

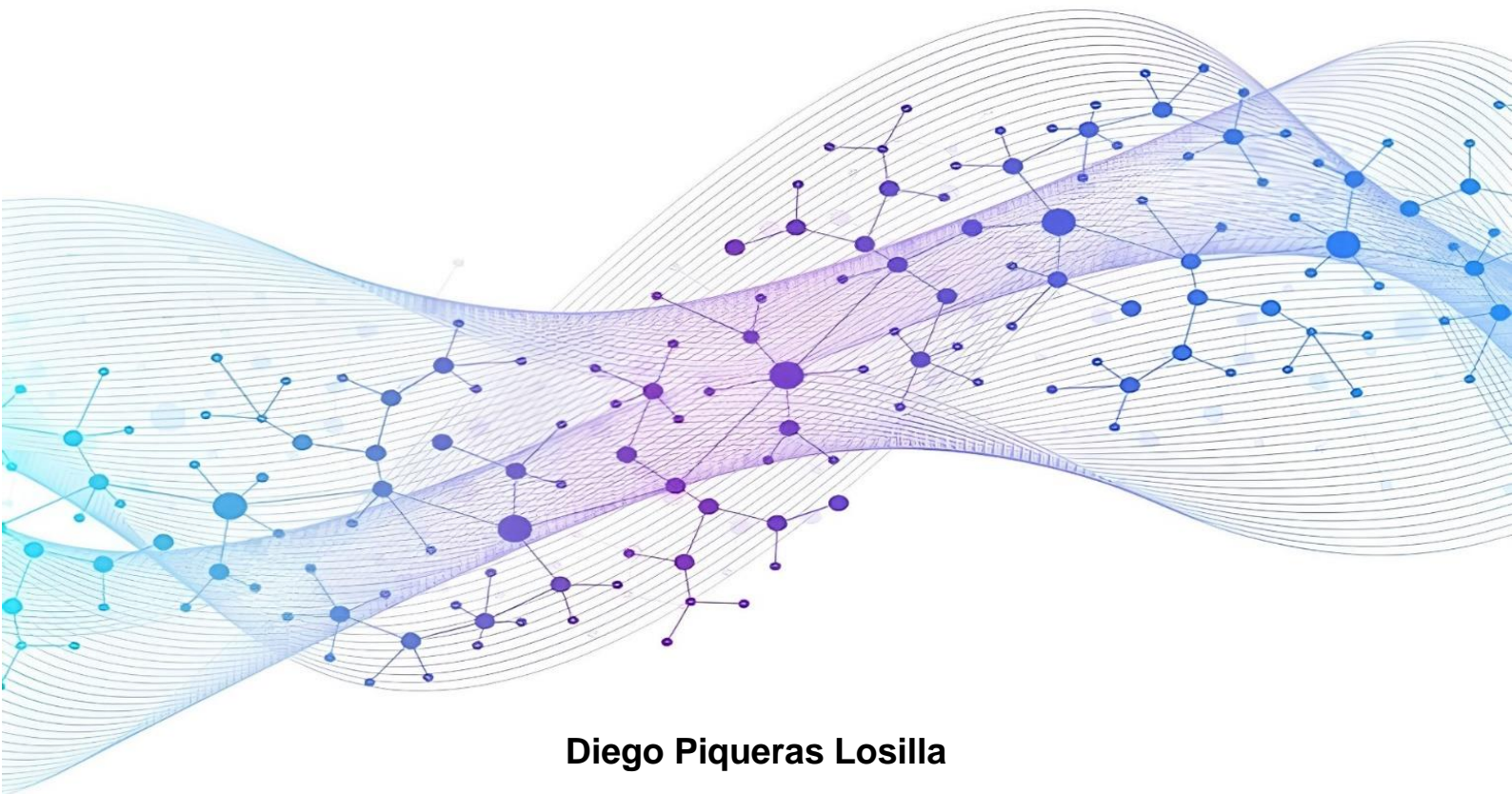


UNIVERSITAT  
ROVIRA I VIRGILI



# Evaluación de microRNA como diana terapéutica en caquexia cancerosa

TRABAJO FINAL DE GRADO BIOTECNOLOGÍA



**Diego Piqueras Losilla**

Tutor académico: Ricardo Román Cordero Otero; Departamento de Bioquímica y biotecnología;

[ricardo.cordero@urv.cat](mailto:ricardo.cordero@urv.cat)

En cooperación con: ARTHEx Biotech

Supervisor: Estefanía Cerro Herreros; Directora científica de Arthex Biotech;

[ecerro@arthexbiotech.com](mailto:ecerro@arthexbiotech.com)

Junio 2022



## **Declaración de responsabilidad**

Yo, Diego Piqueras Losilla, con DNI 53789387-T, soy conocedor de la guía de prevención del plagio en la URV *Prevenió, detecció i tractament del plagi en la docència: guía per a estudiants* (aprobada el julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como a plagio por la URV.

Tarragona, 7 de junio de 2022.

# Índice

<b>Datos del centro .....</b>	<b>6</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>7</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>10</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>14</b>
<b>Metodología.....</b>	<b>16</b>
Modelos tumorales experimentales y tratamiento con formoterol .....	16
Hepatoma ascítico Yoshida AH-130 .....	16
Carcinoma pulmonar de Lewis.....	16
Tratamiento con Formoterol.....	17
Extracción de miRNA .....	17
qRT-PCR .....	18
Análisis estadístico .....	18
Expresión de miRNAs candidatos en órganos y tejidos (Zenbu).....	19
<b>Resultados .....</b>	<b>20</b>
Objetivo1. Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular de 2 modelos caquéctico.....	20
1.1 Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular en ratas portadoras del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130 (AH-130) 7 días después de la inoculación del tumor.....	20
1.2 Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular en ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) 14 días después de la inoculación del tumor. ....	20
Objetivo 2: Análisis de la expresión de miRNAs candidatos en modelos tumorales de AH-130 y LLC y posterior validación con un anticaquéctico (Formoterol). ....	22

2.1	Expresión relativa de miR-29b en músculo caquético y tratado con Formoterol .....	22
2.2	Expresión relativa de miR-199a en músculo caquético y tratado con Formoterol .....	23
2.3	Expresión relativa de miR-424 en músculo caquético y tratado con Formoterol .....	25
2.4	Expresión relativa de miR-23b en músculo caquético y tratado con Formoterol .....	26
	Objetivo 3: Análisis de la expresión de los miRNAs candidatos en los diferentes músculos de estudio y tejidos de interés.....	28
3.1	Niveles de expresión de miRNAs en el modelo tumoral AH-130 .....	28
3.2	Niveles de expresión de miRNAs en el modelo tumoral LLC.....	29
3.3	Niveles de expresión de miRNAs en tejidos en tejidos relevantes.....	30
	<b>Discusión de resultados .....</b>	<b>32</b>
	<b>Conclusión .....</b>	<b>36</b>
	<b>Agradecimientos .....</b>	<b>38</b>
	<b>Referencias .....</b>	<b>40</b>
	<b>Autoevaluación .....</b>	<b>44</b>



## Datos del centro

ARTHEX biotech es una empresa biotecnológica-farmacéutica spin-off de la Universidad de Valencia centrada en el desarrollo de tratamientos de RNA antisentido para enfermedades genéticas, generalmente antimicroRNA. Los miRNA son una clase de moléculas de ARN no codificantes que desempeñan un papel esencial en la regulación de la expresión génica al inhibir la síntesis de proteínas.

Arthex está desarrollando la tecnología AntimiR que inhibe el microARN con un alto nivel de especificidad gracias a la complementariedad de secuencias. Para el diseño de estos AntimiR, la empresa diseña una mejora química de los mismo para aumentar la afinidad de unión, la estabilidad y la biodistribución para mejorar la eficacia terapéutica.

Por lo general, sus investigaciones se basan en la búsqueda y desarrollo de terapias para enfermedades neuromusculares con necesidades médicas no cubiertas. Su primer producto será el desarrollo de un nuevo fármaco ATX-01 dirigido al tratamiento de la distrofia miotónica (DM), aunque no se trata de la única línea de investigación del centro, entre su cartera de desarrollo también están abriendo nuevas líneas de investigación en distrofia miotónica de tipo 2, osteoartritis o caquexia.

El modelo de negocio se basa en un modelo de innovación abierta en el que la empresa biotecnológica desarrolla los productos hasta la fase 2 de ensayos clínicos (eficacia). Luego los licencia a multinacionales farmacéuticas con capacidad para completar los estudios de desarrollo más avanzados y su comercialización.

## **Abstract**

Cancer cachexia is a multifactorial syndrome that concerns the wasting of adipose tissue and the loss of skeletal muscle function as a consequence of cancer. This study aims to evaluate the involvement of microRNAs in cachexia and to determine potential therapeutic targets. Two microRNAs (miR-29b and miR-424), whose expression levels were increased in cachectic muscle, have demonstrated their involvement in the disease, thus have been featured as potential therapeutic targets. The miR-424 stands out for presenting a better prognosis in the development of therapy. On the other hand, formoterol has also been evaluated as a potent anticachectic, which shows to recover abnormal expression levels in microRNAs involved in cancer cachexia.

**Keywords:** cancer cachexia, miRNA, formoterol, mouse, rat, skeletal muscle.

## Resumen

La caquexia cancerosa es un síndrome multifactorial que concierne la consunción del tejido adiposo y la pérdida de funcionalidad del músculo esquelético como consecuencia de la aparición del cáncer. Este trabajo pretende evaluar la implicación de microRNAs en la aparición de la caquexia en el músculo además de determinar potenciales dianas terapéuticas para ésta. Dos microRNA (miR-29b y miR-424), cuyos niveles de expresión están aumentados en el músculo caquético, han demostrado su implicación en la enfermedad y se han presentado como posibles dianas terapéuticas. Destaca el miR-424 por presentar mejor pronóstico en el desarrollo de la terapia. Por otro lado, también se ha evaluado el formoterol como un potente anticaquético, el cual ha demostrado recuperar niveles de expresión anómalos en los microRNAs implicados en la caquexia cancerosa.

**Palabras clave:** caquexia cancerosa, miRNA, formoterol, ratón, rata, músculo esquelético.



## Introducción

La caquexia cancerosa es un trastorno caracterizado por la pérdida de peso corporal principalmente por la merma de músculo esquelético y tejido adiposo en pacientes con cáncer. La interacción entre las células tumorales y el tejido no tumoral resulta en la pérdida de masa muscular impulsada por una serie de cambios metabólicos como un elevado gasto energético, un exceso de catabolismo y la aparición de inflamación (Baracos et al. 2018). Además, en el músculo caquético se observan anomalías en el metabolismo de las proteínas (síntesis y degradación) y de los aminoácidos (transporte y oxidación de aminoácidos de cadena ramificada). Un aumento de la apoptosis y un deterioro de la capacidad de regeneración también puede contribuir al desgaste muscular. Todas estas alteraciones acaban provocando una pérdida de masa y funcionalidad muscular en el músculo de los pacientes con cáncer (Figura 1).

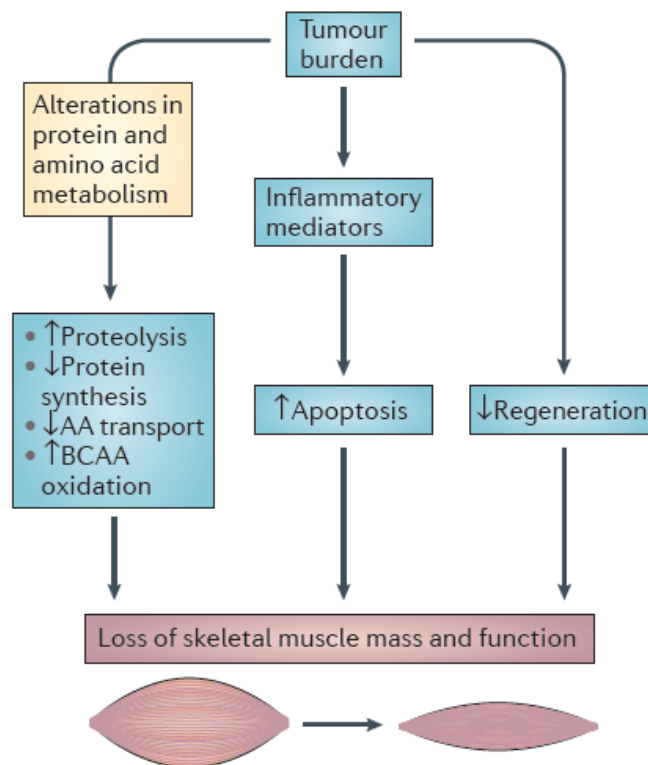


Figura 1. Esquema del deterioro del músculo durante la caquexia cancerosa. Alteraciones en el metabolismo de proteínas y aminoácidos, la apoptosis y la regeneración están directamente involucrados en la inflamación y pérdida de masa muscular. Fuente: (Argilés et al. 2014)

Recientemente se ha estudiado el papel de los RNA no codificantes (ncRNA) en la fisiopatología del músculo, ya que estas moléculas están implicadas en procesos de regulación de la expresión génica, remodelación de la cromatina y comunicación entre células. Este es el caso de los microRNA. Los microRNAs (miRNA) son elementos endógenos de aproximadamente 23 nucleótidos de RNA que están fuertemente relacionados con la regulación génica de animales y plantas. La presencia de secuencias complementarias les permite identificar e inhibir los mRNA de genes que codifican a proteína, y por lo tanto reprimir su traducción. La región que reconoce el mRNA incluye los primeros nucleótidos (2-8) en el extremo 5' de los miRNA, y las regiones complementarias a estas están localizadas dentro de la 3'UTR de los mRNA diana. Esta represión tiene lugar debido al reclutamiento del miRNA-induced silencing complex (miRISC), un complejo ribo-núcleo-proteico que entre sus funciones se ha reconocido la capacidad de desadenilación, de-capping y decaimineto del mRNA diana (Figura 2) (Fabian and Sonenberg 2012).

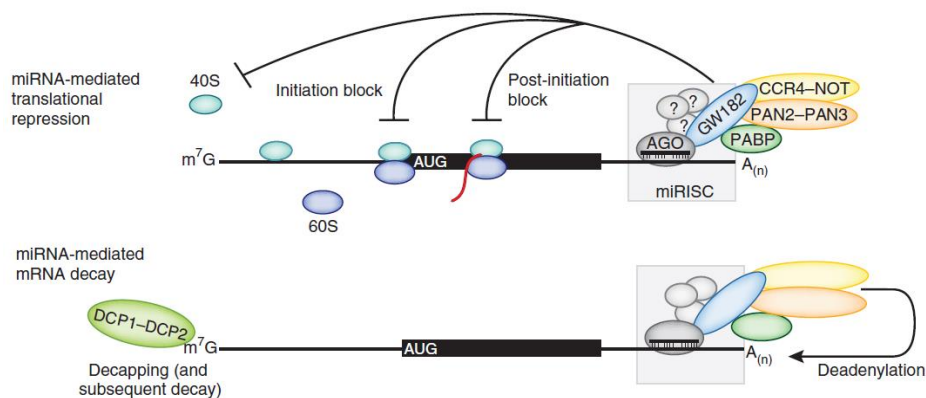


Figura 2. Silenciamiento génico mediado por miRNA via miRISC. Fuente: (Fabian and Sonenberg 2012)

Algunos de los miRNA más estudiados en el músculo esquelético son los llamados myomiRs o miRNA miogénicos. Este grupo incluye miR-1, miR-133a/b, miR-206, miR-208 y miR-499. Estos miRNAs son específicos de músculo y están implicados en la miogénesis (diferenciación de las células musculares), el recambio de proteínas y la reparación del músculo. Además de estos, un grupo de miRNA no específicos de músculo también ejercen estas funciones miogénicas, entre los que encontramos el miR-23a/b (Xu et al. 2020). De esta manera, los miRNAs están involucrados en una plétora de funciones fisiológicas y son esenciales para la regulación de la expresión génica durante el

desarrollo, la diferenciación celular y el mantenimiento de la homeostasis. Por ende, cualquier alteración en su expresión puede conducir a una amplia gama de condiciones patológicas. En el caso concreto del músculo esquelético, diversas investigaciones han estudiado la implicación de alteraciones en el miRNoma tras la aparición de miopatías específicas, incluida la caquexia cancerosa (Argilés et al. 2014). Experimentos de secuenciación masiva en músculo de modelos murinos, celulares y pacientes con cáncer han reportado la sobreexpresión de myomiRs, como son miR-29b, miR-424 y miR-199a, miRNAs que todavía no han sido validados y de los que se desconoce su función dentro del proceso caquético (Fernandez et al. 2020; Moraes et al. 2017). Entre los miRNAs alterados en caquexia cancerosa, se seleccionan cuatro candidatos (miR-23b, miR-29b, miR-199a y miR-424) con la finalidad de comprobar la sobreexpresión en modelos de caquexia.

Entre las aplicaciones biotecnológicas de los miRNAs, destacan las terapias basadas en el silenciamiento de los mismos. A esto se le conoce como antimRNA. Los antimRNAs son pequeñas moléculas de naturaleza ribonucleotídica diseñados para unirse específicamente al miRNA diana y así inducir su silenciamiento (Rupaimoole and Slack 2017). En consecuencia, parece que los microRNA pueden representar valiosas herramientas de diagnóstico/pronóstico de la caquexia asociada al cáncer, así como nuevas vías potenciales para la intervención terapéutica. De este modo, el presente estudio pretende evaluar las anomalías en la expresión de los miRNAs candidatos partiendo de la hipótesis de que la desregulación metabólica de los músculos producida por la sobreexpresión de microRNA indica una posible diana para el tratamiento de la caquexia cancerosa.

Por otro lado, el formoterol es un agonista de los receptores beta2-adrenérgicos de acción prolongada que es conocido por su aplicación como broncodilatador en el tratamiento del asma y la EPOC. Más recientemente, se ha demostrado que induce efectos beneficiosos significativos en los músculos caquéticos a través de varios mecanismos biológicos (Salazar-Degracia et al. 2018). Además, la señalización de atrofia inducida por LPS (Lipopolisacárido) puede atenuarse mediante el tratamiento con formoterol impidiendo la proteólisis en el músculo esquelético y la inhibición de la síntesis proteica activando la cascada de señalización Akt/mTOR en células de la musculatura esquelética (Figura 3) (Martín et al. 2018). Sin embargo, las bases moleculares de su efecto en la caquexia del músculo esquelético siguen sin estar claras. Por ello, vista la implicación de microRNA

en la enfermedad caquética, se hipotetiza que el formoterol debe poder regular la expresión de miRNAs involucrados en la caquexia cancerosa.

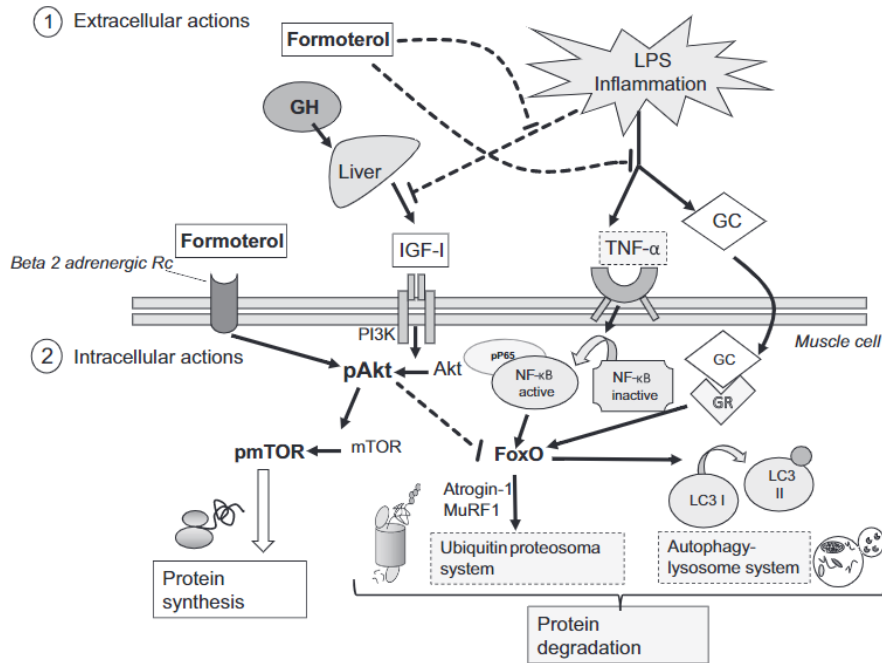


Figura 3. Bases moleculares de los efectos del formoterol en células de la musculatura esquelética con proteólisis inducida por LPS. El formoterol reduce la proteólisis y fomenta la síntesis proteica. Fuente: (Martín et al. 2018).

## Objetivos

Este trabajo se ha centrado principalmente en la identificación y validación de dianas terapéuticas eficaces para el potencial tratamiento de la caquexia cancerosa mediante técnicas de silenciamiento de miRNAs. Para ello, se ha considerado necesario evaluar la implicación de estos miRNAs en la enfermedad del músculo caquético.

De este modo, en este proyecto se presentan tres objetivos principales en este estudio:

- Objetivo 1. Comprobar los efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular de dos modelos caquético.
- Objetivo 2: Análisis de la sobreexpresión de miRNAs candidatos en modelos tumorales de AH-130 y LLC y posterior validación de la implicación de estos en la enfermedad con un anticaquético control (el formoterol).
- Objetivo 3: Análisis de la expresión de los miRNAs candidatos en los diferentes músculos de estudio y tejidos de interés para determinar las dianas terapéuticas más atractivas.



## **Metodología**

### ***Modelos tumorales experimentales y tratamiento con formoterol***

Con el fin de llevar a cabo este estudio se han utilizado como modelo muestras de ratas Wistar machos para el modelo tumoral AH-130 y muestras de ratones de la cepa C57BL/J machos para el modelo tumoral de Lewis, ambos con 6 semanas de vida. Todos los modelos caquéuticos fueron obtenidos, manipulados y procesados por la Universidad de Barcelona (Grupo de bioquímica y biología molecular del cáncer), quienes ha proporcionado las muestras de los músculos esqueléticos de ambos modelos para este estudio.

Los animales han sido mantenidos a una temperatura de  $22 \pm 2^\circ \text{C}$ , con un ciclo regular de luz-oscuridad en condiciones de luz desde las 8:00 am a las 20:00 am y un 40-44% de humedad. Todas las manipulaciones animales se han realizado de acuerdo con la *European Community Guidelines* para el uso de animales de laboratorio y con el procedimiento aprobado por parte de la Universidad de Barcelona y la Generalitat de Catalunya.

### ***Hepatoma ascítico Yoshida AH-130***

El modelo experimental caquéutico fue obtenido por una inyección intraperitoneal a 16 ratas Wistar de  $10^8$  células de Hepatoma ascítico Yoshida AH-130, obtenidas previamente de tumores exponenciales de hígado (Toledo, Springer, et al. 2014).

El estudio se lleva a cabo durante 7 días. Durante este periodo se observó una pérdida de masa corporal de animales portadores del tumor respecto a los controles, así como una reducción de la ingesta de comida y la aparición de anorexia. Además, se observó un efecto caquéutico en los músculos debido al crecimiento del tumor.

### ***Carcinoma pulmonar de Lewis***

En este caso, el modelo experimental caquéutico se obtuvo por inyección intramuscular en una de las patas de 17 ratones C57BL/J de  $5 \times 10^5$  células de *Lewis lung carcinome* (LLC), obtenidas previamente de tumores exponenciales de pulmón (Toledo, Penna, et al. 2014).

El estudio de los ratones C57BL/J tiene una duración de 14 días. De la misma manera al modelo comentado anteriormente, hay aparición de caquexia debida al tumor en esta fase más avanzada del crecimiento tumoral.

### ***Tratamiento con Formoterol***

En caso de tratamiento con el anticaquético Formoterol, el tratamiento fue administrado desde el día de la inoculación del tumor, hasta el día previo al sacrificio por parte de la Universidad de Barcelona.

En el caso de las ratas (modelo AH-130) ha consistió en una inyección subcutánea de 0.3 ml cada 24 horas de formoterol 0.3 mg/kg durante 7 días (Toledo, Springer, et al. 2014). Se ha inyectado una solución salina de igual volumen a los grupos no tratados. Estos se dividieron en 3 grupos: control (C, no tumor e inyección salina n=6), tumor (T, hepatoma ascítico Yoshida AH-130 e inyección salina n=7) y tumor tratado (T+F, hepatoma ascítico Yoshida AH-130 y tratamiento con formoterol n=9).

Por otro lado, en el caso de los ratones (modelo LLC) el tratamiento consistió en una inyección subcutánea de 0,1 ml cada 24 horas de formoterol 1mg/kg. Se ha inyectado una solución salina de igual volumen a los grupos no tratados. La duración del tratamiento en este caso ha sido de 14 días. De igual forma, estos se dividieron en 3 grupos: control (C, no tumor e inyección salina n=6), tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=8) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9).

### ***Extracción de miRNA***

Una vez recibidos los músculos de rata AH-130 y ratón de Lewis se extrajo el RNA total enriquecido en fracción de miRNA de los músculos gastrocnemio, el musculo extensor largo de los dedos (*extensor digitorum longus*, EDL) y el tibial. Para la extracción del RNA se utilizó el kit comercial *miRNeasy Mini Kit* (QIAGEN, Cat. No. / ID: 217004) siguiendo las condiciones del fabricante. Finalmente se analizó la cantidad y pureza del RNA mediante espectrofotometría utilizando un equipo *Thermo Scientific™ NanoDrop 2000*.

## ***qRT-PCR***

Para los experimentos de PCR a tiempo real 5 ng/μl de RNA fueron retrotranscritos con el kit miRCURY® LNA® RT (QIAGEN, Cat. No. / ID: 339340). El cDNA resultante fue utilizado para realizar un ensayo de qPCR. Para ello se realizó una dilución 1/60 del cDNA y se amplificó mediante el kit comercial miRCURY LNA SYBR Green PCR (QIAGEN, Cat. No. / ID: 339347). Se utilizaros cebadores específicos para el análisis de la expresión de miR-29b-3p, miR-424-5p, miR-199a-3p y miR-23b-3p (Tabla 1). Los niveles de expresión de miRNA en los músculos fue cuantificada mediante Real Time qPCR Applied Biosystems QuantStudio5. La expresión de miRNA fue normalizada con la cuantificación de los snRNA endógenos U1 y U6 y el RNA ribosomal (rRNA) S5 mediante el método del  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .

*Tabla 1. Primers utilizados en la Real Time qPCR.*

<b>Nombre del producto</b>	<b>Grupo de producto</b>	<b>Casa comercial</b>	<b>Cat. ID.</b>
<b>hsa-miR-23b</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00204790
<b>hsa-miR-29b-3p</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00204679
<b>hsa-miR-199a-3p</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00204536
<b>hsa-miR-424-5p</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00204736
<b>RNU1A1</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00203909
<b>U6 snRNA</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00203907
<b>5S rRNA</b>	miRCURY LNA™ miRNA PCR Assay	QIAGEN	YP00203906

## ***Análisis estadístico***

Las diferencias de expresión de los microRNA entre los diferentes grupos fueron analizadas mediante pruebas One-way ANOVA y Kruskal-Wallis. De esta manera se realizó una comparación múltiple de los datos normalizados contra el grupo control. Las diferencias estadísticas entre los grupos Tumor (T) y Tumor con tratamiento (T+F) se realizó mediante las pruebas t de Student sobre los datos normalizados.

Además, también se comparó estadísticamente las diferencias en la expresión de los miRNA en el músculo caquéctico. El análisis se realizó con comparación múltiple (One-way ANOVA) entre todos grupos para los miRNAs estudiados.

## ***Expresión de miRNAs candidatos en órganos y tejidos (Zenbu)***

Para completar este proyecto, se realizó una búsqueda bibliográfica de la expresión de miRNAs en individuos humanos. Para ello, se utilizó la base de datos Zenbu (ZENBU - Analysis Reports), una herramienta bioinformática donde se recogen la expresión de multitud de ncRNA, siendo un reconocido atlas de miRNAs humanos. Zenbu proporciona una amplia selección de capacidades de manipulación de datos, incluyendo el filtrado de calidad, normalización de la señal y la visualización de la diferencia de expresión a través de múltiples experimentos incluyendo RNA-seq (Abugessaisa et al. 2021). Así, se filtró y comparó los datos de expresión de miR-23b, miR-29b, miR-199a y miR-424 en diversos órganos y tejidos (sangre, medula ósea, cerebro, cerebelo, diafragma, ojos, corazón, riñón, hígado, pulmones, páncreas y músculo esquelético).

## **Resultados**

### ***Objetivo 1. Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular de 2 modelos caquético***

Los músculos de los animales incluidos en el estudio fueron pesados después del sacrificio con la finalidad de observar variaciones en el peso debido a la aparición de caquexia y los efectos del formoterol sobre este proceso de desgaste muscular. Estos resultados fueron obtenidos por Silvia Busquets Rius de la Universidad de Barcelona, pero analizados estadísticamente por el en este proyecto de fin de grado.

#### ***1.1 Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular en ratas portadoras del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130 (AH-130) 7 días después de la inoculación del tumor.***

En el modelo tumoral de Hepatoma ascítico Yoshida AH-130 se observaron diferencias significativas en el peso de los músculos al día 7 de crecimiento tumoral (Figura 4). Se aprecia una disminución del peso muscular en las ratas portadoras de tumor respecto a los controles, por lo que se demuestra un efecto caquético en los músculos evaluados debido al crecimiento tumoral. Además, se observan efectos positivos del tratamiento anticaquético de formoterol con aumentos significativos del peso muscular en el grupo T+F respecto al T (Figura 4).

#### ***1.2 Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular en ratones portadores del carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) 14 días después de la inoculación del tumor.***

En el modelo tumoral de carcinoma pulmonar de Lewis se observaron diferencias significativas en el peso de los músculos al día 14 de crecimiento tumoral (Figura 5) entre los músculos gastrocnemio, tibial y EDL. Se aprecia una disminución en el peso del músculo de los ratones del grupo portador del tumor respecto a los controles. Por lo tanto, se demuestra un efecto caquético en los músculos evaluados debido al crecimiento tumoral. Por lo que respecta al tratamiento con formoterol, éste implica un aumento del tamaño de los músculos en los animales portadores de tumor tratados (Figura 5). En

gastrocnemio se consiguió recuperar valores cercanos al control (Figura 5a). Por el contrario, en el músculo EDL no se observan diferencias significativas entre el grupo portador de tumor y el tratado (Figura 5b).

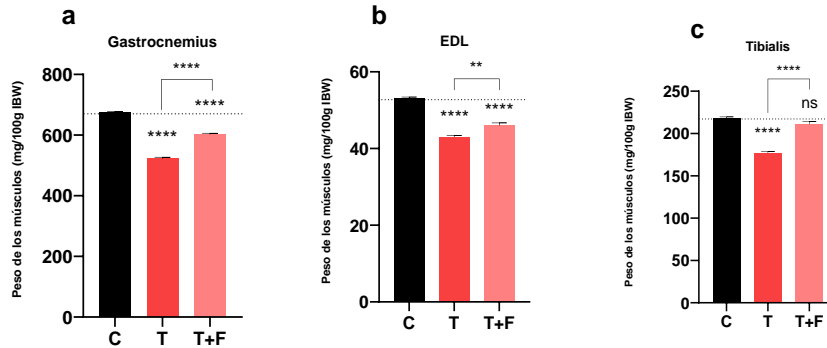


Figura 4. Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular en ratas modelo del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH—130 7 días después de la inoculación del tumor. a: peso del gastrocnemio. b: peso del músculo extensor digitorium longus (EDL). c: peso del tibial. El peso de los músculos se expresa en miligramos por 100 gramos de peso corporal inicial (mg/100g IBW). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Control (C, no tumor e inyección salina  $n=6$ ), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina  $n=7$ ) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol  $n=9$ ). Los valores significativamente diferentes se indican: \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ .

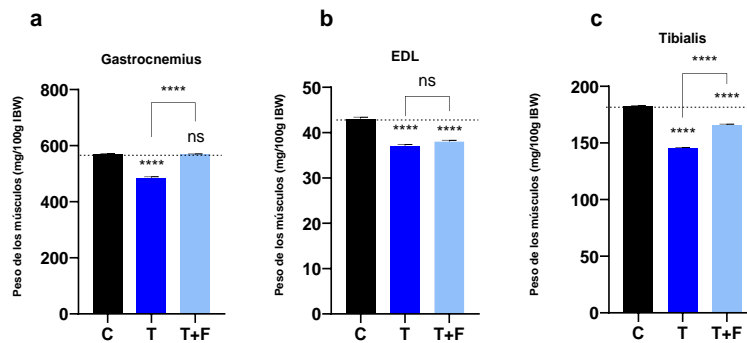


Figura 5. Efectos del tratamiento con formoterol en el peso muscular en ratas modelo del tumor carcinoma pulmonar de Lewis 14 días después de la inoculación del tumor. a: peso del músculo gastrocnemio. b: peso del músculo extensor digitorium longus (EDL). c: peso del músculo tibial. El peso de los músculos se expresa en miligramos por 100 gramos de peso corporal inicial (mg/100g IBW). Los resultados se expresan como media  $\pm$  SEM. Control (C, no tumor e inyección salina  $n=6$ ), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina  $n=8$ ) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol  $n=9$ ). Los valores significativamente diferentes se indican: \*  $p<0.05$ , \*\*  $p<0.01$ , \*\*\*  $p<0.001$ , \*\*\*\*  $p<0.0001$ .

## **Objetivo 2: Análisis de la expresión de miRNAs candidatos en modelos tumorales de AH-130 y LLC y posterior validación con un anticaquético (Formoterol).**

### **2.1 Expresión relativa de miR-29b en músculo caquético y tratado con Formoterol**

El estudio demostró variaciones significativas en la expresión de miR-29b en el modelo de rata portadora de hepatoma ascítico de Yoshida AH-130. Se observaron aumentos significativos en la expresión de miR-29b para los músculos gastrocnemio (Figura 6a), EDL (Figura 6b) y tibial (Figura 6c) de las ratas portadoras del tumor respecto al grupo control.

Por otro lado, también se observan los efectos del tratamiento con formoterol en la expresión del microRNA. En gastrocnemio y tibial (Figura 6a y 6c) se consiguió recuperar niveles basales de la expresión relativa de miR-29b. No se consiguió recuperar los niveles de expresión respecto a los del grupo control en EDL (Figura 6b), aunque sí mostro una gran reducción de la expresión del microRNA respecto a las ratas portadoras del tumor sin tratamiento.

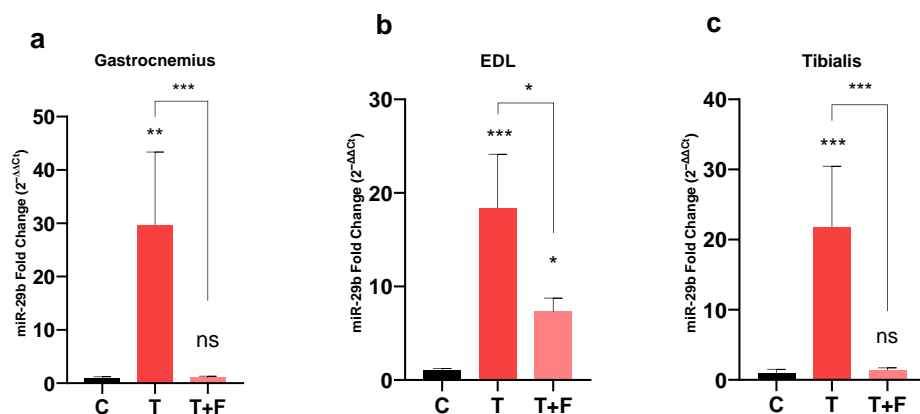


Figura 6. Expresión relativa de miR-29b en ratas modelo del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorum longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=7) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Por otro lado, en el modelo de ratón portador del carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) se observa una tendencia similar en la expresión de miR-29b a los resultados obtenidos con las ratas modelo de hepatoma AH-130 (Figura 6). Se observan aumentos significativos en la expresión de miR-29b en los músculos gastronemio, EDL y tibial del modelo tumoral respecto al control (Figura 7). También se observan los efectos del formoterol reduciendo la expresión del microRNA a valores cercanos a la expresión control (no diferencias significativas entre el grupo tratado y el control).

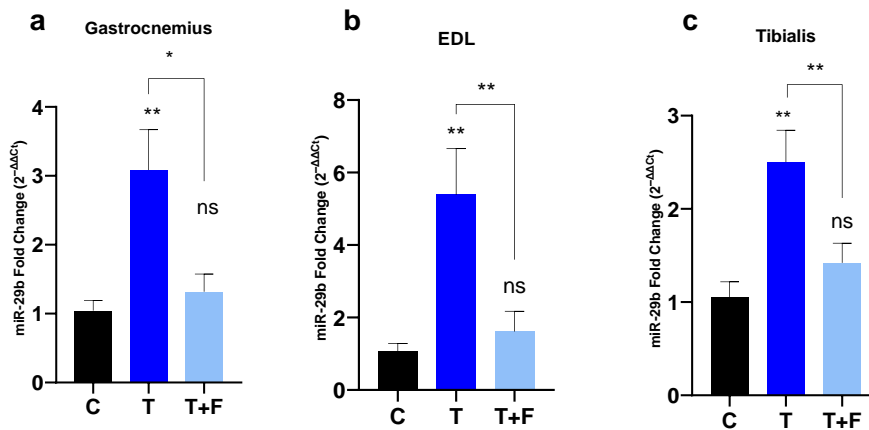


Figura 7. Expresión relativa de miR-29b en ratones modelo del tumor carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) en los músculos gastronemio (a), el músculo extensor digitorum longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=8) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

## 2.2 Expresión relativa de miR-199a en músculo caquéctico y tratado con Formoterol

La expresión del miR-199a está aumentada en todos los músculos estudiados de las ratas tumorales AH-130 (Figura 8). Los efectos del formoterol en este miRNA también son apreciables. En todos los casos se consigue una reducción de la expresión del miRNA hasta expresiones cercanas al control. En el caso de gastronemio y tibial (Figura 8a y 8c) esta reducción de la expresión es significativa respecto a las ratas no tratadas. En el caso del músculo EDL (Figura 8b) esta reducción no es significativa, aunque se aprecia claramente la tendencia y la expresión de este miRNA comparada con el control no está significativamente aumentada.

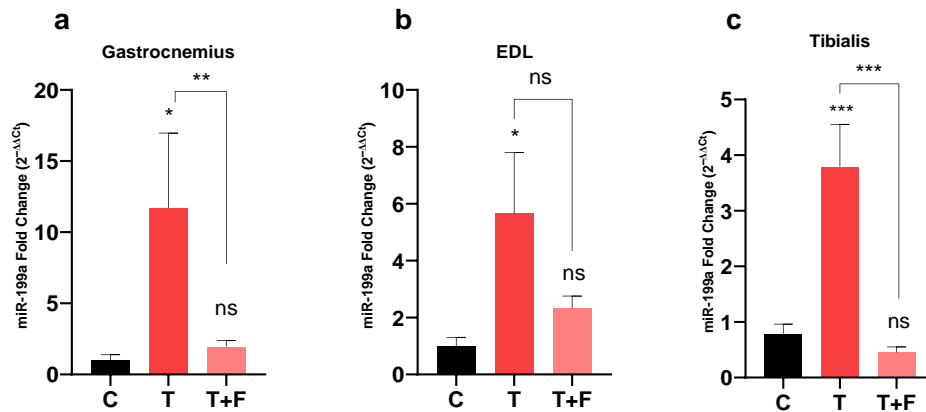


Figura 8. Expresión relativa de miR-199a en ratas modelo del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorum longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=7) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

En el modelo de ratón de LLC el miR-199a no parece estar relacionado con la enfermedad del músculo caquéctico. No mostró cambios significativos en la expresión del microRNA en el modelo tumoral (Figura 9). Tampoco parece que el formoterol tenga grandes efectos en la expresión del microRNA salvo una pequeña tendencia significativa en EDL, donde el formoterol parece disminuir el miRNA (Figura 9b).

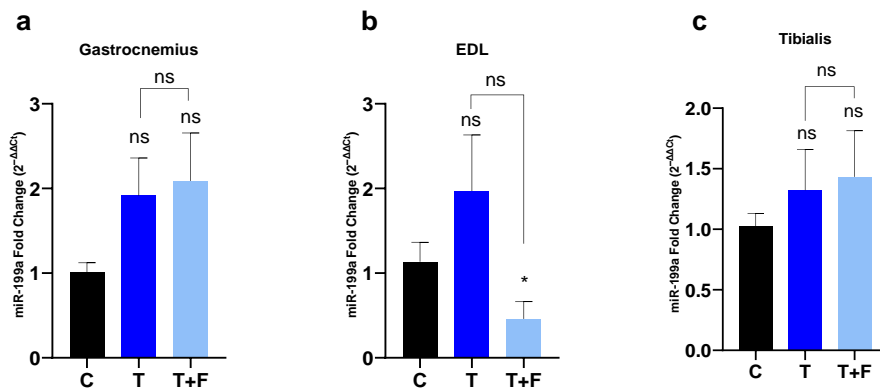


Figura 9. Expresión relativa de miR-199a en ratones modelo del tumor carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorum longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=8) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

### 2.3 Expresión relativa de miR-424 en músculo caquéctico y tratado con Formoterol

El estudio demostró grandes variaciones significativas en la expresión de miR-424 para el modelo caquéctico AH-130. Los músculos gastrocnemio y tibial presentan un aumento moderado en el grupo tumoral respecto la expresión control (Figura 10a y 10c). Mientas, el músculo EDL muestra un aumento considerablemente más grande del miRNA en las ratas tumorales respecto la expresión control (175,5 veces) (Figura 10b). Son notables los efectos del tratamiento anticaquéctico con formoterol en la expresión del miR-424 en el modelo AH-130 (Figura 10). Las diferencias entre los grupos tumor (T) y tratamiento (T+F) son altamente significativas. Además, se consigue recuperar niveles de expresión cercanos al control en todos los músculos de estudio.

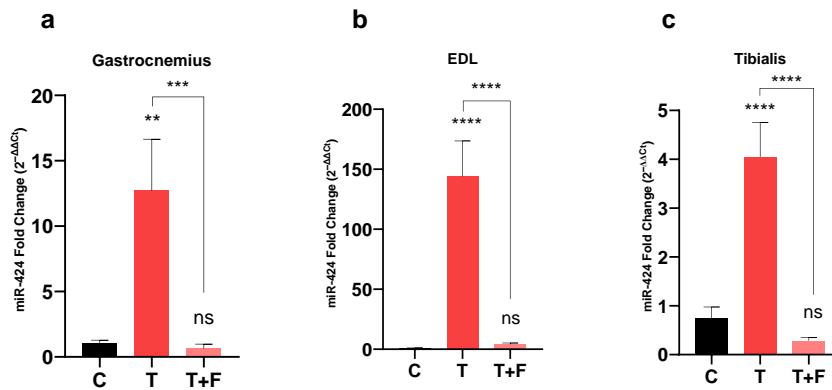


Figura 10. Expresión relativa de miR-424 en ratas modelo del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorum longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=7) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

Por otro lado, el miR-424 demostró estar sobreexpresado en todos los músculos estudiados del modelo de ratón LLC, con grandes aumentos en gastrocnemio y EDL (Figura 11). Además, también se observan los efectos del formoterol en la expresión del miR-424 en los músculos EDL y tibial (Figura 11b y 11c) de este modelo tumoral. Por su parte, el formoterol no demostró recuperar los niveles de expresión de miR-424 en músculo gastrocnemio, aunque sí que se puede apreciar un leve descenso no significativo de este miRNA en este músculo con el tratamiento (Figura 11a).

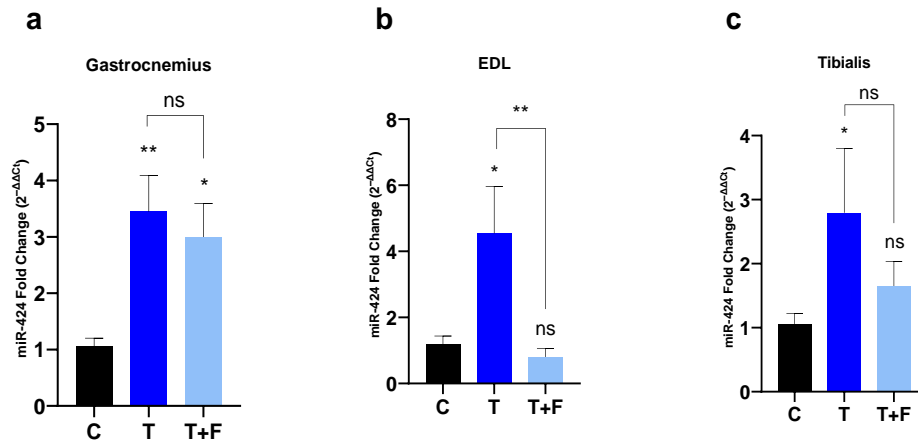


Figura 11. Expresión relativa de miR-424 en ratones modelo del tumor carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorium longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=8) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

#### 2.4 Expresión relativa de miR-23b en músculo caquético y tratado con Formoterol

Finalmente, el myomiRNA miR-23b mostró pequeñas alteraciones en los músculos caquéticos de rata AH-130. Se observó una leve tendencia al aumento de la expresión del miR-23b en gastrocnemio, aunque no significativa (Figura 12a). Sí mostró un aumento relevante en el músculo EDL (Figura 12b). Por otro lado, en el tibial (Figura 12c) se aprecia una leve reducción de la expresión de miR-23b en las ratas portadoras del tumor. Por lo que respecta al tratamiento con formoterol, no muestra ningún efecto significativo en la expresión del miR-23b en el músculo gastrocnemio (Figura 12a). En los músculos EDL y tibial se observa una reducción de la expresión del microRNA debido al tratamiento con formoterol (Figura 12b y 12c), en tibial este miRNA que es reducido a una expresión casi nula (0,051 veces).

En lo que corresponde al modelo tumoral LLC, el miR-23b no ha mostrado ninguna implicación en la caquexia cancerosa. Los músculos de las ratas tumorales no muestran variaciones significativas en la expresión de miR-23b. El formoterol, sin embargo, sí parece que afecte levemente al músculo caquético, aumentando la expresión de este microRNA, aunque sin significancia (Figura 13).

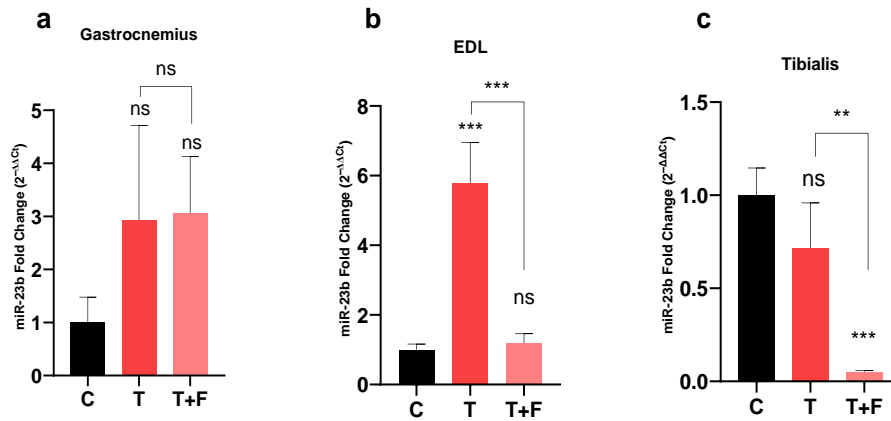


Figura 12. Expresión relativa de miR-23b en ratas modelo del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130 en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorium longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=7) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

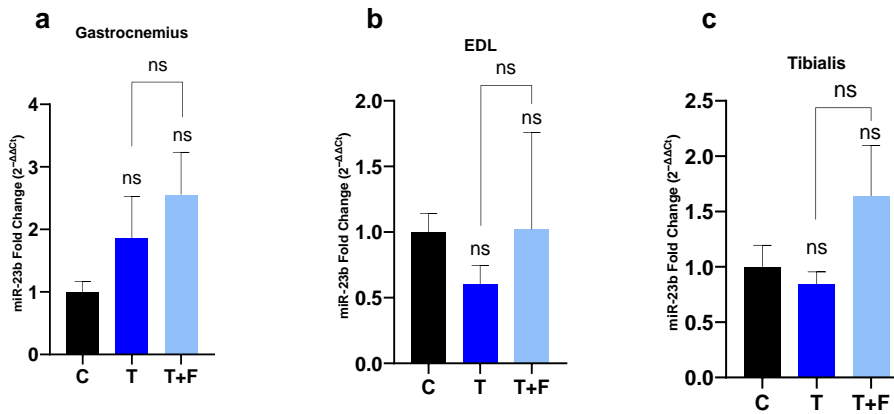


Figura 13. Expresión relativa de miR-23b en ratones modelo del tumor carcinoma pulmonar de Lewis (LLC) en los músculos gastrocnemio (a), el músculo extensor digitorium longus (b) y el tibial (c). Control (C, no tumor e inyección salina n=6), Tumor (T, carcinoma pulmonar de Lewis e inyección salina n=8) y tumor tratado (T+F, carcinoma pulmonar de Lewis y tratamiento con formoterol n=9). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  SEM con significancia \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ .

**Objetivo 3: Análisis de la expresión de los miRNAs candidatos en los diferentes músculos de estudio y tejidos de interés.**

**3.1 Niveles de expresión de miRNAs en el modelo tumoral AH-130**

De formar adicional se comparó el nivel de expresión de los diferentes miRNAs de estudio: miR-23b, miR-29b, miR-199a y miR-424. Por lo general, miR-29b y miR-424 muestran ser los microRNA más aumentados en el músculo caquético del modelo tumoral de Hepatoma ascítico Yoshida AH-130.

El miR-29b mostró una mayor expresión en gastrocnemio y tibial, además de demostrar diferencias significativas frente miR-23b en gastrocnemio y tibial; y frente miR-199a y miR-424 en tibial (Figura 14).

Por su parte, el miR-424 demostró una gran expresión en EDL, considerablemente superior a todos los demás miRNA estudiados en el músculo caquético (Figura 14b). Además, también se observó una mayor expresión respecto miR-23b en gastrocnemio y tibial de la misma forma que lo hace miR-199a (Figura 14 a y c).

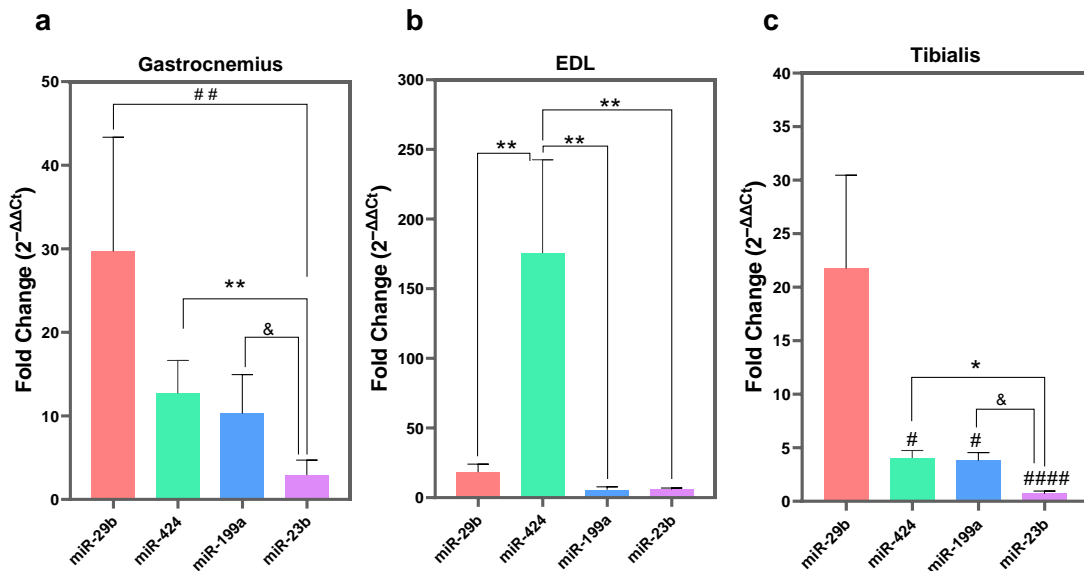


Figura 14. Comparación de la expresión relativa de miR-29b, miR.424, miR-199a y miR-23b en los músculos gastrocnemio (a), EDL (b) y el tibial (c) de las ratas modelo del tumor hepatoma ascítico Yoshida AH-130. # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$  respecto miR-29b; \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  respecto a miR-424 y &  $< 0,05$ , respecto miR199a.

### 3.2 Niveles de expresión de miRNAs en el modelo tumoral LLC

Para el modelo tumoral de carcinoma pulmonar de Lewis (LLC), miR-29b y miR-424 demostraron ser los microRNA mayor aumentados en los músculos caquéticos, al igual que el modelo AH-130.

El músculo gastrocnemio no mostró ninguna variación significativa en la expresión de los miRNAs, aunque se observa la tendencia de miR-29b y miR-424 como miRNAs más aumentados en músculo caquético (Figura 15a). En EDL y tibial se observó la misma tendencia, pero esta vez con diferencias significativas (Figura 15b y 15c) estando estos aumentados respecto a miR-199a y miR-23b.

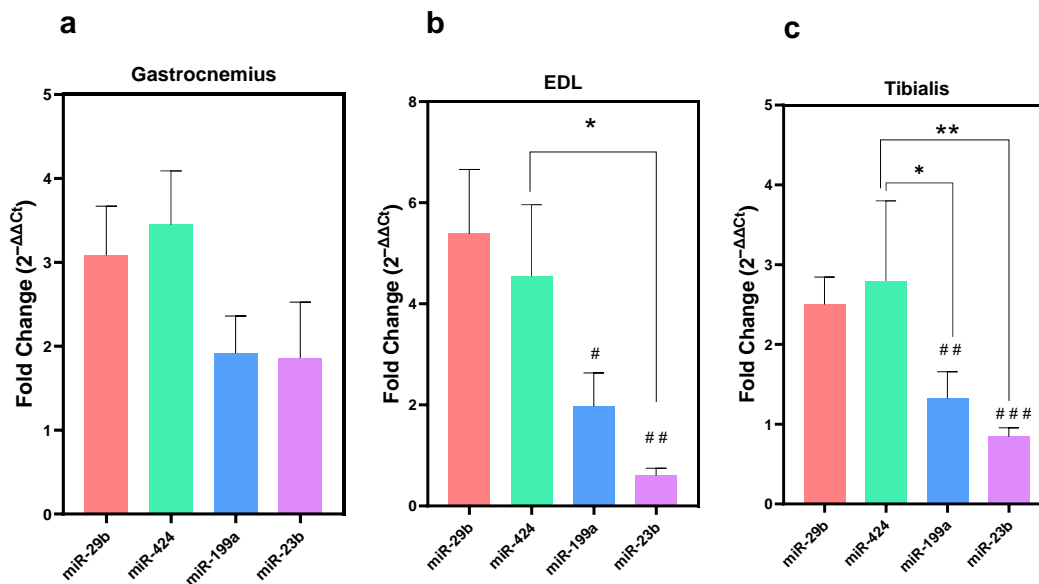


Figura 15. Comparación de la expresión relativa de miR-29b, miR.424, miR-199a y miR-23b en los músculos gastrocnemio (a), EDL (b) y el tibial (c) de ratones modelo del tumor carcinoma pulmonar de Lewis (LLC). # $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$ , ### $p < 0,001$  respecto miR-29b y \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  respecto a miR-424.

### 3.3 Niveles de expresión de miRNAs en tejidos en tejidos relevantes.

Los datos de la base de datos Zenbu mostraron diferencias en la expresión de los miRNAs candidatos entre diferentes tejidos relevantes para biodistribución, la farmacodinámica y la eficacia de las terapias AntimiRs. El miR-23b mostró una gran expresión en la gran mayoría de los tejidos analizados, destacando sobre todo en el diafragma, corazón y musculo esquelético (Figura 16); como era de esperar en un myormiR. miR-424 mostró una gran expresión en diafragma y musculo esquelético, pero unos niveles de expresión bajos en el resto de los tejidos (Figura 16). Por otro lado, miR-29b mostró mayor expresión cerebelo, sangre, cerebro, riñón y pulmón; y menor expresión en corazón, diafragma, hígado y musculo esquelético (Figura 16). Finalmente, el miR-199a no mostró grandes expresiones en ninguno de los tejidos estudiados (Figura 16).

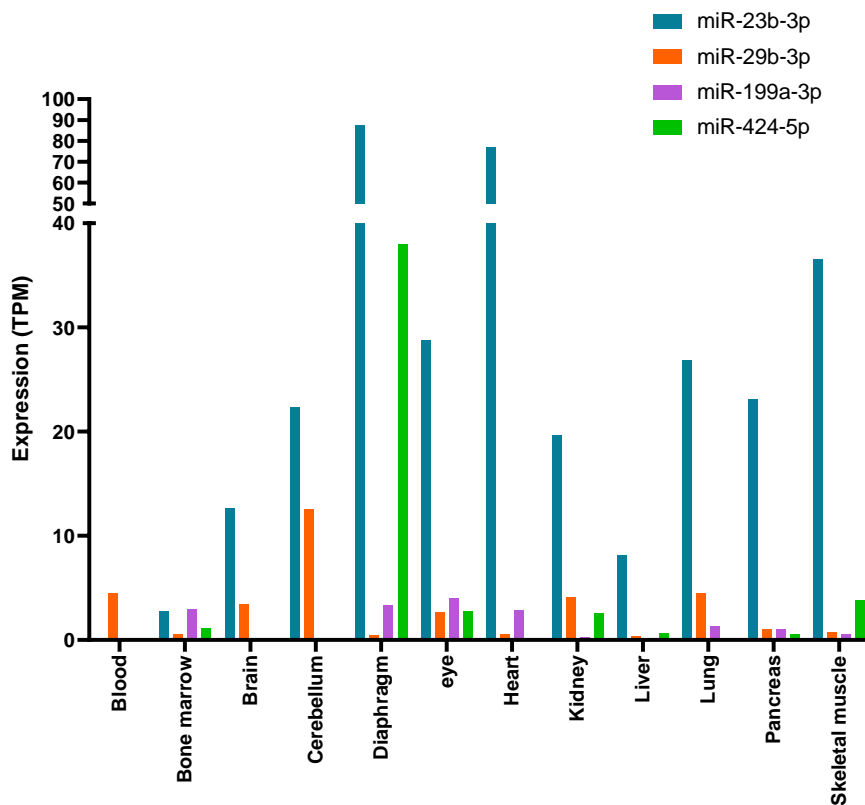


Figura 16. Diferencias en la expresión de miRNA en humanos. Se recoge la expresión de miR-23b, miR-29b, miR-199a y miR-424 en diferentes órganos y tejidos. Datos obtenidos de la base de datos y atlas de expresión de miRNA humano Zenbu.



## Discusión de resultados

El tratamiento de la caquexia asociada al cáncer es una necesidad médica no cubierta, y es esencial comprender mejor el mecanismo subyacente para desarrollar intervenciones eficaces. En este trabajo se ha validado la sobreexpresión de 2 miRNAs en modelos murinos de caquexia, previamente descritos en músculo esquelético caquéctico de pacientes con cáncer.

Los modelos tumorales de hepatoma ascítico de Yoshida AH-130 y carcinoma pulmonar de Lewis han mostrado la sobreexpresión de miR-29b y miR-424 en músculos (gastocnemio, EDL y tibial) en situación de caquexia. Por otro lado, se ha demostrado también la reducción de estos microRNA con el tratamiento anticaquéctico de formoterol, recuperando en su mayoría niveles de normales de expresión (cercaos al control). Esto se correlaciona con el aumento de peso de los músculos observado en los animales tratados, suponiendo una mejora sustancial del fenotipo caquéctico. De forma adicional, se ha observado un mayor rescate del peso de los músculos en el modelo de hepatoma respecto al modelo de carcinoma pulmonar, esto también se correlaciona con los resultados obtenidos de la expresión de miRNAs donde el aumento de miR-29b y miR-424 es mayor en el modelo de hepatoma. Con todo ello, se ha demostrado la implicación de miR-29b y miR-424 en la enfermedad del músculo caquéctico asociada al cáncer en dos modelos diferentes de tumor pulmonar y hepático.

miR-29b está sobreexpresado en de caquexia cancerosa. También se ha observado alteraciones en la expresión de miR-29b en condiciones de atrofia muscular en múltiples modelos *in vitro* e *in vivo*. Además, el incremento de miR-29b parece ser suficiente y necesario para la aparición de atrofia muscular *in vitro*. De este modo, el miR-29b se presenta como promotor de procesos tales como la senescencia y la apoptosis en el músculo vía FoxO3, además de interferir en la vía mTOR alterando la síntesis proteica (Li et al. 2017) (Figura 17). Estos procesos están altamente relacionados con la aparición de la caquexia cancerosa, pudiendo suponer uno de los mecanismos de caquexia cancerosa en el músculo esquelético. Por otro lado, otros modelos de cáncer que inducen caquexia también han mostrado diferencias en la expresión de miRNA en el músculo. La caquexia asociada a enfermedades cardíacas también se ha relacionado con la sobreexpresión de miR-29b en el músculo esquelético. Por ende, miR-29b se presenta como una posible diana terapéutica vista su implicación en la enfermedad.

En el caso de miR-199a no ha mostrado una relación clara con fenotipo de caquexia en general en los músculos en este estudio. Aunque sí ha mostrado pequeños aumentos en el modelo tumoral AH-130, parece no tener implicación en el modelo de ratón LLC, donde no se observó ningún aumento significativo, pudiendo estar implicado únicamente en la caquexia cancerosa causada por tumores de tipo hepático. Entre los mecanismos descritos del miR-199a en situación atrófica encontramos que influye en la expresión del gen eIF4EBP1 (aumenta su expresión) y reduce la vía mTOR, interfiriendo así con la síntesis proteica (Narasimhan et al. 2017) (Figura 17).

Por otro lado, el miR-424 está involucrado en el deterioro muscular inhibiendo la expresión de RNA ribosómico (rRNA), la producción de ribosomas y, por lo tanto, la síntesis proteica (Connolly et al. 2018) (Figura 17). Además, ha demostrado estar fuertemente implicado en la caquexia cancerosa, pues lo encontramos aumentado en todos los músculos de estudio de ambos modelos cancerosos AH-130 y LLC y claramente el anticaquético elección disminuye su expresión, pudiendo estar éste implicado en los mecanismos de la enfermedad y suponer así una buena diana terapéutica. Además, estudios transcriptómicos ratificaron la sobreexpresión de miR-424 en los músculos de pacientes con caquexia asociada a cáncer de pulmón y enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD, *chronic obstructive pulmonary disease*). (van de Worp et al. 2020).

En contraste, se observa la expresión de miR-23b, el cual ha demostrado ninguna correlación positiva con la caquexia cancerosa en ambos modelos tumorales estudiados, observando incluso descensos en su expresión en algunas situaciones. Sin embargo, este resultado concuerda con lo anteriormente publicado en los músculos de ratones caquéticos modelo de carcinoma de colon, en los cuales también se ha mostrado a la infraexpresión de este miRNA (Soares et al. 2014). Sin embargo, sí se observan efectos del formoterol sobre este microRNA, sobre todo en el modelo de hepatoma ascítico de Yoshida. Esto posiblemente, es debido a que pertenece a la familia de miRNAs que se expresan altamente en músculo y están involucrados en el crecimiento y desarrollo del músculo, rutas que también se ha reportado que son alteradas por el formoterol. De forma más específica, miR-23b pertenece al *cluster* de expresión miR-23b/27b/24-1 que parece ser fundamental para la correcta diferenciación de los miocitos, el *turnover* de proteínas y la correcta formación del músculo esquelético (Marceca et al. 2020) (Figura 17).

A la luz de los resultados obtenidos y lo previamente reportado en bibliografía, parece ser que las variaciones observadas en la expresión de miR-29b y miR-424 en los músculos

de ambos modelos tumorales aparentan afectar principalmente a la síntesis proteica del músculo, la cual parece jugar un rol importante en la aparición de la caquexia cancerosa (Figura 17).

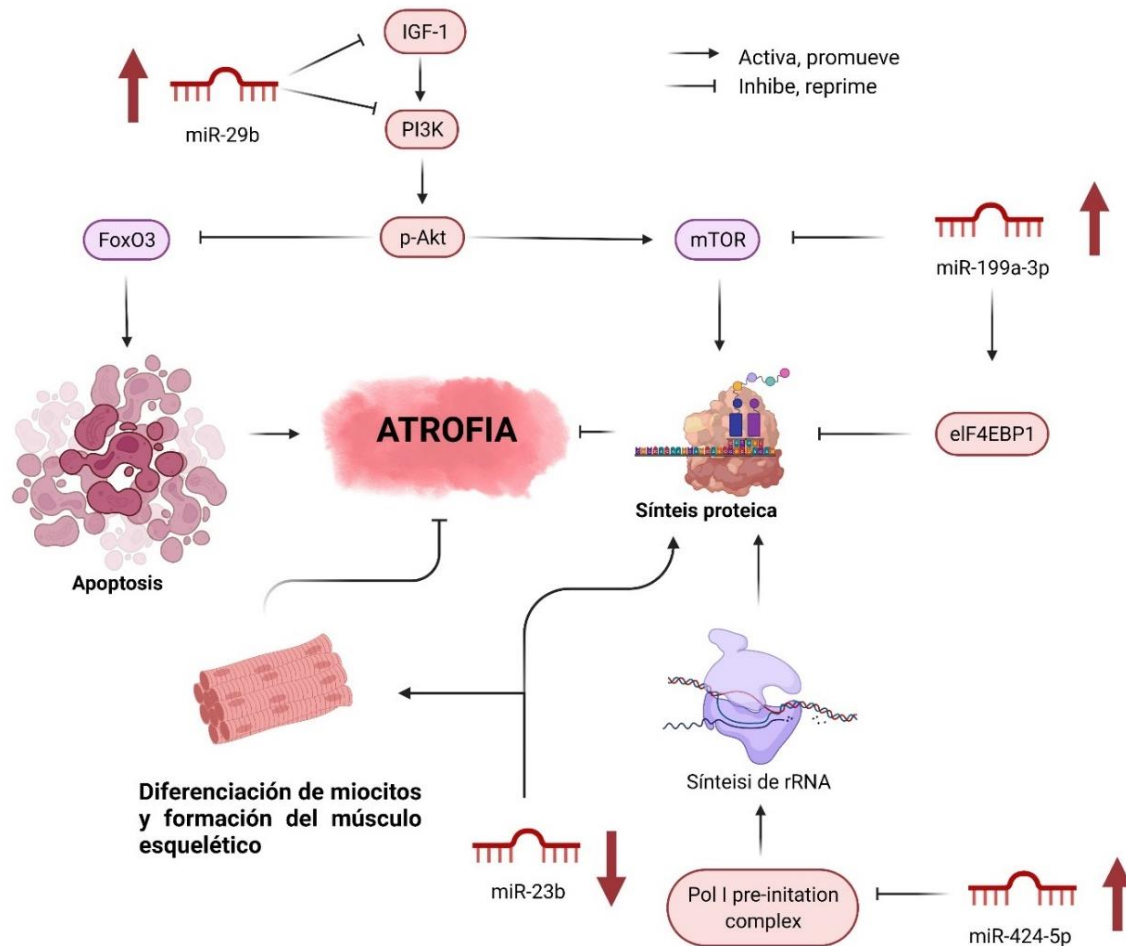


Figura 17. Esquema representativo del rol de los microRNA en la atrofia muscular y la enfermedad del músculo caquético asociada al cáncer.

De este modo, miR-29b y miR-424 parecen ser dianas terapéuticas atractivas para el tratamiento de la caquexia cancerosa. Entre las estrategias terapéuticas que se podría aplicar destacan los antimicroRNA por su control sobre microRNA sobreexpresados. El desarrollo de terapias antimicroRNA está a la orden del día en enfermedades como el cáncer, pero también para enfermedades del músculo esquelético donde han demostrado ser eficaces para el tratamiento de la distrofia miotónica (Cerro-Herreros et al. 2020).

Consecuentemente con estos resultados, se han observado los niveles de expresión de los miRNAs de estudio en los diferentes órganos y tejidos humanos sanos gracias a la base de datos Zenbu (Abugessaisa et al. 2021). Entre los miRNA descritos como implicados en caquexia cancerosa en este trabajo, destaca el miR-424 por su mayor expresión en diafragma y músculo esquelético, *targets* hipotéticos de la estrategia terapéutica. Además, el miR-424 muestra unos niveles de expresión casi nulos o muy bajos en tejidos a los que no va dirigido el tratamiento, minimizando posibles efectos *off-target* y efectos secundarios de la terapia anti-miRNA y simplificando el desarrollo de la terapia. Al contrario, miR-29b presenta una menor expresión en el músculo además de expresarse en numerosos órganos no específicos pudiendo generar posibles efectos *off-target*, suponiendo una terapia poco efectiva.

De este modo, miR-424 parece ser el mejor candidato como diana terapéutica para la caquexia cancerosa. La aplicación de antimiRNA sobre el miR-424 en el músculo caquético debería suponer el bloqueo de los efectos dañinos de su sobreexpresión, evitando así la inhibición de la síntesis proteica y, por lo tanto, la atrofia muscular. Aunque miR-29b también podría suponer una buena diana para el tratamiento de la caquexia cancerosa debido a su alta sobreexpresión en la enfermedad, pese a ser menos específica según los datos de expresión en tejidos.

Con todo ello, el siguiente paso de la investigación comprendería la evaluación del antimiRNA de miR-424 en diferentes modelos murinos y celulares de caquexia. Con ello se pretendería definir los efectos del silenciamiento de este y evaluar su potencial terapéutico para la caquexia cancerosa.

## Conclusión

Del presente estudio se extraen las siguientes conclusiones:

- El formoterol consigue revertir la pérdida de peso en los modelos caquéticos de rata con hepatoma ascítico y ratón con carcinoma pulmonar.
- El miR-29b y miR-424 han demostrado su implicación en la caquexia cancerosa, donde se ven aumentados causando alteraciones en el normal comportamiento de los músculos. Estos miRNA están en gran parte implicados en la desregulación de la síntesis proteica.
- El anticaquético (formoterol) ha demostrado tener potentes efectos en la regulación de la expresión de los miRNA candidatos, en especial sobre miR-29b y miR-424. Validando así la implicación de miR-29b y miR-424 en la caquexia del músculo esquelético.
- El miR-424 demostró ser una buena diana terapéutica de la caquexia cancerosa. Demostró su clara implicación en la enfermedad del músculo esquelético asociada al cáncer con altos niveles de sobreexpresión en el músculo enfermo. Además, sus altos niveles de expresión en músculo sano y la presencia de pocos posibles efectos *off-target* lo hacen en especial un buen candidato para el desarrollo de terapias antimicroRNA para la caquexia cancerosa.



## Agradecimientos

En primer lugar, agradecer a ARTHEx Biotech por darme la oportunidad de realizar unas prácticas curriculares de gran calidad además de este trabajo de investigación. Agradecer a Estefanía Cerro Herreros, que ha actuado como mi tutora profesional, por guiarme y apoyarme durante mi estancia en el laboratorio de la empresa. Ha sido un placer aprender de ella. Además, dar las gracias también a todas las compañeras del laboratorio que han sido de gran ayuda a lo largo de mis prácticas profesionales.

Reconocer a Silvia Busquets y su equipo de *Bioquímica i Biologia Molecular del Càncer de la Universitat de Barcelona* por realizar el estudio *in vivo* sobre el que se basa este trabajo. Agradecer también la cesión de las muestras y de los resultados obtenidos (peso de los músculos) sin los cuales no habría sido posible la realización de este trabajo.

Por otro lado, agradecer a mi tutor de grado Manuel Suárez por ayudarme y orientarme en todo lo que fuese posible a lo largo de todo el grado universitario. Agradecerle también la gran labor que realiza como profesor y tutor, transmitiendo su pasión por la ciencia a los estudiantes. Reconocer también el trabajo de todos los profesores del grado.

Me gustaría agradecer también a Sisco Marco, profesor de Biología y Geología en el Colegio de educación secundaria Santa María de Vila-Real, por la gran labor que realiza como profesor transmitiendo su amor por la ciencia a los alumnos de secundaria. Tuve el gran placer de realizar mi primer proyecto de investigación con él, y gracias a ello nació mi pasión por la ciencia y la investigación que me llevó a estudiar el grado en biotecnología que culmina con este trabajo.

Finalmente dar las gracias a mis compañeros de piso y amigos de clase, personas que se han vuelto muy importantes para mí durante estos cuatro años de grado. A mis amigos de la infancia y compañeros de entrenos. Y a mis padres y a mi novia María por todo el apoyo y amor incondicional, sin ellos no podría haber llegado a donde estoy.



## Referencias

- Abugessaisa, Imad, Jordan A. Ramilowski, Marina Lizio, Jessica Severin, Akira Hasegawa, Jayson Harshbarger, Atsushi Kondo, et al. 2021. "FANTOM Enters 20th Year: Expansion of Transcriptomic Atlases and Functional Annotation of Non-Coding RNAs." *Nucleic Acids Research* 49 (D1): D892–98. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA1054>.
- Argilés, Josep M., Sílvia Busquets, Britta Stemmler, and Francisco J. López-Soriano. 2014. "Cancer Cachexia: Understanding the Molecular Basis." *Nature Reviews. Cancer* 14 (11): 754–62. <https://doi.org/10.1038/NRC3829>.
- Baracos, Vickie E., Lisa Martin, Murray Korc, Denis C. Guttridge, and Kenneth C.H. Fearon. 2018. "Cancer-Associated Cachexia." *Nature Reviews. Disease Primers* 4 (January). <https://doi.org/10.1038/NRDP.2017.105>.
- Cerro-Herreros, Estefanía, Irene González-Martínez, Nerea Moreno-Cervera, Sarah Overby, Manuel Pérez-Alonso, Beatriz Llamusi, and Rubén Artero. 2020. "Therapeutic Potential of AntagomiR-23b for Treating Myotonic Dystrophy." *Molecular Therapy - Nucleic Acids* 21 (September): 837–49. <https://doi.org/10.1016/J.OMTN.2020.07.021/ATTACHMENT/707C6068-B9B3-4FF7-A495-A3EB590B4CAF/MMC3.XLSX>.
- Connolly, Martin, Richard Paul, Roser Farre-Garros, Samantha A. Natanek, Susannah Bloch, Jen Lee, Jose P. Lorenzo, et al. 2018. "MiR-424-5p Reduces Ribosomal RNA and Protein Synthesis in Muscle Wasting." *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 9 (2): 400–416. <https://doi.org/10.1002/JCSM.12266>.
- Fabian, Marc R., and Nahum Sonenberg. 2012. "The Mechanics of MiRNA-Mediated Gene Silencing: A Look under the Hood of MiRISC." *Nature Structural & Molecular Biology* 19 (6): 586–93. <https://doi.org/10.1038/NSMB.2296>.
- Fernandez, Geysson Javier, Juarez Henrique Ferreira, Ivan José Vechetti, Leonardo Nazario de Moraes, Sarah Santiloni Cury, Paula Paccielli Freire, Jayson Gutiérrez, et al. 2020. "MicroRNA-MRNA Co-Sequencing Identifies Transcriptional and Post-Transcriptional Regulatory Networks Underlying

- Muscle Wasting in Cancer Cachexia.” *Frontiers in Genetics* 11 (May). <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00541/FULL>.
- Li, Jin, Mun Chun Chan, Yan Yu, Yihua Bei, Ping Chen, Qiulian Zhou, Liming Cheng, et al. 2017. “MiR-29b Contributes to Multiple Types of Muscle Atrophy.” *Nature Communications* 8 (May). <https://doi.org/10.1038/NCOMMS15201>.
- Marceca, Gioacchino P., Giovanni Nigita, Federica Calore, and Carlo M. Croce. 2020. “MicroRNAs in Skeletal Muscle and Hints on Their Potential Role in Muscle Wasting During Cancer Cachexia.” *Frontiers in Oncology* 10 (November). <https://doi.org/10.3389/FONC.2020.607196>.
- Martín, Ana Isabel, Ana Belén Gómez-Sanmiguel, Teresa Priego, and Asunción López-Calderón. 2018. “Formoterol Treatment Prevents the Effects of Endotoxin on Muscle TNF/NF-KB, Akt/MTOR, and Proteolytic Pathways in a Rat Model. Role of IGF-I and MiRNA 29b.” *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism* 315 (4): E705–14. <https://doi.org/10.1152/AJPENDO.00043.2018>.
- Moraes, Leonardo N., Geysson J. Fernandez, Ivan J. Vechetti-Júnior, Paula P. Freire, Rodrigo W.A. Souza, Rolando A.R. Villacis, Silvia R. Rogatto, Patricia P. Reis, Maeli Dal-Pai-Silva, and Robson F. Carvalho. 2017. “Integration of MiRNA and MRNA Expression Profiles Reveals MicroRNA-Regulated Networks during Muscle Wasting in Cardiac Cachexia.” *Scientific Reports* 7 (1). <https://doi.org/10.1038/S41598-017-07236-2>.
- Narasimhan, Ashok, Sunita Ghosh, Cynthia Stretch, Russell Greiner, Oliver F. Bathe, Vickie Baracos, and Sambasivarao Damaraju. 2017. “Small RNAome Profiling from Human Skeletal Muscle: Novel MiRNAs and Their Targets Associated with Cancer Cachexia.” *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 8 (3): 405. <https://doi.org/10.1002/JCSM.12168>.
- Rupaimoole, Rajesha, and Frank J. Slack. 2017. “MicroRNA Therapeutics: Towards a New Era for the Management of Cancer and Other Diseases.” *Nature Reviews. Drug Discovery* 16 (3): 203–21. <https://doi.org/10.1038/NRD.2016.246>.
- Salazar-Degracia, Anna, Sílvia Busquets, Josep M. Argilés, Núria Bargalló-Gispert, Francisco J. López-Soriano, and Esther Barreiro. 2018. “Effects of the Beta2

- Agonist Formoterol on Atrophy Signaling, Autophagy, and Muscle Phenotype in Respiratory and Limb Muscles of Rats with Cancer-Induced Cachexia.” *Biochimie* 149 (June): 79–91. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2018.04.009>.
- Soares, Ricardo José, Stefano Cagnin, Francesco Chemello, Matteo Silvestrin, Antonio Musaro, Cristiano De Pitta, Gerolamo Lanfranchi, and Marco Sandri. 2014. “Involvement of MicroRNAs in the Regulation of Muscle Wasting during Catabolic Conditions.” *The Journal of Biological Chemistry* 289 (32): 21909–25. <https://doi.org/10.1074/JBC.M114.561845>.
- Toledo, Míriam, Fabio Penna, Sílvia Busquets, Francisco J Ló Pez-Soriano, and Josep M Argilé. 2014. “Distinct Behaviour of Sorafenib in Experimental Cachexia-Inducing Tumours: The Role of STAT3.” *PloS One* 9 (12): e113931. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113931>.
- Toledo, Míriam, Jochen Springer, Sílvia Busquets, Anika Tschirner, Francisco J López-Soriano, Stefan D Anker, and Josep M Argilés. 2014. “Formoterol in the Treatment of Experimental Cancer Cachexia: Effects on Heart Function.” *J Cachexia Sarcopenia Muscle* 5 (4): 315–20. <https://doi.org/10.1007/s13539-014-0153-y>.
- Worp, Wouter R.P.H. van de, Annemie M.W.J. Schols, Anne Marie C. Dingemans, Céline M.H. Op den Kamp, Juliette H.R.J. Degens, Marco C.J.M. Kelders, Susan Coort, et al. 2020. “Identification of MicroRNAs in Skeletal Muscle Associated with Lung Cancer Cachexia.” *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle* 11 (2): 452–63. <https://doi.org/10.1002/JCSM.12512>.
- Xu, Meng, | Xiaoling Chen, Daiwen Chen, Bing Yu, Mingzhou Li, Jun He, and Zhiqing Huang. 2020. “Regulation of Skeletal Myogenesis by MicroRNAs.” *J Cell Physiol* 235: 87–104. <https://doi.org/10.1002/jcp.28986>.
- “ZENBU - Analysis Reports.” Accessed May 27, 2022. [https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/reports/#miRNA\\_expression\\_atlas\\_human](https://fantom.gsc.riken.jp/zenbu/reports/#miRNA_expression_atlas_human).



## Autoevaluación

El presente trabajo de investigación supone la culminación de mi carrera estudiantil en la *Universitat Rovira i Virgili* (URV) como profesional en el ámbito de la biotecnología. De este modo, conocimientos de biología molecular, bioquímica, farmacología y genética, obtenidos durante los cuatro años de grado universitario en biotecnología, han sido correctamente aplicados en la realización y escritura del trabajo. Con ello, he aprendido a plasmar mi conocimiento científico y a discutir los resultados obtenidos desde un punto de vista crítico. Por todo ello, creo que el presente trabajo me ha ayudado a finalizar mi formación como científico en la URV.

El tema de estudio es interesante y novedoso desde mi punto de vista, pues los miRNAs son moléculas que se conoce relativamente poco y el estudio de estas puede llevar a grandes avances en el campo de la biotecnología y la biomedicina. Además, se presenta como un trabajo con un valor añadido, pues puede suponer una potente contribución a la sociedad como punto de inicio para el desarrollo de terapias de AntimiRs para la caquexia cancerosa, un trastorno que aparece en el 30% de los pacientes con cáncer. La elección del tema de estudio ha venido desde un primer momento motivada por mi pasión por la biotecnología aplicada a las ciencias biomédicas y las terapias avanzadas. Por ello, realicé las prácticas curriculares en una reconocida empresa biotecnológica de Valencia especializada en el desarrollo de AntimiRs (ARTHEX Biotech), donde he tenido el placer de realizar los análisis y resultados en los que se basa el trabajo.

Por otro lado, al tratarse de un trabajo de final de grado experimental, me ha formado en el trabajo experimental en el laboratorio. Es decir, a plantear objetivos claros sobre los que trabajar y diseñar mis experimentos y análisis en base a estos.



**UNIVERSITAT  
ROVIRA i VIRGILI**

**TRABAJO FINAL DE GRADO**

**BIOTECNOLOGÍA**

