (clase I, II, III) que fosforilan el grupo 3-hidroxilo de lípidos fosfatidilinositol (PI) en la membrana y pueden ser activados por: factores de crecimiento, hormonas y citoquinas. La vía de señalización se inicia cuando los factores de crecimiento (EGF, PDGF, factor de crecimiento similar a la insulina) son reconocidos por el receptor de tirosina quinasa (RTK). Esta unión hace que el receptor dimerice y se autofosforile reclutando y activando PI3K. Igualmente, existe otra forma de activar PI3K y es mediante la GTPasa Ras. Una vez el PI3K es activado, en la membrana, lleva a cabo la fosforilación del PIP2 a PIP3 que transmite la señal a otras moléculas entre ellas Akt. Esta última activada, es capaz de fosforilar numerosos sustratos que controlan la supervivencia y crecimiento celular, el metabolismo, la metástasis y la tumorigénesis. Uno de los sustratos de Akt es el complejo mTOR, que regula específicamente varios factores de transcripción y otras dianas que inducen la traducción de proteínas y la síntesis de lípidos y nucleótidos. Esta vía se encuentra sobre-activada en muchos tipos de cánceres (colorrectal, glioblastoma, gástrico y de pulmón) en los que provoca alteraciones aberrantes del ciclo celular, cambios en la movilidad y adhesión, inhibición de la apoptosis y angiogénesis que favorecen el desarrollo tumoral (30) (31) (32). (Figura 3)

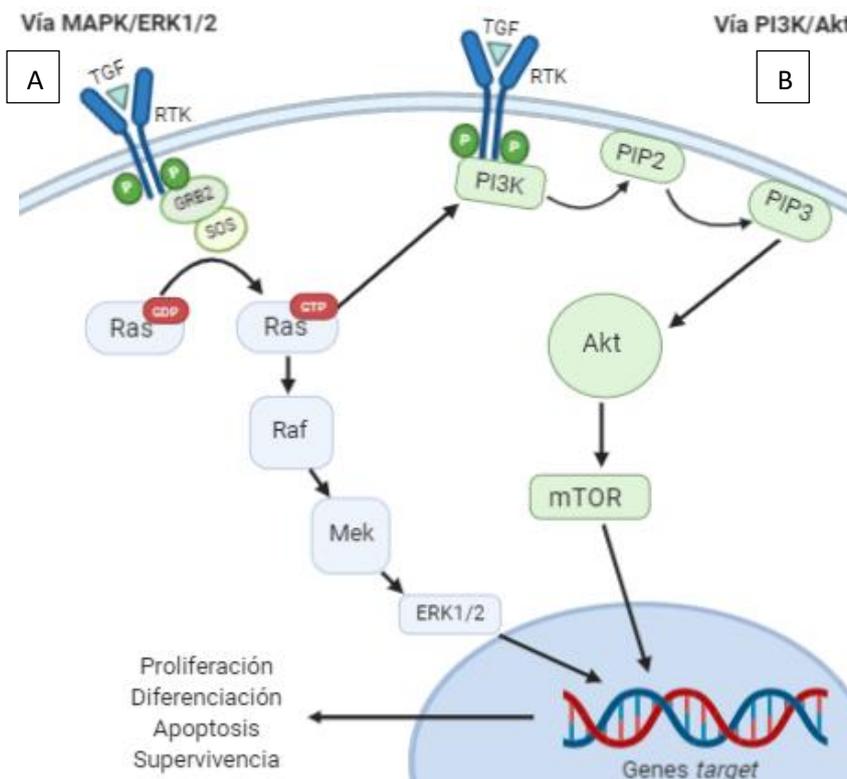


Figura 3. Vías de señalización MAPK/ERK1/2 y PI3K/Akt. A) Vía MAPK/ERK1/2: el factor de crecimiento (TGF) se une al receptor de tirosina quinasa (RTK) que se fosforila. Mediante las moléculas acopladoras GRB2 y Sos. El grupo fosfato se transfiere a la GTPasa Ras que se activa y estimula Raf, Mek y ERK1/2. Éste último se transloca al núcleo donde regula la transcripción génica. B) Vía PI3K/Akt: el TGF se une al RTK que se fosforila activando PI3K. PI3K, mediante fosforilaciones transforma PIP2 en PIP3 que fosforilan Akt. mTOR es activado por Akt y se transloca al núcleo donde regula la transcripción. PI3K también puede ser activado por Ras (30).

mTOR es una serina/treonina quinasa que interviene en la activación de diversas vías relacionadas con la respuesta a factores de estrés, autofagia, traducción, proliferación y diferenciación celular. En el carcinoma endometrial (ECC), mTOR aumenta el crecimiento y la proliferación celular. Mediante un análisis *in silico* se han identificado 3 miARN (miR-100, miR-99 y miR-199b) que tienen como diana a mTOR. En el ECC, los bajos niveles de expresión de miR-100, miR-99 y miR-199b co-existen con los elevados niveles de expresión de mTOR. El análisis de 73 muestras de tejido ECC, reveló una sobre-expresión de mTOR en el tejido ECC respecto a las muestras control de tejido no tumoral, siendo mayor ésta en tumores más avanzados (G2 y G3). Por el contrario, los niveles de expresión de los miR-100, miR-99 y miR-199b en las mismas muestras de tejido ECC, fueron más bajos que en las de tejido normal siendo menor ésta en tumores avanzados (G2, G3). Esto sugiere un nuevo mecanismo de activación de mTOR por parte de estos tres miARNs, aunque aún se necesita realizar más estudios que lo demuestren (33).

Aparte de los miR-199b-5p, 100 y 99, en el ECC se ha identificado otro miARN con bajos niveles de expresión que también tiene como diana a mTOR, el miR-199a-3p. Estos 4 miARN, podrían inducir la muerte por autofagia de las células ECC a través de mTOR (34). La autofagia es un proceso metabólico complejo regulado por mTOR, asegura la homeostasis celular bajo condiciones de estrés mediante la formación de autofagosomas que contienen componentes celulares defectuosos que serán degradados en el lisosoma (35). Este proceso es regulado por varios genes como *LC3* y *BENC1*, asociados con el número de fagosomas y la formación de estos. Para estudiar cómo estos miARNs afectan a la autofagia, se sobre-expresaron los miARN en las líneas celulares de ECC Ishikawa y KLE. Se observó un aumento de la apoptosis y la expresión de *LC3* y *BENC1*, indicando un aumento de la autofagia (34).

El miR-199b en el carcinoma hepatocelular (HCC) actúa como un supresor tumoral. Disminuye la expresión de la N-cadherina mediante la unión a su extremo 3'UTR y la EMT mediada por TGF- $\beta$ 1. La N-cadherina en el HCC se asocia con la invasión vascular, diferenciación del tumor y aparición de tumores multifocales. Es una molécula de adhesión celular y el aumento de su presencia en los tejidos tumorales es una característica de la transición de las células EMT. Las células EMT promueven la metástasis gracias a su elevada motilidad, capacidad migratoria, sobre-expresión de N-cadherina, disminución E-cadherina y la adquisición de propiedades de las células mesenquimales. Para estudiar la relación entre el miR-199b y la N-cadherina, se analizó la expresión de ambos en 100 muestras de tejido tumoral HCC. Se observó que, el miR-199b en el tejido tumoral presentaba una expresión muy baja respecto al tejido de hígado no tumoral adyacente. Por el contrario la N-cadherina se sobre-expresaba. Con esto se determinó que la expresión de ambos se encuentra inversamente relacionada. TGF- $\beta$ 1 es el causante de la baja expresión del miR-199b y la elevada expresión de la N-cadherina, aunque aún se necesitan más estudios para poder determinar cómo los regula (36).

El mecanismo molecular anticancerígeno del miR-199b consiste en bloquear la inducción de EMT mediada por TGF a través de la inhibición del sistema de regulación positiva que existe entre la N-cadherina y la señalización por Akt. En los estados

iniciales del proceso tumoral, Akt es fosforilado gracias a la acción del TGF- $\beta$ 1 activando la vía PI3K/Akt que induce la sobre-expresión de la N-cadherina. Ésta durante las últimas etapas de la tumorigénesis es la encargada de estimular la fosforilación mediada por TGF- $\beta$ 1. La sobre-expresión del miR-199b en las líneas celulares HCC HepG2 y Huh7 mediante transfección, resultó en una disminución de la migración y capacidad de invasión respecto a las células control. Sin embargo, la proliferación y la apoptosis en las células con el miARN sobre-expresado no se vieron afectadas. En un modelo xenógrafo de ratón se observó que la sobre-expresión del miR-199b también inhibía la metástasis *in vivo*. La expresión forzada de miR-199b bloquea la expresión de N-cadherinas impidiendo la fosforilación de Akt mediada por TGF- $\beta$ 1 durante las últimas etapas del desarrollo tumoral, inhibe indirectamente la activación de la vía PI3K/Akt y en consecuencia EMT y la metástasis. Debido a esto, el miR-199b presenta un gran potencial a la hora de ser usado como una nueva terapia en el HCC (36). (Figura 4)

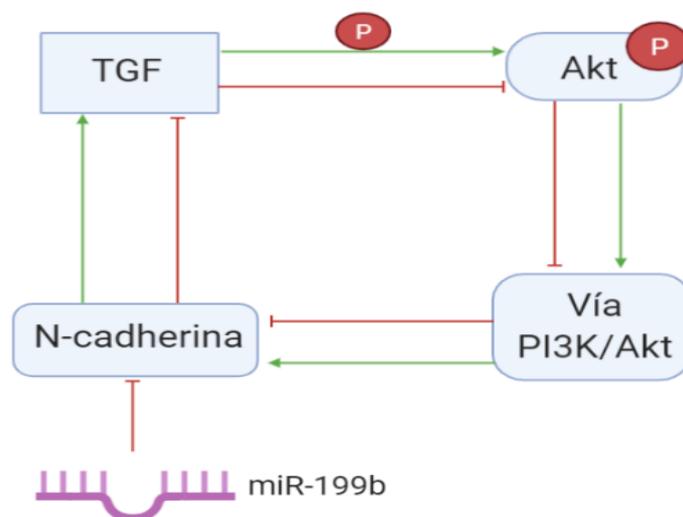


Figura 4. Sistema de regulación positiva N-cadherina, Akt en HCC: El TGF- $\beta$ 1 fosforila Akt activando la vía PI3K/Akt que aumenta la expresión de la N-cadherina. La N-cadherina estimula la fosforilación de Akt mediada por TGF. El miR-199b inhibe la expresión de la N-cadherina y bloquea el sistema de regulación.

El miR-199b en el osteosarcoma (OS) se encuentra sobre-expresado. En muestras de tejido OS y líneas celulares OS (MG63 y U2OS) presenta unos niveles de expresión altos respecto a los de las muestras de tejido normal adyacente y la línea celular ósea normal hFOB. Además, en el OS tiene propiedades oncogénicas, por lo que su alta expresión se asocia con estados avanzados, metástasis en los nódulos linfáticos, metástasis distal y un mal pronóstico. Interactúa con la vía EMT regulando la proliferación, migración, invasión celular y metástasis. Al silenciar el miR-199b mediante la transfección de un siARN-199b en las líneas celulares MG63 y U2OS, se observó una menor proliferación, migración y capacidad de invasión celular en comparación con los controles negativos así como una reducción en los niveles de proteínas N-cadherina, Vimentina,  $\beta$ -catenina y Metalopeptidasa 9 de matriz implicadas en la vía EMT (37).

Por otro lado, los cambios en los niveles de expresión de HER2 debido al silenciamiento del miR-199b en las células MG63 y U2OS, sugiere que este miARN podría inducir la progresión maligna del OS a través de la regulación de HER2 (37).

### 2.2.2-Vía MAPK/ERK1/2

La vía de las quinasas relacionadas con la señal extracelular (ERK 1/2), es una de las 4 cascadas que componen la vía de señalización de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK). Las otras tres cascadas que la componen son la de las quinasas amino-terminales Jun (JNK1/2/3), p38-MAPK y ERK5 (38). Estas cascadas actúan de forma conjunta para transmitir señales extracelulares a sus dianas intracelulares regulando procesos como la proliferación, desarrollo, respuesta al estrés, diferenciación, migración, senescencia y apoptosis celular. Pueden estar organizadas en 3 niveles de proteínas, MAP3K, MAPKK y MAPK, son las esenciales o 5 niveles de proteínas, en las que aparte de las esenciales tienen MAP4K y MAPKAPK que a veces son prescindibles para la señalización. Las cascadas se inician con la activación de una proteína G, tras esto, la señal se transmite mediante la sucesiva fosforilación y activación de las quinasas de cada nivel (39).

En particular, la vía ERK, puede ser activada por procesos internos, estrés celular y agentes extracelulares como hormonas o factores de crecimiento. Estos últimos se unen al RTK que dimeriza y se autofosforila reclutando a las proteínas adaptadoras Grb2 y SOS. SOS se une y fosforila la GTPasa Ras activándola, a continuación Ras fosforila y activa Raf y ésta a MEK. Por último ERK1 y ERK2 son fosforiladas por MEK y se transportan al núcleo donde activan varios factores de transcripción como Elk1, c-Fos, p53, Ets1/2 y c-Jun que regulan la proliferación celular, diferenciación, migración, apoptosis, determinación morfogénica y la transformación oncogénica(39) (40). La desregulación de esta cascada provoca enfermedades como diabetes, inflamación de la respuesta inmune y cáncer. En numerosos tumores como el carcinoma hepatocelular, glioma o el osteosarcoma, esta vía se asocia con un aumento de la proliferación y supervivencia celular (38). (*Figura 3*)

HER2 (*ErbB2*) es un proto-oncogén que codifica para un receptor transmembranal del tipo tirosina quinasa de la familia de factores de crecimiento epidérmicos transmembranales (EGFR). Suele estar sobre-expresado en un 20-30% de los cánceres de mama y se asocia con un pronóstico pobre porque aumenta la agresividad del tumor. Durante los últimos años, ha aumentado el interés por la búsqueda de agentes capaces de inhibir la expresión de esta proteína tumoral para ser usados como posibles terapias contra el cáncer. Uno de los candidatos es el miR-199b. Este miARN que en el tejido tumoral del cáncer de mama tiene una expresión muy baja en comparación con el tejido normal y es capaz de unirse al extremo 3'UTR de HER2 inhibiendo su expresión. Las líneas celulares de cáncer de mama SK-BR-3 y BT-474 transfectadas con un miARN-199b sintético presentaron una disminución en los niveles de proteína HER2 respecto a los controles. Sin embargo, mediante una qRT-PCR se observó que los niveles de ARNm se mantenían constantes, por tanto, la inhibición tenía lugar a nivel de traducción (41).

HER2 fosforila Akt y ERK1/2 activando las vías de señalización PI3K/Akt y MAPK/ERK, de manera que el silenciamiento de HER2 por la sobre-expresión del miR-199b en SK-BR-3 y BT-474 disminuyó los niveles de Akt y ERK1/2 en su forma fosforilada (p-Akt y p-ERK1/2). De la misma forma el uso de inhibidores del miR-199b en ambas líneas celulares, aumentó los niveles de p-Akt y p-ERK1/2. Al no llevarse a

cabo la activación de estas 2 vías, la capacidad de migración y la clonogenicidad de las células BR-3 y BT-474 transfectadas se vieron disminuidas respecto a los controles. También se quiso estudiar si la combinación del miR-199b con el anticuerpo trastuzumab aumentaba el efecto antitumoral de este tratamiento. Las líneas celulares SK-BR-3 y BT-474 tratadas con trastuzumab y miR-199b, presentaron una mayor disminución de la capacidad migratoria y la clonogenicidad que aquellas células sólo tratadas con el anticuerpo. El miR-199b en el cáncer de mama actúa como un supresor de tumores, su sobre-expresión disminuye la agresividad mediada por HER2 y mejora los efectos del tratamiento con trastuzumab (41).

En el MB metastático, el miR-199b aparte de bloquear la expresión de HES1, también impide la activación de Akt y ERK que sobre-activan las vías PI3K/Akt y Ras-ERK. Ambas juegan un papel importante en el desarrollo de la patogénesis molecular del MB ya que son esenciales para el mantenimiento de las CSC y la metástasis. Un estudio (16), demostró que la sobre-expresión del miR-199b mediante adenovirus en las líneas celulares de MB (UW228 y ONS 76) redujo la activación de las vías PI3K/Akt y Ras-ERK y en consecuencia también la proliferación, capacidad de formar colonias, crecimiento libre de anclaje y propiedades migratorias respecto a las células control tratadas con el adenovirus vacío. Estos resultados plantean la posibilidad de usar el miR-199b como una prometedora terapia basada en la inhibición de Akt y ERK (16).

K-Ras es un regulador de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK1/2 y mutaciones en éste sobre-activan ambas vías pudiendo llegar a originar el cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC). Estas mutaciones no sólo provocan el inicio del tumor, sino que también favorecen la progresión del cáncer, la metástasis y la resistencia a las terapias. En el NSCLC, las mutaciones de K-Ras hacen que el promotor del miR-199b se hipermetile inhibiendo su expresión. Es por esto que en líneas celulares de NSCLC con K-Ras mutado, la expresión del miARN, es mucho menor que en las líneas celulares con K-Ras sin mutar y que en los tejidos adyacentes no tumorales. En el NSCLC el miR-199b actúa como un supresor tumoral. Puede unirse a la región 3'UTR de K-Ras y varios co-activadores (K-Ras, PIK3R1, Akt1, Rheb1 y KSR2) de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK regulándolas negativamente. La restauración de la expresión del miR-199b en líneas celulares NSCLC con K-Ras mutado A549 y H2122, disminuyó la proliferación celular, la formación de colonias y la capacidad de invasión. La restauración también se llevó a cabo en un modelo xenógrafo en el que se redujo el crecimiento tumoral, la proliferación y la metástasis. Estos resultados hacen pensar en la posibilidad de usar el miR-199b como terapia para tratar NSCLC con K-Ras mutado gracias a su capacidad de inhibir la activación de las vías PI3K/Akt y MAPK/ERK mediante la unión a varios de sus intermediarios (20).

## 2.3-Otras dianas moleculares

### 2.3.1- Factor inducible de hipoxia 1 $\alpha$ (HIF1 $\alpha$ )

El complejo transcripcional HIF-1 es un heterodímero formado por una subunidad  $\alpha$  y una  $\beta$  implicado en la homeostasis del oxígeno. HIF-1 $\beta$  se expresa de forma constitutiva, mientras que la expresión de HIF-1 $\alpha$  depende de la concentración de oxígeno. En condiciones de normoxia, HIF-1 $\alpha$  es degradado por el proteosoma gracias a la hidroxilación de 2 residuos de prolina, sin embargo, en condiciones de hipoxia la hidroxilación no se produce y en consecuencia la degradación mediante el proteosoma tampoco. En este caso HIF-1 $\alpha$  se estabiliza, se une a HIF1- $\beta$  y forman el heterodímero HIF-1 que se transloca al núcleo donde se une a las regiones reguladoras de los genes de respuesta a la hipoxia involucrados en procesos como la angiogénesis, desdiferenciación, invasión y metástasis, activando su transcripción.

La hipoxia está asociada con muchas enfermedades y en tumores suele ser un evento bastante común que activa HIF-1 $\alpha$ . Aunque la activación de HIF-1 $\alpha$  no sólo se produce por los bajos niveles de oxígeno, también puede darse por factores de crecimiento, activación oncogénica o por la pérdida de la función de algún supresor tumoral. Alteraciones en la actividad de HIF-1 $\alpha$  afectan al desarrollo tumoral ya que juega un papel importante en la progresión del tumor, angiogénesis, metástasis y resistencia a la quimioterapia y radioterapia (42) (43) (44).

En muestras de tejido tumoral de cáncer de próstata (PCa) y líneas celulares PCa (LNCaP, PC-B y DU145), HIF-1 $\alpha$  está sobre-expresado incluso bajo condiciones normales de oxígeno. Además, se asocia con un estado clínico avanzado y quimiorresistencia. La sobre-expresión de HIF-1 $\alpha$  en PCa se debe a la elevada actividad a nivel transcripcional del transactivador NF $\kappa$  B y a la pérdida a nivel post-transcripcional del regulador negativo miR-199b. Éste último en muestras de tejido tumoral y células PCa (LNCaP, PC-B y DU145) presenta niveles de expresión bajos y actúa como un supresor de tumores. Al regular negativamente la expresión de HIF-1 $\alpha$  mediante la unión a su extremo 3'UTR, reduce la proliferación celular y aumenta la apoptosis en condiciones de hipoxia y normoxia gracias a que bloquea indirectamente la transcripción de los genes diana de HIF-1 $\alpha$ : PHD-2, BCL-xL y VEGF implicados en estos procesos.

Estos resultados fueron obtenidos mediante la sobre-expresión del miR-199b en las líneas celulares de PCa (PC-B y DU145) con adenovirus y sugieren su uso como terapia para el PCa (45).

En el HCC existe una relación inversa entre los niveles de expresión del miR-199b y los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$ . El análisis de 35 muestras de tejido HCC mediante qRT-PCR y *Western blot*, revelaron una baja expresión del miR-199b y una elevada expresión de proteína HIF-1 $\alpha$  en comparación con las muestras de tejido cirrótico usados como control. Los bajos niveles de expresión del miR-199b sugieren su rol como supresor tumoral en el HCC. Para confirmar esto, se transfectaron con un precursor de miR-199b las líneas celulares de HCC HepG2 y Huh-7. Tras esto se observó una disminución de los niveles de proteína HIF-1 $\alpha$  y de la proliferación celular respecto a las células transfectadas con el precursor 1 usadas como control negativo

tanto en condiciones de hipoxia como de normoxia. También se produjo un aumento de la radiosensibilidad pero sólo bajo condiciones de hipoxia. El miR-199b, en el HCC, regula negativamente el crecimiento celular al unirse a la región 3'UTR de su diana HIF-1 $\alpha$ , ejerciendo su acción oncosupresora (46).

Se ha sugerido la idea de que el miR-199b puede jugar un papel en el desarrollo de tumores paratiroides. Para intentar determinar los efectos de este miARN, se realizó un análisis *in silico* con el software *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA), mediante el cual se identificaron los factores de transcripción HIF-1 $\alpha$  y Sirtuina 1 como 2 dianas del miR-199b. Estos dos factores de transcripción estimulan la proliferación celular e interaccionan con el gen *MEN1*, causante de la neoplasia endocrina múltiple de tipo 1 (MEN1). Por tanto, determinar la relación entre HIF-1 $\alpha$ , Sirtuina 1 y el miR-199b, podría ser clave para explicar la relación entre el miR-199b y el gen *MEN1* (47).

### 2.3.2-Proteína homeodominio dedo de Zinc (ZEB1)

La proteína ZEB1, junto con ZEB2 forman parte de la familia de factores de transcripción zfh. Están implicadas en el control de EMT al actuar como represores o activadores de la transcripción según se unan a co-represores (CtBP) o co-activadores (p300). EMT en el cáncer permite que las células malignas se disocien de los tumores primarios provocando su disgregación a otros lugares causando metástasis. ZEB1 y ZEB2 facilitan el proceso de dediferenciación al regular de forma negativa la expresión de genes epiteliales que codifican componentes implicados en la adhesión y uniones celulares y de forma positiva la expresión de factores mesenquimales como vimentina, fibronectina, metaloproteinasas de la matriz y N-cadherina. Pero ZEB1 no sólo se ve implicado en EMT, también se ha observado que participa en la regulación de procesos que afectan al desarrollo tumoral como proliferación, diferenciación, supervivencia y respuesta a daños en el ADN (48).

En el NSCLC, los niveles de expresión del miR-199b y su diana ZEB1, están inversamente relacionados. El miR-199b presenta bajos niveles de expresión en muestras de tejido NSCLC y líneas celulares NSCLC (SK-MES-1, NCI-H1650, NCI-H1975, SPC-A1 y A549) respecto a muestras de tejido normal y una línea celular epitelial bronquial humana (16HBE). Por el contrario, ZEB1 se encuentra sobreexpresado. El miR-199b actúa como un supresor tumoral en el NSCLC. Su sobreexpresión en las células NSCLC (SK-MES-1 y A549) mediante transfección, provocó una disminución de la migración, viabilidad y capacidad de invasión celular así como una reducción en los niveles de expresión de ARNm y proteína ZEB1 respecto a las células usadas como control negativo. El miR-199b ejerce su acción oncosupresora al unirse al extremo 3'UTR de ZEB1 e inhibir su expresión (49).

### 2.3.3-Ciclina 1 (CCNL1)

El miR-199b en el Sarcoma de Edwings (ES) actúa como un supresor tumoral al reprimir la expresión de la Ciclina 1 (CCNL1) (50). CCNL1 es una proteína que regula el ciclo celular al inducir la promoción de las células de la fase G0 a la G1 y en cánceres como el de pecho, y el carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello, actúa como un oncogén favoreciendo la progresión tumoral (51) (52). Los niveles de expresión del miR-199b en las líneas celulares de ES (A673 y T252) obtenidos

mediante qRT-PCR, fueron bajos en comparación a los obtenidos en las células madre mesenquimales (MSC) usadas como control. Para estudiar los efectos oncosupresores del miR-199b en el ES, éste se sobre-expresó mediante transfección de un miARN sintético en A673 y T252. El miR-199b disminuyó la proliferación celular, la capacidad de invasión, aumentó la apoptosis y bloqueó el ciclo celular de las células ES respecto al control (50).

#### *2.3.4-Receptor de discoidina 1 (DDR1)*

El receptor dominio de discoidina1 (DDR1) es un tipo de receptor RTK dimérico capaz de unirse al colágeno, incluso al de tipo fibrilar. La unión al ligando activa el DDR1 mediante autofosforilación (53) provocando la activación de vías de señalización intracelulares implicadas en la regulación de la proliferación, supervivencia y migración celular así como de la invasión de la matriz extracelular (54). Se ha detectado la sobre-expresión de DDR1 en algunos cánceres como el de pecho triple negativo, pulmón, glioblastoma, próstata, gástrico, páncreas, colorrectal y vejiga en los que se asocia con la progresión del tumor, un pobre pronóstico y tasa de supervivencia libre de cáncer (53).

En el cáncer de mama triple negativo (TNBC), DDR1, diana del miR-199b, se encuentra sobre-expresado y permite identificar pacientes con un mal pronóstico y tumores invasivos. Por el contrario, el miR-199b, tiene bajos niveles de expresión en comparación con muestras de tejido normal. Los niveles de expresión de DDR1 y miR-199b guardan una relación inversa. Para evaluar el papel del miR-199b en el TNBC, éste se sobre-expresó en la línea celular HCC1937 con un miR-199b sintético. La tasa de migración, la proliferación e invasión, se vieron reducidas respecto a los controles negativos. Es posible que el miR-199b en el TNBC actúe como un supresor tumoral al inhibir la expresión del DDR1 mediante la unión a la región 3'UTR de éste (55).

En la leucemia mieloide aguda (AML), el miR-199b también presenta niveles bajos de expresión debido a la acetilación de histonas y la metilación de su promotor (56). Sin embargo, la expresión de sus dianas DDR1 y Podocalyxin (PODXL), es elevada. PODXL, es una proteína transmembranal que se expresa en las células madres hematopoyéticas (HSC) y estimula la salida de los reticulocitos inmaduros de la médula ósea a la circulación. La disminución de los niveles de expresión del miR-199b en AML provocan un aumento en la expresión de DDR1 y PODXL. Se analizaron los efectos del bloqueo de estas dos proteínas mediante la expresión de un vector con el miR-199b en células K562. Se observó una reducción de la capacidad de migración respecto a las células con el vector vacío usadas como control (57).

Otras dianas del miR-199b en el AML son los factores de transcripción HOXA7 y HOXB6. Ambos pertenecen a la familia de factores de transcripción HOX y están implicados en la hematopoyesis, por lo que la expresión aberrante de estos puede llegar a causar enfermedades como la leucemia. En el subtipo de leucemia FAB-M5, HOXA7 y HOXB6 se sobre-expresan mientras que el miR-199b presenta unos niveles de expresión bajos. Está correlación inversa entre la expresión de los factores HOX y el miARN se asocia con el desarrollo de la leucemia (56).

### 2.3.5-SET

SET es una oncoproteína implicada en el control de una gran cantidad de procesos celulares como la regulación del ciclo celular, el envejecimiento, la transcripción y la acetilación de histonas. También es un inhibidor endógeno de la fosfatasa 2A (PP2A), un supresor tumoral. PP2A es una serina/treonina heterotrimérica formada por una subunidad catalítica (C), una subunidad reguladora (B) y una subunidad andamio (A). Regula la transducción de señales de muchas vías como PI3K/Akt o MAPKs, implicadas en la proliferación, supervivencia celular, metabolismo y apoptosis mediante la modulación del estado de fosforilación/activación de los reguladores ERK y Akt. SET al inhibir PP2A activa estas vías y además es capaz de activar AP-1, inhibir la actividad de ADNasas y desactivar p53. Se han detectado altos niveles de la proteína SET en tumores como el colorrectal, pancreático, de pecho y leucemia mieloide crónica en los que se asocian con un pobre pronóstico y quimiorresistencia (58) (59).

La expresión del miR-199b en líneas celulares de coriocarcinoma (BeWo, JAR y JEG) y muestras de tejido tumoral es baja en comparación a la de los trofoblastos no cancerígenos (3 A-Sub-E) y el tejido normal. Por el contrario los niveles de SET, que en el coriocarcinoma ha sido identificado como una diana del miR-199b, son elevados. La sobre-expresión del miR-199b en la línea celular JAR mediante transfección, redujo los niveles de SET tanto a nivel de ARNm como de proteína así como la proliferación. Por el contrario el silenciamiento del miR-199b en la línea celular 3 A-Sub-E mediante un miARN antisentido aumentó los niveles de SET. El miR-199b en el coriocarcinoma actúa como un supresor tumoral que reduce la proliferación celular al regular negativamente la expresión de SET (60).

La expresión del miR-199b en 4 de 5 líneas de cáncer colorrectal (CRC) fue baja en comparación con la de las células de la mucosa del colon usadas como control. Sin embargo, los niveles de su diana la proteína SET en las mismas 5 líneas celulares fueron altos. Para estudiar la relación entre la expresión de SET y el miARN, se llevó a cabo la transfección de un pre-miR-199b y un anti-miR-199b en las líneas celulares SW480 y HT-29 que provocaron una disminución y un aumento de los niveles de SET respectivamente. Por lo que el miR-199b en el CRC regula negativamente la expresión de SET al unirse a la región 3'UTR (61).

Además, como SET es un inhibidor endógeno de PP2A, la regulación por parte del miR-199b afectará a la actividad de este supresor tumoral. En SW480 y HT-29 transfectadas con el pre-miR-199b, se observó una activación de PP2A, una reducción de la viabilidad celular y un aumento de la sensibilidad a tratamientos con 5'FU y oxaliplatino respecto a las células control. El efecto contrario se observó en SW480 y HT-29 transfectadas con el anti-mi-199b. Estos resultados indican que el miR-199b al regular negativamente SET tiene efectos anti-tumorales (61) (62).

### 2.3.6-Sirtuina (SIRT1)

SIRT1 es una histona deacetilasa de clase III dependiente de NAD implicada en muchos procesos como: el envejecimiento, respuesta a daños en el ADN, metabolismo, programación celular, supervivencia, muerte celular y cáncer. Su papel en el desarrollo y progresión del cáncer no está del todo claro ya que según el tipo de células y las condiciones puede actuar como un promotor o supresor tumoral. Por ejemplo, en las células humanas de cáncer de colon, cáncer de próstata, leucemia mieloide aguda y cáncer de ovario, la SIRT1 se sobre-expresa e inhibe las funciones del supresor tumoral p53, un fenómeno clave para que tenga lugar la iniciación, progresión, invasión y metástasis del cáncer. Además, en el cáncer de ovario, la sobre-expresión de SIRT1 se asocia con la quimiorresistencia. Sin embargo, en células de cáncer de vejiga y algunas células de cáncer de ovario y próstata, la SIRT1 podría actuar como un supresor tumoral ya que presenta unos bajos niveles de expresión (63).

En el CRC metastático, el miR-199b presenta niveles de expresión bajos tanto en los tumores primarios como en las metástasis del hígado. Este miARN actúa como un supresor tumoral porque su expresión forzada disminuye la migración y la capacidad de invasión *in vivo* e *in vitro*. También aumenta la sensibilidad a tratamientos con 5'-FU y oxaliplatino en líneas de CRC. El mecanismo oncosupresor del miR-199b en el CRC metastático reside en su capacidad de regular negativamente la expresión de su diana SIRT1 que inactiva la señalización CREB/KISS. CREB es un factor de transcripción que activa la expresión de KISS, un supresor de metástasis. Por tanto, el silenciamiento de SIRT1 mediante la transfección de un siARN en la línea celular SW620, provoca la acetilación del factor de transcripción CREB que aumenta la expresión de KISS dificultando el desarrollo de la metástasis (64).

### 2.3.7-Stonina 2 (STON2)

STON2 es una proteína de membrana involucrada en el proceso de la endocitosis, mediante la selección de proteínas relacionadas con las clatrininas permite internalizar proteínas específicas. A parte de esto, varios estudios indican que esta proteína, también está involucrada en la señalización dopaminérgica. Se encarga de regular la internalización de los receptores de dopamina de tipo 2 (D2Rs), gracias a los cuales la dopamina es capaz de estimular la apoptosis e inhibir la progresión tumoral y la maduración de los capilares tumorales. La internalización de D2Rs mediada por STON2, reduce los efectos antitumorales de la dopamina y favorece de forma indirecta el desarrollo tumoral (67) (68).

En el carcinoma papilar de tiroides los niveles de expresión del miR-199b y su diana STON2 guardan una correlación inversa. El análisis de 40 muestras de tejido tumoral mediante qRT-PCR, reveló unos bajos niveles de expresión del miARN respecto a los del tejido normal usados como control. Por el contrario, el análisis de la expresión de STON2 mediante qRT-PCR y una tinción inmunohistoquímica, en las mismas muestras de tejido tumoral, reveló unos elevados niveles de la proteína, siendo estos mayores en tumores avanzados (estado III y IV) en los que además, se asocia con un pobre pronóstico y baja supervivencia media (68).

Para evaluar los efectos del miR-199b en el carcinoma papilar de tiroides, se transfectó la línea celular B-CPAP con el miARN. La sobre-expresión de éste provocó la supresión de EMT, la expresión de STON2, la proliferación celular, la capacidad de formar colonias, la migración y la invasión, así como un aumento de la apoptosis celular y la quimiosensibilidad a tratamientos con paclitaxel. Además, mediante la inoculación en un ratón de las B-CPAP transfectadas, se pudo observar una reducción de la metástasis y del crecimiento tumoral *in vivo*. Sin embargo, la transfección de la línea celular B-CPAP con un inhibidor del miARN, provocó los efectos contrarios tanto *in vivo* como *in vitro*. Estos resultados sugieren que el miR-199b actúa como un supresor tumoral en el carcinoma papilar de tiroides al regular negativamente la expresión de su diana STON2 (68).

Tabla 2: Nivel de expresión, targets y funciones moleculares del miR-199b en distintos tipos de cáncer

miARN	Tipo de Cáncer	Nivel de expresión	Target	Función molecular	Efectos del miARN	Referencia
miR-199b	Cancer endometrial endometroide (EEC)	↓	mTOR kinasa	Supresor de tumores	Autofagia , disminuye proliferación, aumenta apoptosis	37,38
miR-199b	Cancer de ovario	↓	JAG1	Supresor de tumores	Disminuye proliferación celular e invasibilidad, arresta el ciclo celular, aumenta apoptosis, sensibilidad al cisplatino	14
miR-199b	Cancer de mama	↓	HER2	Supresor de tumores	Disminuye proliferación celular, migración, clonogenicidad de células HER2+, mejora efectos transtuzumab	36
miR-199b	Cancer de mama triple negativo (TNBC)	↓	DDR1	Supresor de tumores	Disminuye la migración, proliferación e invasión celular	55
miR-199b	Meduloblastoma (MB)	↓	HES1	Supresor de tumores	Disminuye la la cantidad de células madre CD33+, proliferación, anclaje y migración celular, inhibe la metástasis	16,27,28,29
			CD15			
			vía Akt/ERK			
			ErbB2			
miR-199b	Carcinoma hepatocelular (HCC)	↓	N-cadherina	Supresor de tumores	Inhibe la migración e invasión celular, metástasis, disminución EMT	40, 46
			HIF-1 $\alpha$			
miR-199b	Osteosarcoma (OS)	↑	HER2 HES-1	oncomiR	Produce metástasis y aumenta la proliferación, migración e invasión celular	42
miR-199b	Sarcoma de Ewing's (ES)	↓	CCNL1	Supresor de tumores	Disminuye proliferación e invasión celular, arresta el ciclo celular, aumenta la apoptosis	50
miR-199b	Cancer de prostata (PCa)	↓	HIF-1 $\alpha$	Supresor de tumores	Disminuye el crecimiento celular, aumento apoptosis	45
miR-199b	Carcinoma renal	↓	Desconocido	Supresor de tumores	Disminuye la proliferación y migración celular, aumenta apoptosis	65
miR-199b	Cancer nasofaríngeal (estadio I)	↓	Desconocido	Supresor de tumores	Desconocido	66
miR-199b	Coriocarcinoma	↓	SET	Supresor de tumores	Disminuye la proliferación celular	60
miR-199b	Leucemia mieloide aguda (AML)	↓	HOXA7	Supresor de tumores	Disminuye la migración, aumenta la capacidad de formar colonias e induce la leukemogénesis	56,57
			HOXB6			
			PODXL			
			DDR1			

miR-199b	Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)	↓	k-RAS	Supresor de tumores	Disminuye la proliferación celular, la invasión, la capacidad de formar colonias y la metástasis.	20, 49
			KSR2			
			PIK3RI			
			Akt1			
			Rheb1			
ZEB1						
miR-199b	Tumor paratiroide hereditario (MEN1)	↑	HIF- $\alpha$	oncomiR	Aumenta la proliferación celular y la metástasis	47
			SIRT1			
miR-199b	Cancer colorrectal estado temprano (CCR)	↓	SET	Supresor de tumores	Disminuye viabilidad celular y aumenta la sensibilidad a 5'-FU y oxaliplatino	61
miR-199b	Cancer colorrectal metastático (CCR)	↓	SIRT1	Supresor de tumores	Disminuye invasión y migración celular, aumenta la sensibilidad al 5'-FU y oxaliplatino	64
miR-199b	Carcinoma papilar de tiroides	↓	STON2	Supresor de tumores	Disminuye proliferación, migración, formación de colonias, metástasis y progresión tumoral. Aumenta la apoptosis y la quimiosensibilidad al paclitaxel	68

### **3-VALOR CLÍNICO DEL miR-199b COMO BIOMARCADOR**

La alteración de los niveles de expresión del miR-199b en los distintos tipos de cánceres, le otorgan a esta molécula un gran potencial como nuevo biomarcador de diagnóstico, pronóstico, progresión y estado del tumor. (Tabla 3)

#### **3.1-Carcinoma de células renales (RCC)**

El carcinoma de células renales metastático (RCCm) tiene, por lo general, un pronóstico bastante negativo. Por tanto, la identificación temprana de aquellos pacientes que presenten un alto riesgo de desarrollar metástasis es imprescindible para poder mejorar la predicción de la evolución de la enfermedad y selección del tratamiento para, en última instancia, conseguir reducir la mortalidad de ésta. Por esta razón, Wu et al.(69), han desarrollado una firma constituida por 4 miARNs (miR-10b, miR-139-5p, miR-130b y miR-199b-5p) que permite identificar el estado de metástasis en las células claras del carcinoma de células renales (ccRCC) (69).

Wu et al. (69) mediante un *microarray*, analizaron los niveles de expresión de miARNs en 28 muestras de ccRCC (T1, n: 13 y M1, n: 15), aquellas que presentaban tumores T1 fueron utilizadas como controles. El *microarray* reveló 21 miARNs expresados de forma diferencial entre las muestras de ccRCC localizado y metastático (ccRCCm). De estos 21, en el ccRCCm 7 estaban sobre-expresados y 14 poco expresados. Para que los miARNs desregulados fuesen escogidos para formar parte de la firma, estos debían presentar un valor  $p < 0,01$  y una diferencia del doble entre la expresión del miARN en ccRCC y ccRCCm. Los que cumplían ambos requisitos fueron: el miR-10b y el miR-139-5p, con bajos niveles de expresión y el miR-130b y el miR-199b-5p sobre-expresados. Una vez escogidos los 4 miARNs que forman la firma, mediante una curva ROC, se determinó el punto de corte (8,12) con mejor especificidad y sensibilidad que permitiese distinguir entre las muestras con un alto o bajo riesgo de metástasis. Por último, se realizó un análisis de regresión Cox con el que se observó que además de la expresión del miR-199b, el riesgo de metástasis y el estado del tumor también podrían servir para pronosticar la supervivencia media de este cáncer (69).

#### **3.2-Carcinoma endometrial (ECC)**

En el ECC, el miR-100, miR-99 y miR-199b presentan bajos niveles de expresión. Torres et al. (33) quisieron evaluar el valor pronóstico y diagnóstico de la expresión de estos miARNs en muestras de tejido y de plasma ECC. Para ello, elaboraron curvas ROC y desarrollaron dos firmas de miARNs que permitiesen diferenciar con alta especificidad y sensibilidad las muestras ECC de las muestras control de plasma y tejido. La primera firma compuesta por el miR-100, miR-99 y miR-199b permitía diferenciar entre muestras de tejido ECC y normal de forma más precisa que los miARNs de manera individual. La curva ROC de ésta obtuvo un área debajo de la curva (AUC) de 0,774, mientras que la del miR-199b en solitario fue 0,704. Por otro lado la segunda firma constituida por el miR-199b y el miR-99a (AUC = 0,903) permitía diferenciar entre muestras de plasma ECC y normales con una sensibilidad del 88% y una especificidad del 93% (33).

Para evaluar el valor pronóstico de estos miARNs sobre la supervivencia se llevó a cabo un análisis de regresión Cox y un análisis de supervivencia Kaplan-Meyer. Los resultados obtenidos indicaron que la expresión del miR-99a y el miR-100 se asociaban con el pronóstico de la supervivencia general, en particular la baja expresión del miR-100 era sinónimo de una menor supervivencia. Por todo esto, ambas firmas de miARNs, pueden considerarse unos prometedores biomarcadores para el diagnóstico temprano y pronóstico en el ECC (33).

### **3.3-Cáncer de ovario**

El cáncer de ovario tiene una elevada tasa de mortalidad debido a diferentes razones. Una de ellas es el desarrollo de quimiorresistencia adquirida al cisplatino, que es el tratamiento de primera línea para este tipo de cáncer (14).

Muchos estudios apuntan que los miARNs se ven implicados en este proceso. Así que, para estudiar la desregulación de la expresión de los miARNs en el cáncer de ovario con quimiorresistencia adquirida, los autores llevaron a cabo un *array* de miARNs en dos líneas celulares de cáncer de ovario. Se comparó la expresión de las células sensibles al cisplatino A2780s y OV2008 con la de las células resistentes al cisplatino A2780cp y C13\*. Mediante el *array* se detectó una baja expresión del miR-199b en las células resistentes que fue validada con una qRT-PCR en las mismas células y en otras líneas quimiorresistentes como SKOV3, OVCA433 y ES-2. Se observó una disminución progresiva en los niveles de expresión del miARN desde etapas tempranas a avanzadas del tumor, que se asociaban de forma significativa con el desarrollo de la quimiorresistencia y con una baja supervivencia (14).

### **3.4-Cáncer de mama**

Los niveles de expresión del miR-199b fueron analizados mediante qRT-PCR en 131 muestras de tejido tumoral de cáncer de pecho y en el tejido no canceroso adyacente. La expresión del miARN en el tejido tumoral fue baja en comparación con la del tejido normal. Además, la baja expresión del miR-199b se correlacionó significativamente con un estado avanzado TNM (Tumor, nódulo, metástasis) y metástasis en los nódulos linfáticos. El análisis Cox identificó la expresión del miR-199b como un factor de pronóstico independiente y el análisis de supervivencia Kaplan-Meyer determinó que los pacientes con una baja expresión de este miARN tuvieron una supervivencia significativamente más corta. Todos estos resultados sugieren que los bajos niveles de expresión del miR-199b podrían ser usados como un biomarcador de pronóstico en el cáncer de mama (70).

### **3.5-Carcinoma hepatocelular (HCC)**

Los niveles de expresión del miR-199b se analizaron en 35 muestras de HCC e hígado cirrótico (control) mediante un ensayo *TaqMan* de miARN. Se detectó una baja expresión del miARN en el tejido HCC que se correlacionó negativamente con el estado TNM, ya que los tumores más avanzados presentaron menor expresión del miR-199b. Para determinar el valor pronóstico de este miARN, se realizó un análisis de supervivencia Kaplan-Meyer gracias al cual se observó que la expresión del miR-199b estaba inversamente correlacionada con la supervivencia general y la supervivencia libre de enfermedad. Por lo tanto, aquellos pacientes que presentaban

bajos niveles de expresión del miR-199b tuvieron una menor supervivencia. Todo esto indica que el miR-199b podría ser un biomarcador de pronóstico muy útil en el HCC (46).

### **3.6-Cáncer colorrectal (CRC)**

Long Sheng et al. (61) estudiaron la expresión del miR-199b en 30 muestras de tejido tumoral primario CRC y sus metastásis del hígado. La expresión del miARN en las muestras metastásicas fue mucho menor que en las de tumor primario CRC. Esta baja expresión en las muestras tumorales se asocia con un avanzado estado TNM, el desarrollo de metástasis linfática y la presencia de metástasis sincrónicas en el momento del diagnóstico. Cristóbal et al. (63), obtuvieron los mismos resultados al analizar 93 muestras de tejido tumoral primario CRC y sus metástasis hepáticas. Para evaluar el valor pronóstico del miR-199b, llevaron a cabo un análisis de supervivencia Kaplan-Meyer mediante el cual observaron que los pacientes que presentaban baja expresión del miARN tenían una supervivencia media y una supervivencia libre de enfermedad menor. Además, detectaron un mayor valor pronóstico del miR-199b en aquellos pacientes jóvenes o mayores de 70 años con *KRAS* no mutado. Por último, determinaron que la baja expresión del miR-199b podía predecir la eficacia de tratamientos basados en oxaliplatino en pacientes con CRC (61) (64).

### **3.7-Carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC)**

Se analizaron mediante qRT-PCR 32 muestras de tejido HNSCC y 8 muestras del tejido normal adyacente. El análisis detectó unos bajos niveles de expresión de los miR-15a, miR-34c y miR-199b en las muestras de tejido HNSCC que se asociaron con la invasión de los nódulos linfáticos. Por otra parte, la baja expresión del miR-199b en las muestras HNSCC, también se asoció con la presencia de invasión perineural. Esto convierte a los miR-15a, miR-34c y miR-199b en unos potenciales biomarcadores de diagnóstico para la detección temprana del HNSCC, aunque aún se necesitan realizar muchos más estudios (71).

### **3.8-Leucemia mieloide aguda (AML)**

Para investigar el valor pronóstico del miR-199b en AML, Favreau et al. (65) analizaron las características clínicas y moleculares de 166 casos de AML mediante *The Cancer Genome Atlas* (TCGA). El análisis de los niveles de expresión del miARN en muestras con distinto riesgo citogenético y las curvas de Kaplan-Meyer para los altos y bajos niveles de expresión del miR-199b asociaron la baja expresión de éste con un alto riesgo citogenético y una pobre supervivencia general. También se estudiaron los cambios en la expresión de este miARN en los distintos subtipos de AML. En el subtipo FAB-M5, se detectó una expresión del miR-199b especialmente baja que se asoció con un mal pronóstico porque la supervivencia media de 1 año en estos pacientes fue sólo del 25%, mientras que la del resto fue del 51%. Estos resultados sugieren el uso del miR-199b como biomarcador de pronóstico para la AML y en especial para el subtipo FAB-M5 (56).

### **3.9-Cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC)**

Jin et al. (20) evaluaron el valor pronóstico del miR-199b en el NSCLC con K-Ras mutado. Se analizaron los niveles de expresión en 2 líneas celulares de NSCLC (H1975 y H522) con K-Ras mutado mediante un *array* de miARNs. Se observó una baja expresión del miR-199b en ambas líneas, que mediante un análisis de supervivencia Kaplan-Meyer se correlacionó con una baja supervivencia de los pacientes NSCLC (20).

### **3.10-Meduloblastoma (MB)**

Garzia et al. (27) al analizar la expresión del miR-199b en 61 pacientes con MB, observaron que la expresión de éste en los casos que presentaban metástasis (M1, M2 y M3) fue mucho menor que en aquellos no metastásicos (M0). La expresión del miR-199b se correlaciona con el grado de diseminación de la metástasis. Mediante las curvas de supervivencia se pudo observar que los pacientes con altos niveles de expresión del miR-199b tenían una mayor supervivencia general que aquellos que presentaban bajos niveles de expresión. Sin embargo, el análisis estadístico long Rank test de estas curvas no mostró diferencias significativas, probablemente debido a los pocos pacientes a los que se les hizo el seguimiento. A pesar de esto, la expresión del miR-199b se considera un nuevo marcador molecular que podría identificar a aquellos pacientes MB de bajo riesgo con posibilidades de desarrollar un tumor agresivo y metástasis (27).

### **3.11-Osteosarcoma (OS)**

En el estudio realizado por Haibin Zeng et al. (71) se validó la expresión del miR-199b con una qRT-PCR en 98 muestras de tejido OS y en el tejido normal adyacente. Se observó que los niveles de expresión del miARN en las muestras OS fueron mucho más altos que en las de tejido normal y mediante un análisis long Rank se estableció un valor de corte para la expresión del miR-199b de 4,35 que permitía diferenciar entre las muestras con alta y baja expresión. Además, la expresión del miR-199b en el OS se correlacionó de forma positiva con un estado avanzado TNM, metástasis y recurrencia de la enfermedad. Para estudiar el valor pronóstico del miR-199b, se llevó a cabo un análisis de supervivencia Kaplan-Meyer en el que los pacientes con alta expresión del miARN presentaron una supervivencia general menor. También se realizó un análisis Cox con el que se identificaron el estatus de la metástasis, la expresión del miR-199b, el estatus de recurrencia y la respuesta a la quimioterapia pre-operativa como factores de pronóstico independientes de una peor supervivencia. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el estudio de Chen et al.(37), en el que al analizar la expresión del miR-199b en 57 muestras de tejido OS, ésta se asoció de forma positiva con el estado TNM, la metástasis distante y de nódulos linfáticos y una pobre supervivencia general. Todo esto sugiere que el miR-199b podría ser usado como biomarcador de pronóstico en el OS (37) (72) (73).

### 3.12-Carcinoma papilar de tiroides (PTC)

En un estudio (73) se analizó la expresión del miR-199b mediante qRT-PCR en muestras de tejido PTC, tejido tumoral benigno de nódulos de tiroides y tejidos adyacentes no tumorales. En ambos tejidos tumorales, la expresión del miR-199b fue menor que en los tejidos no tumorales. Sin embargo, los niveles del miARN en las muestras PTC fueron menores que en las de tejido tumoral benigno. Al analizar el valor diagnóstico del miR-199b, se elaboró una curva ROC (AUC= 0,805) para distinguir muestras PTC de tumores benignos de nódulos de tiroides, gracias a la cual se estableció un valor de corte de -6,21 con una especificidad del 72,2% y una sensibilidad del 81,2%. Además, los bajos niveles del miR-199b en PTC se asociaron con la capacidad de invasión tumoral y metástasis en los ganglios linfáticos. Por último, según el análisis de supervivencia, también se relacionaron con una baja supervivencia general (67) (74).

### 3.13-Tumor paratiroides

Los tumores paratiroides pueden ser de dos tipos, esporádicos o hereditarios. Estos se desarrollan de forma diferente de manera que a la hora de escoger el tipo de tratamiento, la discriminación entre ambos es importante. Por esta razón, Hwang et al. (74) realizaron un *microarray* de miARNs en 8 muestras de tejido (normal, tumoral paratiroides esporádico y hereditario) para identificar aquellos miARNs que se expresaban de forma diferente entre los tumores paratiroides esporádicos y hereditarios. Mediante este análisis se detectaron 10 miARNs con la expresión alterada. Los resultados del *microarray* fueron validados mediante una qRT-PCR de 24 muestras de tejido normal paratiroides, 25 de tejido tumoral paratiroides esporádico y 12 de hereditario. Se observó que la expresión del miR-199b era la única que cambiaba de forma significativa entre las muestras de tejido normal y las de ambos tipos de tumores, siendo baja en tumores hereditarios y alta en los esporádicos. Tras obtener estos resultados se elaboró una curva ROC para estudiar el valor diagnóstico del miR-199b al distinguir entre ambos tipos de tumores. Se obtuvo una AUC de 0,863 ( $p < 0,001$ ) y una sensibilidad y especificidad para diferenciar tumores hereditarios de esporádicos paratiroides del 67% y 100% respectivamente. Todo esto sugiere que los cambios en los niveles de expresión del miR-199b entre los tumores paratiroides esporádicos y hereditarios podrían ser usados como biomarcador de diagnóstico para distinguir entre estos tumores con diferente origen genético (75).

### 3.14-Cáncer rectal localmente avanzado (LARC)

El tratamiento estándar del LARC consiste en una quimioterapia pre-operativa basada en 5-FU seguida de una cirugía de escisión mesorrectal total. El problema es que la quimioterapia pre-operativa no siempre es lo suficientemente efectiva. Por tanto la identificación de biomarcadores como el miR-199b que permitan seleccionar aquellos pacientes con una mayor posibilidad de responder positivamente a la quimioterapia pre-operativa, es de gran importancia a la hora de reducir la morbilidad por tratamiento y los retrasos en la cirugía, así como la hora de ofrecer a los pacientes que no responden a la quimioterapia pre-operativa tratamientos alternativos.

Cristobal et al. (62), para evaluar el valor predictivo del miR-199b, cuantificaron mediante una qRT-PCR su expresión en 110 pacientes LARC. Observaron una baja expresión del miR-199b en aquellos pacientes que no respondían a la quimioterapia pre-operativa. Por tanto, la baja expresión de este miARN, se asocia una mala respuesta a este tratamiento. Además, los bajos niveles de expresión del miR-199b, también se relacionaron con invasión de los ganglios linfáticos tras el tratamiento, un estadio patológico avanzado y una menor supervivencia general y libre de enfermedad (62).

Tabla 3: Valor clínico del miR-199b como biomarcador en diferentes cánceres

microARN	Tipo de cáncer	Tipo de biomarcador	Nivel de expresión	Significado clínico	Muestra	Referencia
miR-10b, miR-139-5p, miR-130b y miR-199b-5p	Carcinoma de células renales metastático (mRCC)	Diagnóstico	↑(miR-130b, miR-199b-5p), ↓(miR-10b, miR-139-5p)	Distingue muestras con alto o bajo riesgo de metástasis	Tejido	69
		Pronóstico		Peor supervivencia media		
miR-100, miR-99a y miR-199b	Carcinoma endometrial (ECC)	Diagnóstico y pronóstico	↓	Distinguen entre muestras ECC y normales y una peor supervivencia media	Tejido	33
miR-199b y miR-99a					Plasma	
miR-199b	Cáncer de ovario	Pronóstico	↓	Baja supervivencia general	Tejido	14
		Predictivo		Quimiorresistencia al cisplatino		
miR-199b	Cáncer de mama	Diagnóstico	↓	Estado avanzado TNM y metástasis en nódulos linfáticos	Tejido	70
		Pronóstico		Baja supervivencia general		
miR-199b	Carcinoma hepatocelular (HCC)	Diagnóstico	↓	Estado avanzado TNM	Tejido	46
		Pronóstico		Baja supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad		
miR-15a, miR-34c y miR-199b	Carcinoma escamoso de cabeza y cuello (HNSCC)	Diagnóstico	↓	Invasión de nódulos linfáticos e invasión perineural	Tejido	71
miR-199b	Leucemia mieloide aguda (AML)	Pronóstico	↓	Baja supervivencia general	Tejido	56
miR-199b	Cáncer de pulmón de células pequeñas (NSCLC)	Pronóstico	↓	Baja supervivencia general	Tejido	20

miR-199b	Meduloblastoma (MB)	Diagnóstico	↓	Identifica el desarrollo y grado de diseminación de metástasis	Tejido	27
miR-199b	Osteosarcoma (OS)	Pronóstico	↑	Baja supervivencia general	Tejido	37,72,73
		Diagnóstico		Estado avanzado TNM, metástasis y recurrencia de la enfermedad		
miR-199b	Carcinoma papilar de tiroides (PTC)	Pronóstico	↓	Baja supervivencia general	Tejido	67,74
		Diagnóstico		Distingue muestras PTC de tumores benignos de nódulos de tiroides mayor invasibilidad y metástasis en los ganglios linfáticos		
miR-199b	Cáncer colorrectal (CRC)	Pronóstico	↓	Baja supervivencia media y una supervivencia libre de progresión	Tejido	61,64
		Predictivo		Baja eficacia de tratamientos basados en oxaliplatino		
		Diagnóstico		Avanzado estado TNM, desarrollo de metástasis linfática y metástasis sincrónica en el momento del diagnóstico		
miR-199b	Tumor paratiroides esporádicos	Diagnóstico	↓	Discrimina entre tumores paratiroides de origen esporádicos o hereditarios	Tejido	75
	Tumores paratiroides hereditarios		↑			
miR-199b	Cáncer rectal localmente avanzado (LARC)	Predictivo	↓	Respuesta a la quimioterapia pre- operativa	Tejido	62
		Pronóstico		Baja supervivencia general y supervivencia libre de enfermedad		
		diagnóstico		Estadío patológico avanzado		

#### **4-CONCLUSIÓN**

Tal y como se ha discutido a lo largo de toda esta revisión, el miR-199b juega un papel regulador muy importante durante el proceso de la tumorigénesis. Puede actuar como un oncogén o un supresor tumoral al inhibir o estimular la proliferación celular, el crecimiento tumoral, apoptosis y metástasis en muchos tipos de líneas celulares cancerígenas y modelos xenógrafos. Gracias a esto, es un excelente candidato para ser utilizado como diana terapéutica a la hora de tratar tumores humanos. Aunque para ello aún quede mucho camino por delante.

Por otro lado, numerosos estudios proponen el uso de este miR-199b como biomarcador clínico de diagnóstico y pronóstico en varios tipos de cánceres. Las alteraciones en los niveles de expresión de este miARN permiten llevar a cabo un diagnóstico temprano de la enfermedad y su estado, así como predecir cómo responderá el paciente a un tratamiento determinado. Estos dos sucesos son claves a la hora de reducir la mortalidad y frenar la progresión de la enfermedad. Además, las alteraciones en la expresión del miR-199b también se han asociado con el pronóstico y la supervivencia clínica de los pacientes. Sin embargo, estos estudios presentan ciertas limitaciones, ya que muchos de ellos han sido realizados con un número muy pequeño de muestras y aún no se han llevado a cabo ensayos que confirmen y validen el valor clínico de este miARN. De manera que es necesario realizar más estudios que verifiquen estos resultados para poder confirmar el papel que juega el miR-199b en cada cáncer.

## **5-AUTOEVALUACIÓN:**

En este trabajo de fin de grado se ha llevado a cabo una revisión bibliográfica sobre el significado clínico y funcional del microARN-199b en el cáncer humano, cuyo objetivo es conseguir que el lector se haga una idea general de la situación actual en la que se encuentra el tema en cuestión. Por esta razón, se ha realizado una exhaustiva búsqueda de información a partir de una gran cantidad de artículos para así poder elaborar un documento que recopile todos los estudios que existen hasta el momento sobre el microARN-199b en el cáncer humano.

Mediante este trabajo, he mejorado mi capacidad de búsqueda de información en bases de datos como *Pubmed*. Gracias al empleo de palabras clave y la lectura de resúmenes he podido seleccionar aquellos artículos de mayor relevancia e interés, así como diferenciar entre los publicados en revistas con un alto o bajo índice de impacto. También he aprendido a extraer y sintetizar rápidamente la información más importante de cada artículo. Además, al existir tantos documentos publicados, he tenido que analizar y comparar los datos obtenidos para evitar la repetición de información y poder escoger los artículos más actuales, con resultados más fiables y menos puntos débiles. Por otro lado, cabe destacar que para la realización de muchos de estos estudios se usaron técnicas que he estudiado a lo largo de la carrera como el aislamiento de ARN, qRT-PCR, *Wester-blot*, citometría de flujo o ensayos de luciferasa y al ver cómo han sido empleadas en estudios reales, he podido mejorar mis conocimientos acerca de ellas. Además, he conocido otras técnicas nuevas como el ensayo *wound healing* y el ensayo *transwell*. Por último, y debido a su complejidad, he aprendido lo básico acerca de los diferentes métodos estadísticos que se usan para evaluar los biomarcadores (curvas de supervivencia Kaplan-Meyer o análisis Cox entre otros).

Gracias a todo esto he adquirido gran cantidad de conocimientos sobre el microARN-199b, su influencia en una gran variedad de cánceres y cómo realizar estudios que evalúen sus efectos sobre los distintos tipos de tumores y su potencial como biomarcador y diana terapéutica.

## **6-BIBLIOGRAFÍA:**

1. Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424.
2. Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A. (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends - An update. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, 26(1), 16-27.
3. Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646-674.
4. Liu, J. (2018). The dualistic origin of human tumors. *Seminars in Cancer Biology*, 53, 1-16.
5. Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451-5465.
6. Hammond, S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 87, 3-14.
7. Si, W., Shen, J., Zheng, H., & Fan, W. (2019). The role and mechanisms of action of microRNAs in cancer drug resistance. *Clinical Epigenetics*, 11.
8. Tutar, L., Tutar, E., Özgür, A., & Tutar, Y. (2015). Therapeutic Targeting of microRNAs in Cancer: Future Perspectives. *Drug Development Research*, 76(7), 382-388.
9. Khan, A., Ahmed, E., Elareer, N., Junejo, K., Steinhoff, M., & Uddin, S. (2019). Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. *Cells*, 8(8).
10. Tutar, L., Tutar, E., Özgür, A., & Tutar, Y. (2015). Therapeutic Targeting of microRNAs in Cancer: Future Perspectives. *Drug Development Research*, 76(7), 382-388.
11. Shah, M. Y., Ferrajoli, A., Sood, A. K., Lopez-Berestein, G., & Calin, G. A. (2016, October 1). micro ARN Therapeutics in Cancer — An Emerging Concept. *EBioMedicine*, 12, 34-42.
12. Favreau, A. J., McGlaufflin, R. E., Duarte, C. W., & Sathyanarayana, P. (2016). MiR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Experimental Hematology and Oncology*, 5(1), 1-11.
13. Wang, Q., Ye, B., Wang, P., Yao F., Zhang, C., Yu, G. (2019). Overview of microRNA-199a Regulation in Cancer. *Cancer management and research*, 11, 10327—10335.
14. Liu, M. X., Siu, M. K. Y., Liu, S. S., Yam, J. W. P., Ngan, H. Y. S., & Chan, D. W. (2014). Epigenetic silencing of microRNA-199b-5p is associated with acquired chemoresistance via activation of JAG1-Notch1 signaling in ovarian cancer. *Oncotarget*, 5(4), 944–958.
15. Li, Y., Zhang, G., Wu, B., Yang, W., & Liu, Z. (2019). MiR-199a-5p Represses Protective Autophagy and Overcomes Chemoresistance by Directly Targeting DRAM1 in Acute Myeloid Leukemia. *Jou ARNI of Oncology*, 1-16.
16. Andolfo, I., Liguori, L., De Antonellis, P., Cusanelli, E., Marinaro, F., Pistollato, F., Zollo, M., et al. (2012). The micro- ARN 199b-5p regulatory circuit involves

- Hes1, CD15, and epigenetic modifications in medulloblastoma. *Neuro-Oncology*, 14(5), 596–612.
17. Wu, A., Chen, Y., Liu, Y., Lai, Y., & Liu, D. (2018). MiR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1. *Oncology Letters*, 16(4), 4889–4896.
  18. Zhou, S. J., Liu, F. Y., Zhang, A. H., Liang, H. F., Wang, Y., Ma, R., Sun, N. F., et al. (2017). MicroRNA-199b-5p attenuates TGF- $\beta$ 1-induced epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *British Journal of Cancer*, 117(2), 233–244.
  19. Cristóbal, I., Torrejón, B., Rubio, J., Santos, A., Pedregal, M., Caramés, C., García-Foncillas, J., et al. (2019). Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *Jou ARNI of Clinical Medicine*, 8(3), 1-14.
  20. Jin, H., Jang, Y., Cheng, N., Li, Q., Cui, P. F., Zhou, Z. W., Xu, C. X., et al. (2019). Restoration of mutant K-Ras repressed miR-199b inhibits K-Ras mutant non-small cell lung cancer progression. *Jou ARNI of Experimental and Clinical Cancer Research*, 38(1), 1-11.
  21. Peng, Y., Li, C., Luo, D. C., Ding, J. W., Zhang, W., & Pan, G. (2014). Expression profile and clinical significance of Micro ARNs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules*, 19(8), 11586–11599.
  22. Kim, Y. H., Goh, T. S., Lee, C. S., Oh, S. O., Kim, J. I., Jeung, S. H., & Pak, K. (2017). Prognostic value of micro ARNs in osteosarcoma: A meta-analysis. *Oncotarget*, 8(5), 1–12.
  23. Lan, H., Lu, H., Wang, X., & Jin, H. (2015). Micro ARNs as potential biomarkers in cancer: Opportunities and challenges. *BioMed Research Inte ARNtional*, 1-17.
  24. Kopan, R., & Ilagan, M. X. G. (2009). The Canonical Notch Signaling Pathway: Unfolding the Activation Mechanism. *Cell*, 137(2), 216-233.
  25. Li, L., Tang, P., Li, S., Qin, X., Yang, H., Wu, C., & Liu, Y. (2017). Notch signaling pathway networks in cancer metastasis: a new target for cancer therapy. *Medical Oncology*, 34(180), 1-10.
  26. Siebel, C., & Lendahl, U. (2017). Notch signaling in development, tissue homeostasis, and disease. *Physiological Reviews*, 97(4), 1235–1294.
  27. Garzia, L., Andolfo, I., Cusanelli, E., Marino, N., Petrosino, G., De Martino, D., Zollo, M., et al. (2009). Micro ARN-199b-5p impairs cancer stem cells through negative regulation of HES1 in medulloblastoma. *PLoS ONE*, 4(3), 1-14.
  28. Shalaby, T., Fiaschetti, G., Baumgartner, M., & Grotzer, M. A. (2014). Significance and therapeutic value of mi ARNs in embryonal neural tumors. *Molecules*, 19 (5), 5821-5861.
  29. Takahashi, R. U., Miyazaki, H., & Ochiya, T. (2013). The role of micro ARNs in the regulation of cancer stem cells. *Frontiers in Genetics*, 4, 1-11.
  30. Yang, Q., Wei, J., & Hou, P. (2019). Emerging role of PI3K/AKT in tumor-related epigenetic regulation. *Seminars in cancer biology*, 59, 112-124.
  31. Guo, H., German, P., Bai, S., Barnes, S., Guo, W., Qi, X., Lou, H., Liang, J., Jonasch, E., Mills, G.B., & Ding, Z. (2015). The PI3K/AKT Pathway and Renal Cell Carcinoma. *Journal of genetics and genomics*, 47(2), 343-353.

32. Pompura, L.S., & Dominguez-Villar, M. (2018). The PI3K/AKT signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function. *Journal of leukocyte biology*, 103 (6), 1065-1076.
33. Torres, A., Torres, K., Pesci, A., Ceccaroni, M., Paszkowski, T., Cassandrini, P., Maciejewski, R., et al. (2012). Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma. *BMC Cancer*, 12(369), 1-13.
34. Cai, J., Zhang, Y., Huang, S., Yan, M., Li, J., Jin, T., Bao, S. (2017). MiR-100-5p, miR-199a-3p and miR-199b-5p induce autophagic death of endometrial carcinoma cell through targeting mTOR. *International Journal of Clinic and Experimental Pathology*, 10(9), 9262-9272.
35. Onorati, A. V., Dyczynski, M., Ojha, R., & Amaravadi, R. K. (2018, August 1). Targeting autophagy in cancer. *Cancer*, 124(16), 3307-3318.
36. Yuan, J. hang, Yang, F., Wang, F., Ma, J. zhao, Guo, Y. jun, Tao, Q. fei, Sun, S. han., et al. (2014). A Long Noncoding ARN Activated by TGF- $\beta$  promotes the invasion-metastasis cascade in hepatocellular carcinoma. *Cancer Cell*, 25(5), 666–681.
37. Chen, Z., Zhao, G., Zhang, Y., Ma, Y., Ding, Y., & Xu, N. (2018). MiR-199b-5p promotes malignant progression of osteosarcoma by regulating HER2. *Journal of B.U.ON.*, 23(6), 1816–1824.
38. Sun, Y., Wen-Zhou, L., Liu, T., Feng, X., Yang, N., & Zhou, H.F. (2015). Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. *Journal of receptors and signal transductions*, 35(6), 600-604.
39. Shaul, Y. D., & Seger, R. (2007). The MEK/ERK cascade: From signaling specificity to diverse functions. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 177(8), 1213-1226.
40. Keshet, Y., & Seger, R. (2010). The MAP kinase signalling cascades: a system of hundreds of components regulates a diverse array of physiological functions. *Methods in Molecular Biology*, 66, 3-38.
41. Fang, C., Zhao, Y., & Guo, B. (2013). MiR-199b-5p targets HER2 in breast cancer cells. *Jou ARNI of Cellular Biochemistry*, 114(7), 1457–1463.
42. Guan, S. Y., Leng, R. X., Tao, J. H., Li, X. P., Ye, D. Q., Olsen, N., Pan, H. F., et al. (2017). Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ : a promising therapeutic target for autoimmune diseases. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 1(7), 715-723.
43. Zhang, F. J., Luo, W., & Lei, G. H. (2015). Role of HIF-1 $\alpha$  And HIF-2 $\alpha$  In osteoarthritis. *Joint Bone Spine*, 82(3), 144-147.
44. Carrol, A. V., & Ashcroft, M. (2006). Role of Hypoxia-Inducible Factor (HIF)-1 $\alpha$  versus HIF-2 $\alpha$  in the Regulation of HIF Target Genes in Response to Hypoxia, Insulin-Like Growth Factor-I, or Loss of von Hippel-Lindau Function: Implications for Targeting the HIF Pathway. *Cancer Research*, 66(12), 6264-6270.
45. Shang, W., Chen, X., Nie, L., Xu, M., Chen, N., Zeng, H., & Zhou, Q. (2013). MiR199b suppresses expression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) in prostate cancer cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(4), 8422–8436.
46. Wang, C., Song, B., Song, W., Liu, J., Sun, A., Wu, D., Han, J., et al (2011). Underexpressed microRNA-199b-5p targets Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  in

- hepatocellular carcinoma and predicts prognosis of hepatocellular carcinoma patients. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26(11), 1630–1637.
47. Hwang, S., Jeong, J. J., Kim, S. H., Chung, Y. J., Song, S. Y., Lee, Y. J., & Rhee, Y. (2018). Differential expression of miRNA199b-5p as a novel biomarker for sporadic and hereditary parathyroid tumors. *Scientific Reports*, 8(1), 1-8.
  48. Caramel, J., Ligier, M., & Puisieux, A. (2018). Pleiotropic roles for ZEB1 in cancer. *Cancer Research*, 78(1), 30-35.
  49. Wang, J., Zhou, F., Yin, L., Zhao, L., & Zhang, Y. (2017). MicroRNA-199b targets the regulation of ZEB1 expression to inhibit cell proliferation, migration and invasion in non-small cell lung cancer. *Molecular Medicine Reports*, 16(4), 5007-5014.
  50. Li, W., Li, Y., Guo, J., Pan, H., Zhang, Y., & Wang, X. (2015). Overexpression of miR-199b-5p inhibits Ewing's sarcoma cell lines by targeting CCNL1. *Molecular Medicine Reports*, 12(3), 3359–3364.
  51. Peng, L., Yanjiao, M., Ai-guo, W., Pengtao, G., Jianhua, L., Ju, Y., Xichen, Z., et al. (2011). A fine balance between CCNL1 and TIMP1 contributes to the development of breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 409(2), 344–349.
  52. Sticht, C., Hofele, C., Flechtenmacher, C., Bosch, F. X., Freier, K., Lichter, P., & Joos, S. (2005). Amplification of Cyclin L1 is associated with lymph node metastases in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *British Journal of Cancer*, 92(4), 770–774.
  53. Yeh, Y. C., Lin, H. H., & Tang, M. J. (2019). Dichotomy of the function of DDR1 in cells and disease progression. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1866(11), 1-11.
  54. Reger de Moura, C., Battistella, M., Sohail, A., Caudron, A., Feugeas, J. P., Podgorniak, M. P., Jouenne, F. et al. (2019). Discoidin domain receptors: A promising target in melanoma. *Pigment Cell and Melanoma Research*, 32(5), 697–707.
  55. Wu, A., Chen, Y., Liu, Y., Lai, Y., & Liu, D. (2018). MiR-199b-5p inhibits triple negative breast cancer cell proliferation, migration and invasion by targeting DDR1. *Oncology Letters*, 16(4), 4889–4896.
  56. Favreau, A. J., McGlaufflin, R. E., Duarte, C. W., & Sathyanarayana, P. (2016). MiR-199b, a novel tumor suppressor miRNA in acute myeloid leukemia with prognostic implications. *Experimental Hematology and Oncology*, 5(1), 1-11.
  57. Favreau, A. J., Cross, E. L., & Sathyanarayana, P. (2012). MiR-199b-5p directly targets PODXL and DDR1 and decreased levels of miR-199b-5p correlate with elevated expressions of PODXL and DDR1 in acute myeloid leukemia. *American Journal of Hematology*, 87(4), 442-446.
  58. Cristóbal, I., Torrejón, B., Rubio, J., Santos, A., Pedregal, M., Caramés, C., García-Foncillas, J., et al. (2019). Deregulation of SET is Associated with Tumor Progression and Predicts Adverse Outcome in Patients with Early-Stage Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Medicine*, 8(3), 346-360.
  59. Enjoji, S., Yabe, R., Tsuji, S., Yoshimura, K., Kawasaki, H., Sakurai, M., Sato, K., et al. (2018). Stemness is enhanced in gastric cancer by a SET/PP2A/E2F1 axis. *Molecular Cancer Research*, 16(3), 554–563.
  60. Chao, A., Tsai, C. L., Wei, P. C., Hsueh, S., Chao, A. S., Wang, C. J., Lai, C. H., et al. (2010). Decreased expression of microRNA-199b increases protein

- levels of SET (protein phosphatase 2A inhibitor) in human choriocarcinoma. *Cancer Letters*, 291(1), 99–107.
61. Cristóbal, I., Caramés, C., Rincón, R., Manso, R., Madoz-Gúrpide, J., Torrejón, B., García-Foncillas, J., et al. (2017). Downregulation of microRNA-199b predicts unfavorable prognosis and emerges as a novel therapeutic target which contributes to PP2A inhibition in metastatic colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(25), 40169–40180.
  62. Cristobal, I., Rubio, J., Santos, A., Torrejón, B., Caramés, C., Imedio, L., Mariblanca, S., Luque, M., et al. (2020). MicroARN-199b downregulation confers resistance to 5-fluoruracil treatment and predicts poor outcome and response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer patients. *Cancers*, 12(5), 1-14.
  63. Ong, A. L. C., & Ramasamy, T. S. (2018). Role of Sirtuin1-p53 regulatory axis in aging, cancer and cellular reprogramming. *Ageing Research Reviews*, 43, 64-80.
  64. Shen, Z. L., Wang, B., Jiang, K. W., Ye, C. X., Cheng, C., Yan, Y. C., Wang, S., et al. (2016). Downregulation of miR-199b is associated with distant metastasis in colorectal cancer via activation of SIRT1 and inhibition of CREB/KISS1 signaling. *Oncotarget*, 7(23), 35092–35105.
  65. Lai, Y., Quan, J., Hu, J., Chen, P., Xu, J., Guan, X., Ni, L., et al. (2018). MiR-199b-5p serves as a tumor suppressor in renal cell carcinoma. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 16(1), 436–444.
  66. Li, S., Hang, L., Ma, Y., & Wu, C. (2016). Distinctive microRNA expression in early stage nasopharyngeal carcinoma patients. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 20(12), 2259–2268.
  67. Sun, X., Zhang, W., Li, H., Niu, C., Ou, Y., Song, L., & Zhang, Y. (2017). Stonin2 overexpression is correlated with unfavorable prognosis and tumor invasion in epithelial ovarian cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 18(8), 1-14.
  68. Ren, L., Xu, Y., Qin, G., Liu, C., Yan, Y., & Zhang, H. (2019). miR-199b-5p-Stonin 2 axis regulates metastases and epithelial-to-mesenchymal transition of papillary thyroid carcinoma. *IUBMB Life*, 71(1), 28–40.
  69. Wu, X., Weng, L., Li, X., Guo, C., Pal, S. K., Jin, J. M., Wu, H., et al. (2012). Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS ONE*, 7(5), 1-10.
  70. Fang, C., Wang, F. B., Li, Y., & Zeng, X. T. (2016). Down-regulation of miR-199b-5p is correlated with poor prognosis for breast cancer patients. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 1189–1193.
  71. Sousa, L. O., Sobral, L. M., Matsumoto, C. S., Saggiaro, F. P., López, R. V. M., Panepucci, R. A., Leopoldino, A. M., et al. (2016). Lymph node or perineural invasion is associated with low miR-15a, miR-34c and miR-199b levels in head and neck squamous cell carcinoma. *BBA Clinical*, 6, 159–164.
  72. Zeng, H., Zhang, Z., Dai, X., Chen, Y., Ye, J., & Jin, Z. (2016). Increased Expression of microRNA-199b-5p Associates with Poor Prognosis Through Promoting Cell Proliferation, Invasion and Migration Abilities of Human Osteosarcoma. *Pathology and Oncology Research*, 22(2), 253–260.

- 73.** Kim, Y. H., Goh, T. S., Lee, C. S., Oh, S. O., Kim, J. I., Jeung, S. H., & Pak, K. (2017). Prognostic value of microRNAs in osteosarcoma: A meta-analysis. *Oncotarget*, *8*(5), 1–12.
- 74.** Peng, Y., Li, C., Luo, D. C., Ding, J. W., Zhang, W., & Pan, G. (2014). Expression profile and clinical significance of MicroRNAs in papillary thyroid carcinoma. *Molecules*, *19*(8), 11586–11599.
- 75.** Hwang, S., Jeong, J. J., Kim, S. H., Chung, Y. J., Song, S. Y., Lee, Y. J., & Rhee, Y. (2018). Differential expression of miRNA199b-5p as a novel biomarker for sporadic and hereditary parathyroid tumors. *Scientific Reports*, *8*(1), 1-8.