



VALOR TERAPÉUTICO DE LA RESTAURACIÓN DE MICROARNs SUPRESORES TUMORALES EN EL DESARROLLO DE CÁNCER DE PULMÓN

THERAPEUTIC VALUE OF RESTORATION OF TUMOR SUPPRESSOR MICRORNAs IN THE DEVELOPMENT OF LUNG CANCER

Pedro Medina Vico

GENYO. Centre for Genomics and Oncological Research: Pfizer / University of Granada / Andalusian Regional Government, PTS Granada - Avenida de la Ilustración, 114 - 18016

correspondingauthor: pedro.medina@genyo.es

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Premio OTIMES del Concurso Científico RANF 2022

RESUMEN

Los MicroARNs (miARNs) son moléculas reguladoras de la expresión de genes y como tales colaboran para determinar cuántas proteínas se producen en las células de un determinado gen. Como su nombre indican son moléculas funcionales pese a su pequeño tamaño (micro) y están constituidas por ácido ribonucleico (ARN), en contraste con los reguladores de la expresión génica más extensamente estudiados, que son de naturaleza proteica. Debido a su pequeño tamaño y su naturaleza peculiar, la presencia de los genes que codifican a los microARNs fue descubierta en el genoma humano en etapas posteriores a la de su secuenciación, ya en el siglo XXI. Los microARNs juegan un papel fundamental en el establecimiento de la identidad y el funcionamiento celular. Por lo que componentes de la maquinaria de síntesis de microARNs o microARNs per se, han sido asociados con diversas patologías humanas, incluyendo el cáncer. Se ha descubierto que los microARNs juegan un papel importante en muchos procesos celulares que están alterados en cáncer como: diferenciación, proliferación y apoptosis. Los genes que codifican para los microARNs se han encontrado en regiones cromosómicas frecuentemente ganadas o perdidas en cáncer. Algunos microARNs presentan niveles de expresión alterados en cáncer y han demostrado su capacidad para afectar la transformación celular, carcinogénesis y metástasis actuando como oncogenes o genes supresores de tumores. Así, la presencia de determinados microARNs se ha visto con utilidad clínica diagnóstica y pronóstica y se están intentando validar terapias basadas en la actividad de microARNs relevantes en cáncer. La familia de microARNs let-7 fue la primera descubierta en humanos. Muchos de sus miembros están en regiones cromosómicas frecuentemente delecionadas en tumores de cáncer de pulmón. Además, se ha correlacionado una expresión reducida de estos genes con un peor pronóstico cáncer de pulmón. Se piensa que el papel de supresor tumoral que ejerce let-7 es debido a que es capaz de inhibir la síntesis de importantes oncogenes tales como RAS, MYC y HMGA2 y la de proteínas implicadas en la progresión del ciclo celular como CDC25A, CDK6 y la Ciclina D2. En el presente trabajo se recogen resultados experimentales que indican que la pérdida de función de let-7 favorece el desarrollo tumoral en un modelo tumoral de ratón, sugiriendo la hipótesis de que la actividad de let-7 colabora para evitar la formación de tumores. Por otra parte, se exponen resultados que indican que la reintroducción de la actividad de let-7 en tumores pulmonares ya establecidos dificultan significativamente su crecimiento, entrando incluso en regresión. Estos resultados pre-clínicos demuestran el potencial terapéutico antitumoral de la actividad de let-7 y que su reintroducción en tumores pulmonares podría tener utilidad clínica si se pudiera realizar de forma eficiente y segura.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are molecules that regulate gene expression and as such they collaborate to determine how many proteins are produced in the cells of a given gene. As their name indicates, they are functional molecules despite their small size (micro) and are made up of ribonucleic acid (RNA), in contrast to the most extensively studied regulators of gene expression, which are protein in nature. Due to its small size and peculiar nature, the presence of the genes that encode microRNAs was discovered in the human genome in stages after its sequencing, already in the 21st century.

MicroRNAs play a fundamental role in establishing cellular identity and function. Therefore, components of the microRNA synthesis machinery, or microRNAs per se, have been associated with various human pathologies, including cancer.

It has been discovered that microRNAs play an important role in many cellular processes that are altered in cancer such as: differentiation, proliferation, and apoptosis. The genes that code for microRNAs have been found in chromosomal regions frequently gained or lost in cancer. Some microRNAs have altered expression levels in cancer and have demonstrated their ability to affect cellular transformation, carcinogenesis, and metastasis by acting as oncogenes or tumor suppressor genes. Thus, the presence of certain microRNAs has been seen to have clinical diagnostic and prognostic utility and attempts are being made to validate therapies based on the activity of relevant microRNAs in cancer.

The let-7 family of microRNAs was the first discovered in humans. Many of its members are in chromosomal regions frequently deleted in lung cancer tumors. Furthermore, reduced expression of these genes has been correlated with a worse lung cancer prognosis. It is thought that the role of let-7 as a tumor suppressor is due to the fact that it is capable of inhibiting the synthesis of important oncogenes such as RAS, MYC and HMGA2 and that of proteins involved in cell cycle progression such as CDC25A, CDK6 and Cyclin D2. In the present work, experimental results are collected that indicate that the loss of function of let-7 favors tumor development in a mouse tumor model, suggesting the hypothesis that the activity of let-7 collaborates to prevent tumor formation. On the other hand, results are presented that indicate that the reintroduction of let-7 activity in already established lung tumors significantly hinders their growth, even entering regression. These preclinical results demonstrate the antitumor therapeutic potential of let-7 activity and that its reintroduction into lung tumors could have clinical utility if it could be performed efficiently and safely.

Palabras Clave:

microARN
 cancer
 genes supresores tumorales
 terapias anti-tumorales
 terapias experimentales

Keywords:

microRNA
 tumor suppressor genes
 cancer
 anti-tumor therapies
 experimental therapies

**Valor terapéutico de la restauración de microARNs
 supresores tumorales en el desarrollo de cáncer de pulmón**

Pedro Medina Vico

287



1. LA FAMILIA DE MICROARNs *LET-7* Y SU PAPEL EN EL CÁNCER

Los micro-ARN (miARNs) son transcritos de genes que no se traducen a proteínas, y que ejercen papeles de regulación sobre la traducción de otros transcritos. El descubrimiento de la presencia de estos genes en el genoma humano, ya entrado en el siglo XXI, ha supuesto un cambio en el paradigma y función que se le otorgaba a los genes no codificantes de proteínas y sus transcritos (los ARN no codificantes).

El primer miembro de estos genes se descubrió al comienzo de la década de los ochenta en el gusano *C. elegans* (Ambros, 1989; Chalfie et al., 1981). En principio se pensó que era una peculiaridad de este nematodo, sin embargo, años después se empezaron a encontrar secuencias homólogas en otros organismos, incluidos los humanos, hasta el punto de que se ha estimado que corresponden al 1-4% de todos los genes transcritos humanos (Bentwich et al., 2005; Lim et al., 2003), siendo una de las familias de genes reguladores más abundante del genoma. Actualmente, en octubre de 2023 se han censado en la base de datos miRbase (<https://mirbase.org/>) 1917 secuencias encontradas en el genoma humano que podrían codificar a microARNs, de entre ellas existe evidencia alta de que lo hagan en más de quinientas. El papel de los microARNs sobre la síntesis de proteínas ha abierto un nuevo campo en la patología molecular, ya que disfunciones en la actividad de estos reguladores puede generar diversas patologías cuya causa no se había podido hallar hasta ahora.

El primer microARN descubierto en humanos se trató de *let-7a*. Su descubrimiento se hizo evidente cuando se compararon los genomas de humanos y del nematodo *C. elegans* y se halló que la secuencia funcional del gen *lethal-7* de *C. elegans* tenía una secuencia ortóloga en humanos (*hsa-let-7a*). De hecho, el genoma humano presenta, una, familia de microARNs *let-7*, compuesta por

12 genes que codifican para 9 microARN maduros, esto es así porque tres de ellos codifican para el mismo microARN maduro. Estos microARNs se agrupan en una familia porque presentan unas secuencias muy similares de 21-22 nucleótidos, que presentan en el extremo 5' una región conservada llamada semilla de familia (family seed), implicada en su funcionalidad y en el reconocimiento de dianas (Figura 1).

En este trabajo se expondrán resultados que intentan profundizar en el conocimiento de la implicación de los microARNs en el desarrollo del cáncer de pulmón con el fin de diseñar terapias experimentales que sirvan como prueba de concepto para su futuro aplicación en la clínica.

El cáncer de pulmón es el tumor más importante en cuanto a mortalidad en el mundo occidental. En España en el 2022 se diagnosticaron alrededor de 31000 casos nuevos de cáncer de pulmón y ha sido responsable de alrededor de 22000 muertes. Esto le hace ser el segundo tipo de cáncer en cuanto a incidencia (tras el cáncer colorrectal) y el primero en cuanto mortalidad. Como enfermedad, el cáncer de pulmón sigue siendo altamente letal, ya que menos del 15% de los pacientes españoles logran sobrevivir cinco años tras el diagnóstico. La letalidad de los cánceres de estómago, hígado, páncreas, esófago y estómago son comparables a la que tiene el cáncer de pulmón, aunque la suma de muertes que estos producen es la mitad de las que este produce el cáncer de pulmón.

Actualmente existen un número de evidencias creciente que vinculan la carcinogénesis pulmonar con aberraciones en los microARNs y en concreto con la familia *let-7*, algunas de las más significativas son:

- 1) Se ha observado que la ARNasa encargada de la maduración citoplasmática de los transcritos de miARNs (DICER) presenta una pérdida de expresión en cáncer de pulmón relacionada con un peor pronóstico (Karube et al., 2005).

Gene	Genome position	
mmu-let-7a-1	13:48550116-48550209	mmu-let-7a TGAGGTTAGTGGTTGTATAGT
mmu-let-7a-2	09:41287785-41287880	mmu-let-7b TGAGGTTAGTGGTTGTGTGGTT
mmu-let-7b	15:85535085-85535169	mmu-let-7c TGAGGTTAGTGGTTGTATGGTT
mmu-let-7c-1	16:77482249-77482342	mmu-let-7d AGAGGTTAGTGGTTGCATAGT
mmu-let-7c-2	15:85534369-85534463	mmu-let-7e TGAGGTTAGGAGTTGTATAGT
mmu-let-7d	13:48547949-48548051	mmu-let-7f TGAGGTTAGATTGTATAGT
mmu-let-7e	17:17534970-17535062	mmu-let-7g TGAGGTTAGTTTGTACAGT
mmu-let-7f-1	13:48549766-48549854	mmu-let-7i TGAGGTTAGTTTGTGCTGT
mmu-let-7f-2	0X:147253062-147253144	mmu-mir-98 TGAGGTTAGTAAGTTGTATTGTT
mmu-let-7g	09:106036941-106037028	Consensus tGAGGTTAggTTGtataGT.
mmu-let-7i	10:122388700-122388784	***** Family seed
mmu-mir-98	0X:147253930-147254037	

Figura 1: Familia de microARNs *let-7*: en ratón, al igual que en humanos, existen 12 genes (situados en diferentes posiciones cromosómicas) que codifican para 9 microARNs maduros (representados en la derecha). Las familias de microARNs comparten una secuencia (family seed) que está implicada en el reconocimiento de sus dianas y su funcionalidad, para la familia de *let-7* esta secuencia es (GAGGTAG).



- 2) La expresión de los genes de la familia de microARNs let-7 está reducida significativamente en tumores pulmonares pareados (Takamizawa et al., 2004).
- 3) Varios genes de la familia de microARNs let-7 mapean en regiones genómicas que están deletadas en tumores primarios pulmonares (Calin et al., 2004)
- 4) La familia de microARNs let-7 puede inhibir el crecimiento tumoral en algunos modelos celulares experimentales (Johnson et al., 2007)
- 5) La expresión de genes importantes para el desarrollo tumoral como el oncogén KRAS (un oncogén significativamente alterado en cáncer de pulmón) está regulado por los genes de la familia de microARNs let-7 (Johnson et al., 2005).

A continuación, se expondrán evidencias experimentales desarrolladas en preclínicos *in vivo* (Trang P, Medina P.P. et al., 2010) que pueden utilizarse para determinar el papel biológico de let-7 en el desarrollo tumoral y para desarrollar terapias experimentales antitumorales.

2. LA RE-INTRODUCCIÓN DE *LET-7* EN TUMORES HUMANOS TRANSPLANTADOS EN RATONES INMUNODEFICIENTES REDUCE EL DESARROLLO TUMORAL

Estos estudios tenían como objetivo, estudiar qué pasa cuando se recupera la actividad de let-7, que se pierde en pacientes de cáncer de pulmón.

Para realizar estos estudios se utilizaron ratones severamente inmunodeprimidos del tipo NOD/SCID. Dichos ratones carecen de linfocitos funcionales, por lo que tienen muy dificultado el rechazo de células tumorales humanas, pudiéndose establecer en ellos trasplantes de tumores humanos (xenografts).

Se utilizó la línea celular H460, derivada de un tumor humano de células no pequeñas de cáncer de pulmón. Esta línea celular está entre las líneas celulares más agresivas y refractarias a terapias antitumorales convencionales (Hohla et al., 2007; Isobe et al., 2005).

Tres millones de células H460 fueron inyectadas subcutáneamente a cada ratón NOD/SCID (n=6). Once días después de la inoculación, los ratones desarrollaron tumores palpables de entre 100 y 150 mm³ y fueron inyectados intratumoralmente con suspensiones que contenían el microARN let-7b sintético (oligonucleótidos obtenidos de Ambion, Austin, TX, USA) o un microARN sintético de secuencia aleatoria (miR-NC utilizado como control). Dichos microARN se acomplejaron previamente con un agente de transfección lipídico desarrollado específicamente para ARNs pequeños (siPORT, obtenido de Ambion, Austin, TX, USA)

El tratamiento fue repetido cada tres días (a los días 11, 14, 17, 20), y la dinámica de crecimiento tumoral fue analizada durante las siguientes semanas, hasta que los ratones presentaron un tumor que excedía los 600 mm³ momento en el cual los ratones fueron sacrificados. Los tumores tratados solamente con el agente de transfección (siPORT), con suero salino (PBS) o con el microARN control (miR-NC) desarrollaron una dinámica de crecimiento similar. Sin embargo, los tumores que fueron tratados con let-7b, sufrieron una significativa reducción en su tasa de crecimiento (Figura 2).

Trascurridos 21 días los ratones fueron sacrificados y sus tumores fueron estudiados histológicamente. Un análisis de microsecciones teñidas con hematoxilina y eosina (H&E) mostraron que los ratones controles (bien los tratados con el microARN control, o bien los tratados únicamente con el agente de transfección, siPORT) mostraron células densamente empaquetadas y sanas (marcadas como v), con pocas regiones necróticas (marcadas como d), en

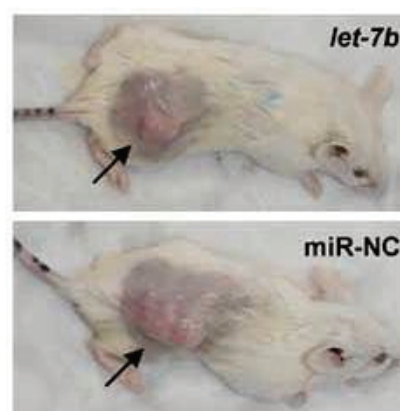
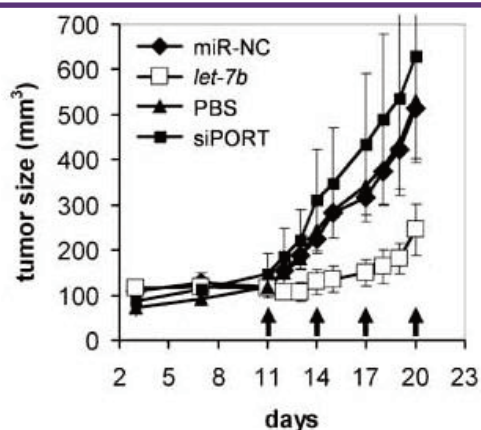


Figura 2: Izquierda Dinámica de crecimiento tumoral de xenografts en grupos de ratones (n=6) tratados con let-7b (cuadrados blancos), microARN control (rombos), el agente de transfección siPORT solamente (cuadrados negros) y suero salino (PBS) (triángulos). En ordenadas se representa el tamaño tumoral en milímetros cúbicos, en abscisas el tiempo en días. Las flechas indican los días en los cuales los ratones fueron tratados (11,14,17,20). Derecha: una pareja de ratones representativos cuyo tumor (flechas) fue tratado con let-7b o con el microARN control.

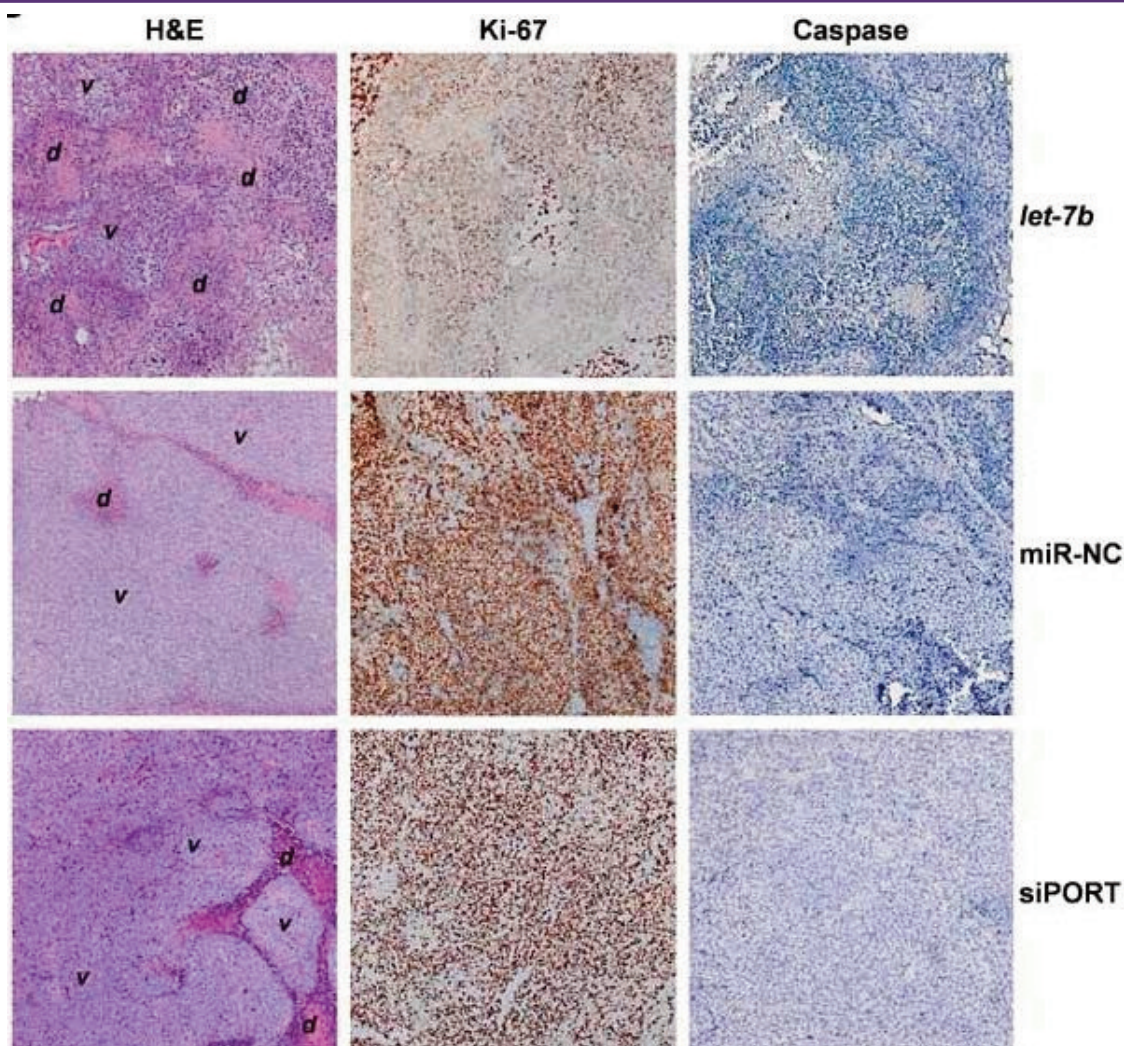


Figura 3: Histología de los tumores xenografts : Microsecciones histológicas teñidas con hematoxilina-eosina (H&E), el marcador de proliferación tumoral (Ki-67) y el marcador de apoptosis (caspase-3). Las células controles (tratadas con el agente de transfección siPORT) o con el microARN control (miR-NC) presentan una morfología viable (marcado como v en H&E) y unos niveles de proliferación (Ki67) sensiblemente superior a las tratadas con let-7b, que presentan abundante necrosis (marcada como d). Sin embargo, los niveles de apoptosis (que se deberían de marcar como marrón en el cuadro caspase) son similares y bajos en todos los tumores.

contraposición con los tumores que recibieron let-7b que presentaron amplias regiones con células muertas (Figura 3).

Las microsecciones tumorales fueron analizadas utilizando el marcador de proliferación celular Ki-67 y el marcador apoptótico (caspase-3), con el fin de evaluar la dinámica de crecimiento tumoral y de apoptosis. Los tumores controles (miR-NC y siPORT) presentaron una marcada presencia del antígeno ki-67 (teñido en marrón oscuro), mientras los tumores tratados con let-7b, presentaron una considerable reducción de este marcador. Sin embargo, los niveles de caspase-3 eran similares y bajos en todos los tumores. Así se puede concluir, que los efectos de la reintroducción de let-7b se deben en mayor medida a un efecto en una disminución en la proliferación tumoral y no en un aumento en la apoptosis de esta.

Con el fin de comprobar que dichos tumores incrementaban los niveles de let-7b tras la inyección del preparado

de oligos sintéticos se realizó una PCR cuantitativa capaz de detectar al microARN let-7b maduro (Taqman miRNA, AB). Se observó que los tumores inyectados con los oligos let-7b tenían unos 14 veces más niveles de let-7b en comparación con los tumores provenientes de los controles (miR-NC, siPORT, PBS), confirmándose la adquisición de let7b por parte de las células tumorales inyectadas (Figura 4).

La familia de microARNs let-7 actúa como tumor supresor, inhibiendo la expresión de importantes oncogenes (Johnson et al., 2007), por lo que, con el fin de ver la actividad del microARN transfectado se midió la cantidad de mensajero de dos de sus dianas: CDK6 y N-RAS. Se observó una sensible disminución de esta en los tumores tratados (Figura 4). Concluyéndose que el let-7 inyectado intratumoralmente, no es solo capaz de penetrar en las células tumorales, sino que es capaz de ejercer su función inhibiendo rutas oncogénicas conocidas para impedir el crecimiento tumoral.

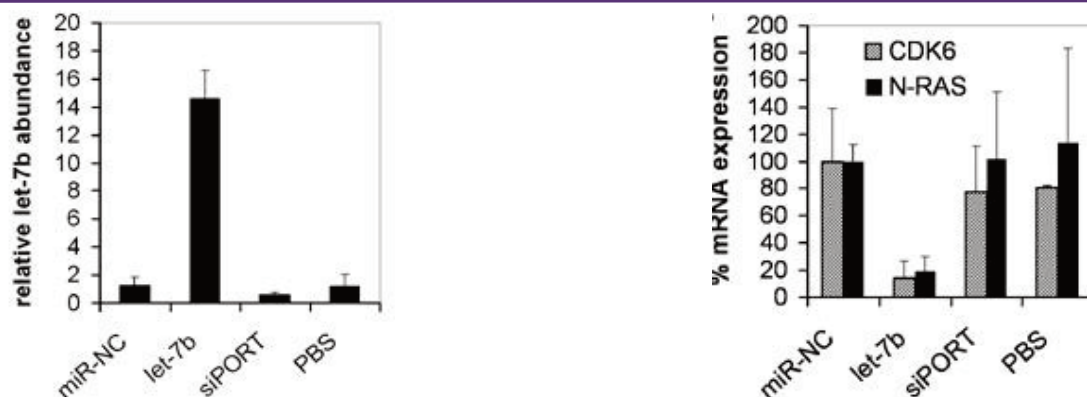


Figura 4: Izquierda: Niveles de let-7b en tumores tratados medido por PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos para detectar let-7b. Derecha: niveles de conocidas dianas de let-7 (CDK6, N-RAS) medidos por PCR cuantitativa utilizando cebadores específicos. Los datos muestran medias y errores de tres ratones analizados.

3. LA EXPRESIÓN DE LET-7 EN TUMORES DESARROLLADOS EN RATONES QUE TIENEN ACTIVADO EL ONCOGÉN RAS PROVOCA REGRESIÓN TUMORAL

Para observar si *let-7* podía reducir la carga tumoral actuando como un supresor tumoral in vivo, se utilizó un modelo de ratón transgénico (Jackson et al., 2001) que desarrolla tumores pulmonares en pocas semanas cuando se activa la forma mutada del oncogén K-RAS (G12D). Dicha activación se produce a través de la administración de la recombinasa cre mediante adenovirus inoculados al pulmón por el pasaje nasofaríngeo (Figura 5). Se utilizó este modelo debido a que previamente se había demostrado que *let-7* era capaz de inhibir los niveles de expresión de K-RAS (Johnson et al., 2005), por lo que este modelo puede poner más fácilmente el papel de *let-7* en el desarrollo tumoral.

Se utilizaron 18 ratones LSL-Kras-G12D de 6 semanas, a los que se administraron 5x10⁸ PFUs unidades de adenovirus

intranasalmente. Después de 10 semanas de incubación, se dividieron en tres grupos de seis ratones (0, L, C). Un grupo de ratones (0) se sacrificaron para obtener una idea de la carga tumoral en el momento del tratamiento, los dos restantes grupos (L y C) se inocularon con 1x10⁶ PFUs unidades de lentivirus que codificaban para *let-7* y un plásmido vacío (utilizado como control) respectivamente. Los dos grupos de ratones en tratamiento se mantuvieron durante cuatro semanas más y posteriormente fueron sacrificados para analizar su carga tumoral.

La carga tumoral fue medida en los diferentes grupos. El grupo de ratones tratado con *let-7* (L) presentó una carga tumoral significativamente menor a los grupos 0 ($p=0.04$) y C ($p=0.01$) (Figura 6). De esta forma, el grupo L tenía una carga tumoral un 75% menor que el grupo C y un 64% menor que el grupo 0. Por lo que se puede concluir que el tratamiento de los tumores con *let-7* induce una sensible regresión tumoral y que la administración de *let-7* puede tener un valor terapéutico en el cáncer de pulmón.

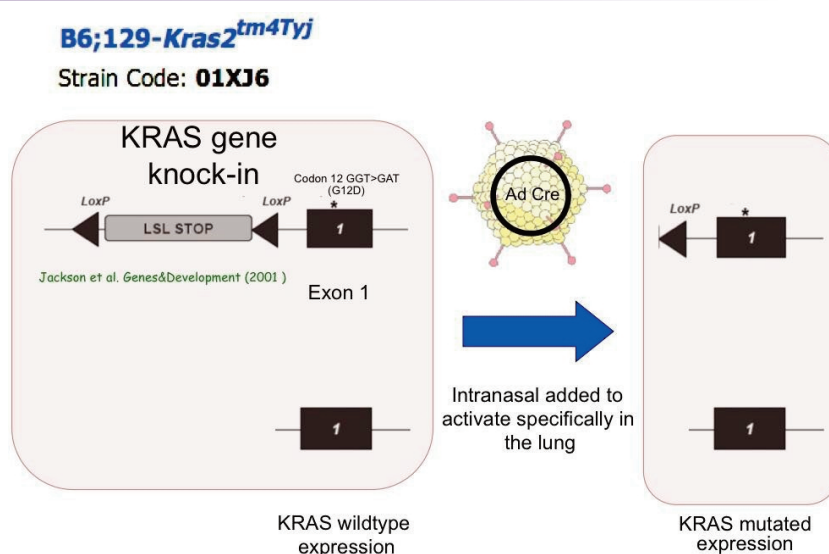


Figura 5: Ratón transgénico LSL-Kras-G12D (Strain 01X6). La forma mutada de KRAS (G12D) se activa mediante la inoculación de adenovirus intranasalmente que codifican para la recombinasa Cre (Jackson et al., 2001). La actividad recombinasa elimina la secuencia parada (LSL STOP), por lo que la forma mutada de K-RAS (G12D) se transcribe.

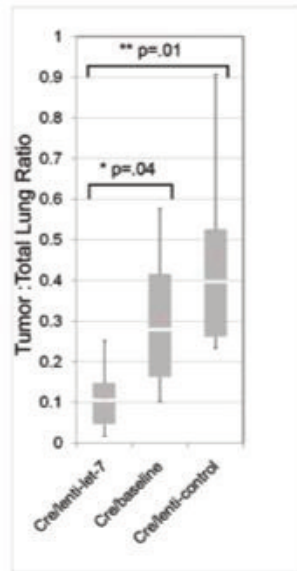


Figura 6: Carga tumoral de los grupos de ratones justo antes del tratamiento (0, Cre/basilene), el grupo de los ratones tratados con let-7 (L, Cre-lenti-let-7) y el grupo de los ratones tratados con el control (C, Cre-lenti-control). Los tumores tratados con let-7 presentan una carga tumoral significativamente menor que los grupos 0, observándose por lo tanto una regresión tumoral tras el tratamiento con let-7. El método de medición de carga tumoral usado se describe en (Esquela-Kerscher et al., 2008).

Los tumores fueron analizados histológicamente con el fin de evaluar los efectos de let-7 en la proliferación (observando la expresión de ki-67). Al igual de lo observado en los xenografts, los tumores tratados con let-7 presentan una reducción en los niveles de proliferación (Figura 7).

4. EL BLOQUEO DE LA ACTIVIDAD DE LET-7 PROMUEVE EL DESARROLLO TUMORAL PULMONAR

Aunque hay bastantes evidencias de que let-7 funciona como supresor tumoral en cáncer de pulmón (Johnson et al., 2005; Takamizawa et al., 2004) existían pocas evidencias *in vivo* de que la pérdida de función de let-7 promovía el desarrollo pulmonar.

Para realizar este experimento se utilizó unos inhibidores que se habían utilizado con éxito para bloquear funcionalmente a microARNs (Kruzfeldt et al., 2005). Estos inhibidores (anti-miRs), consisten en secuencias inversas complementarias a los microARNs maduros, que presentan modificaciones químicas (enlaces fosfotioato y bases metiladas en la ribosa) que aumentan su estabilidad *in vivo* (Figura 8).

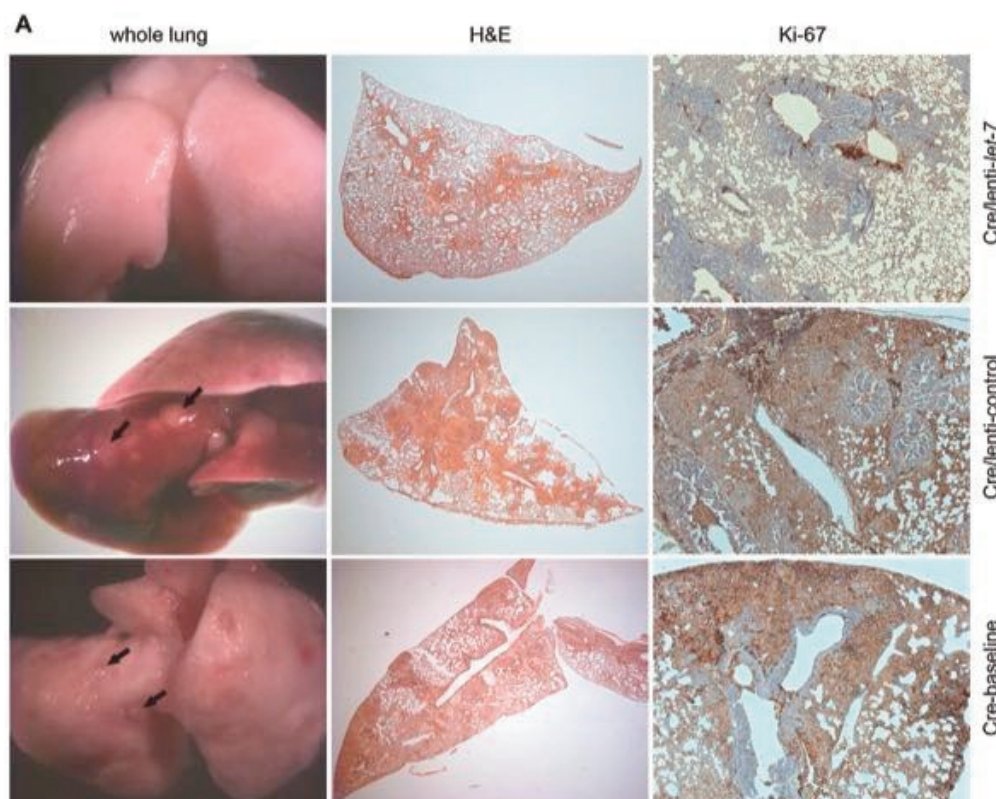


Figura 7: Izquierda: superficie pulmonar de los ratones justo antes del tratamiento (Grupo 0, Cre-baseline), tratados con el control (cre/lenti-control) y tratados con let-7 (cre/lenti-let-7). Las flechas negras indican abscesos tumorales. Centro: sección histológica pulmonar teñida con hematoxilina-eosina (H&E), nótese la hiperplasia tumoral más pronunciada en el grupo 0 y C. Izquierda: sección histológica pulmonar que revela la presencia del marcador de proliferación Ki-67, obsérvese una sensible disminución de proliferación en los tumores tratados con let-7.

Therapeutic value of restoration of tumor suppressor

292 microRNAs in the development of lung cancer

Pedro Medina Vico

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 287-296



mmu-let7-g

Mature miRNA (21pb)
5' **UGAGGUAGUAGUUUGUACAGU** 3'
ACUCCAUCAUCAACAUGUCA 5'

Antimir 7g
5' **A*C*UGUACAAACUACUACCU*C*A** 3'

Scramble (control)

5' **ugcugaauauacguuguugag** 3'
3'ACGACUUUAUGCAACAACUC 5'

Similar GC% composition.
Largest area of homology to any gene in
Mouse 14pb (no human and mouse homology)

Antimir sc

5' **C*U*CAACAACGUAUAUUCAG*C*A** 3'

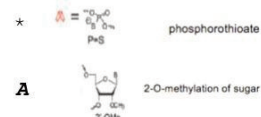


Figura 8: Anti-miRs: moléculas inhibitorias dirigidas contra let-7g se tratan de secuencias reversas complementarios al microARN (mmu-let-7, en azul este caso) modificadas químicamente para aumentar su estabilidad utilizando enlaces fosfotioato (*) y ribosas metiladas (marcadas en cursiva) de igual forma que se describe en (Kruzfeldt et al., 2005). Se utilizó una secuencia aleatoria control (scramble) de similar composición GC al microARN experimental pero sin homología con el genoma.

De entre los 9 miembros de la familia de microARNs let-7, se utilizó el let-7g por el hecho de que se había observado que let-7g se encuentra en la región cromosómica 3p21, implicada en la iniciación del cáncer (Calin et al., 2004) y porque existen evidencias que let-7g tiene efectos especialmente supresores en tumores que albergan mutaciones K-RAS (Kumar et al., 2008). Sin embargo, dada la alta homología presente en la familia de genes let-7, no podemos descartar que este anti-miR pueda tener una reacción cruzada para inhibir a otros miembros de la familia let-7.

El protocolo de administración de los anti-miRs se basó en un trabajo anterior en el cual se inoculaba intranasalmente de forma eficaz siRNA (Bitko and Barik, 2008; Bitko et al., 2005). Para cerciorarse que los anti-miRs eran capaces de acceder a las células pulmonares, se diseñó unos anti-miRs reporteros, que tenían en su extremo fluoresceína amidato (FAM) de forma que pudiera revelarse su presencia iluminando con luz azul (que la fluoresceína refleja como luz verde). De esta forma se pudo detectar que los inhibidores eran capaces de penetrar en las células pulmonares (figura 9).

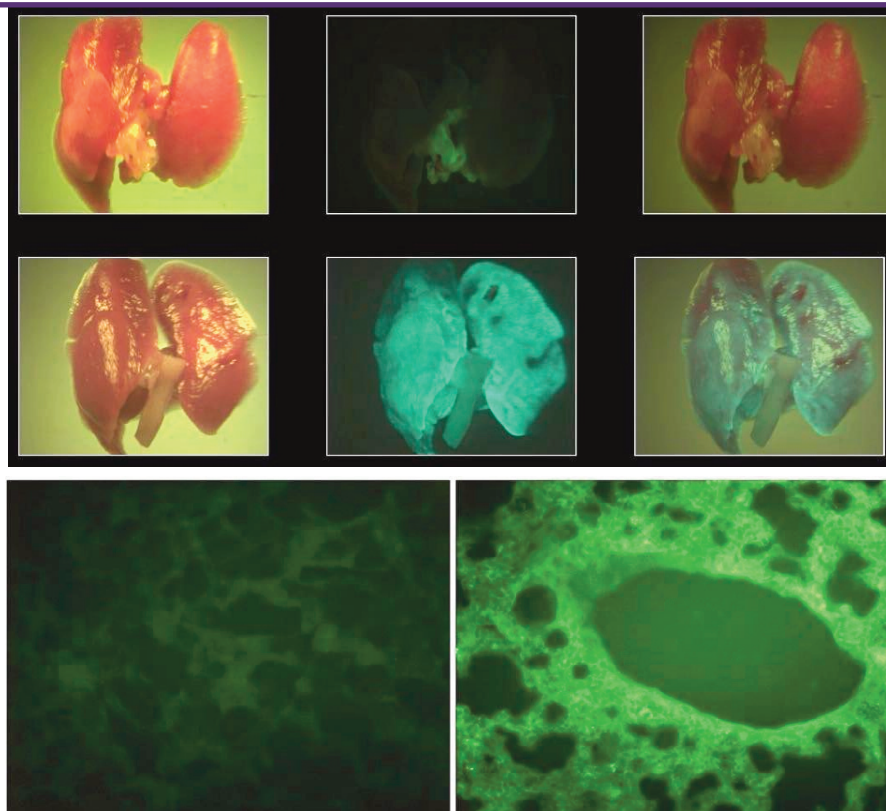


Figura 9: Superior: Pulmones de ratones a los que se había inoculado anti-miR-FAM reporteros (abajo) y pulmones normales (arriba) 16 horas después de la inoculación. Obsérvese que los pulmones inoculados con anti-miR reporteros presentan fluorescencia verde cuando se les ilumina con luz azul (centro). A la derecha puede observarse la superposición de imágenes. Inferior: fluorescencia en el tejido pulmonar (x400) donde puede observarse las células del parénquima bronquial de los pulmones sin tratar (izquierda) y tratados con los anti-miRs reporteros (derecha).



Para ver si estos inhibidores de let-7 eran capaces de modificar el desarrollo tumoral se administraron a ratones LSL-Kras-G12D (ver figura 5), de esta forma se podría validar la hipótesis de si el bloqueo funcional de let-7 promovía el desarrollo tumoral.

Se administró 60 μ g de anti-let7-g o anti-control (n=5) a los ratones LSL-Kras-G12D de forma simultánea que se les

activaba la forma mutante de K-RAS. A las siete semanas los ratones fueron sacrificados para analizar la carga tumoral de sus pulmones.

Los pulmones tratados con los inhibidores de let-7 presentaban una significativa mayor carga tumoral en comparación con los tumores tratados con el control (Figura 10) y una histología tumoral más avanzada (Figura 11).

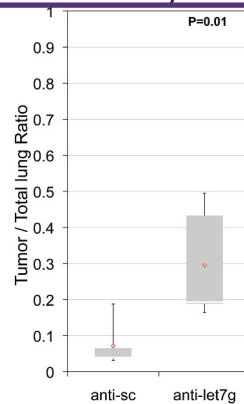


Figura 10: Carga tumoral de los ratones LSL-Kras-G12D tratados con el inhibidor de let-7g (anti-let-7g) y el control anti-sc. Obsérvese una significativa mayor carga tumoral en los tumores en los que se inhibe anti-let-7g.

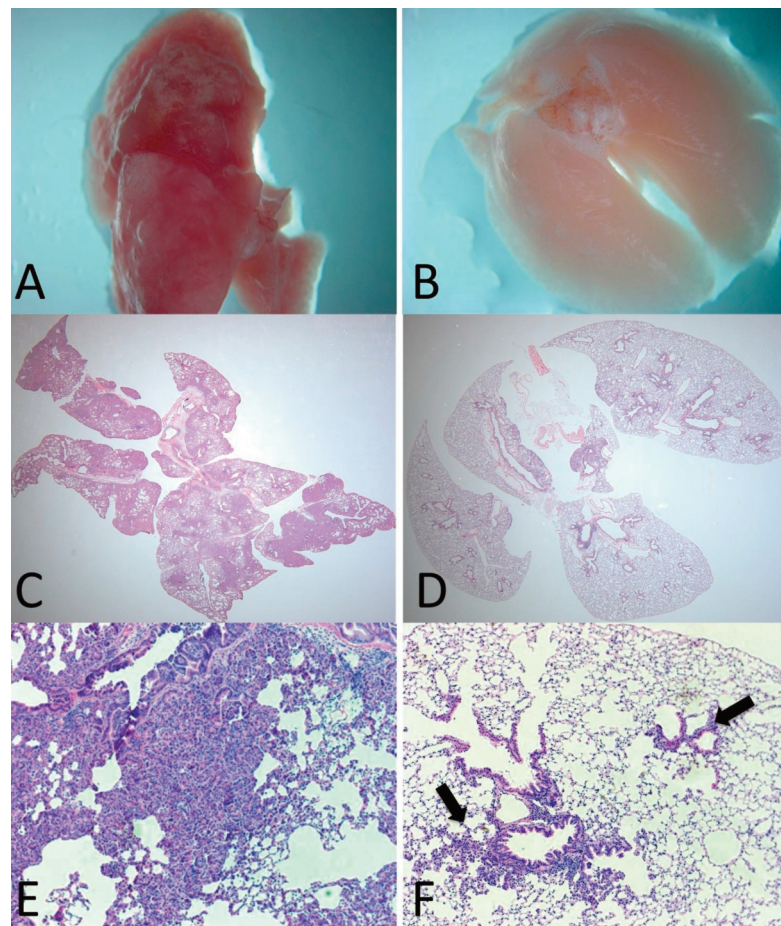


Figura 11: A-B: Pulmones de ratones tratados con inhibidores de let-7 (izquierda) y con el control (derecha). Obsérvese la superficie pulmonar llena de abscesos tumorales en los pulmones tratados con let-7. C-D: Secciones histológicas de los pulmones mostrados arriba (x100) teñidas con hematoxilina-eosina. E-F: Secciones histológicas de los pulmones mostrados arriba (x400): Nótese una hiperplasia-displasia avanzada en los pulmones tratados con inhibidores de let-7. Las flechas negras indican una hiperplasia incipiente en el tejido tratado con el control, una etapa temprana en el desarrollo tumoral.

Therapeutic value of restoration of tumor suppressor

294 microRNAs in the development of lung cancer

Pedro Medina Vico

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 287-296



5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Las evidencias presentadas indican que la inhibición de genes de la familia let-7 promueve el cáncer en un modelo preclínico *in vivo* dirigido por el oncogén K-ras, mientras que el aumento de su expresión suprime el crecimiento tumoral en tumores xenotrasplantados e incluso provoca su regresión. Esta serie de observaciones cimentan que se pueda considerar a la familia de microRNAs let-7 como genes supresores tumorales relevantes en el desarrollo de cáncer de pulmón.

La relevancia de let-7 en la patología del cáncer se debe a su función como modelador de oncogenes importantes como ras, myc o cdk6 como se había visto anteriormente (Johnson et al., 2007; Johnson et al., 2005). Así se ha observado que la supresión tumoral ejercida por let-7 se debe principalmente a una bajada de la señal proliferativa, más que por un aumento de las rutas apoptóticas.

De forma más trascendente para la clínica, estos estudios sugieren que la re-introducción de let-7 puede tener utilidad terapéutica para tratar el cáncer de pulmón. Estos resultados se unen a otros en las que el valor terapéutico de los microARNs se había puesto de manifiesto en modelos de cáncer de hígado (Kota et al., 2009) y de próstata (Takeshita et al.). Si bien estos estudios son prometedores y sientan las bases para fundamentar estudios traslacionales clínicos, es necesario continuar investigando para utilizar a los microARNs como terapias efectivas en la clínica.

Los nuevos conocimientos alcanzados durante la optimización de las vacunas de ARN, podrían impulsar y mejorar las posibilidades para llevar a la clínica el uso de fármacos basados en la actividad de los microARNs.

6. REFERENCIAS

1. Ambros, V. (1989). A hierarchy of regulatory genes controls a larva-to-adult developmental switch in *C. elegans*. *Cell* 57, 49-57.
2. Bartel, D.P. (2004). MicroARNs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281-297.
3. Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., et al. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microARNs. *Nat Genet* 37, 766-770.
4. Bitko, V., and Barik, S. (2008). Nasal delivery of siRNA. *Methods Mol Biol* 442, 75-82.
5. Bitko, V., Musiyenko, A., Shulyayeva, O., and Barik, S. (2005). Inhibition of respiratory viruses by nasally administered siRNA. *Nat Med* 11, 50-55.
6. Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 15524-15529.
7. Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di Leva, G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., et al. (2005). A MicroARN signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 353, 1793-1801.
8. Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microARN genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2999-3004.
9. Chalfie, M., Horvitz, H.R., and Sulston, J.E. (1981). Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of *C. elegans*. *Cell* 24, 59-69.
10. Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 13944-13949.
11. Esquela-Kerscher, A., and Slack, F.J. (2006). Oncomirs - microARNs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 259-269.
12. Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microARNs. *Nature* 432, 235-240.
13. He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., et al. (2005). A microARN polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435, 828-833.
14. Hohla, F., Schally, A.V., Kanashiro, C.A., Buchholz, S., Baker, B., Kannadka, C., Moder, A., Aigner, E., Datz, C., and Halmos, G. (2007). Growth inhibition of non-small-cell lung carcinoma by BN/GRP antagonist is linked with suppression of K-Ras, COX-2, and pAkt. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 18671-18676.
15. Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834-838.
16. Isobe, T., Herbst, R.S., and Onn, A. (2005). Current management of advanced non-small cell lung cancer: targeted therapy. *Semin Oncol* 32, 315-328.
17. Jackson, E.L., Willis, N., Mercer, K., Bronson, R.T., Crowley, D., Montoya, R., Jacks, T., and Tuveson, D.A. (2001). Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras. *Genes Dev* 15, 3243-3248.
18. Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J.,



- Shingara, J., et al. (2007). The let-7 microARN represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res* 67, 7713-7722.
19. Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS is regulated by the let-7 microARN family. *Cell* 120, 635-647.
 20. Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., et al. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96, 111-115.
 21. Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.W., Chang, T.C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., et al. (2009). Therapeutic microARN delivery suppresses tumorigenesis in a murine liver cancer model. *Cell* 137, 1005-1017.
 22. Krutzfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microARNs in vivo with 'antagomirs'. *Nature* 438, 685-689.
 23. Kumar, M.S., Erkeland, S.J., Pester, R.E., Chen, C.Y., Ebert, M.S., Sharp, P.A., and Jacks, T. (2008). Suppression of non-small cell lung tumor development by the let-7 microARN family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3903-3908.
 24. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microARNs from mouse. *Curr Biol* 12, 735-739.
 25. Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2003). Vertebrate microARN genes. *Science* 299, 1540.
 26. Liu, J., Valencia-Sanchez, M.A., Hannon, G.J., and Parker, R. (2005). MicroARN-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol* 7, 719-723.
 27. Medina, P.P., and Slack, F.J. (2008). microARNs and cancer: an overview. *Cell Cycle* 7, 2485-2492.
 28. O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microARNs modulate E2F1 expression. *Nature* 435, 839-843.
 29. Richardson, G.E., and Johnson, B.E. (1993). The biology of lung cancer. *Semin Oncol* 20, 105-127.
 30. Shiraishi, M., Noguchi, M., Shimosato, Y., and Sekiya, T. (1989). Amplification of protooncogenes in surgical specimens of human lung carcinomas. *Cancer Res* 49, 6474-6479.
 31. Slack, F.J., and Weidhaas, J.B. (2006). MicroARNs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol* 2, 73-82.
 32. Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., et al. (2004). Reduced expression of the let-7 microARNs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64, 3753-3756.
 33. Takeshita, F., Patrawala, L., Osaki, M., Takahashi, R.U., Yamamoto, Y., Kosaka, N., Kawamata, M., Kelnar, K., Bader, A.G., Brown, D., et al. Systemic delivery of synthetic microARN-16 inhibits the growth of metastatic prostate tumors via downregulation of multiple cell-cycle genes. *Mol Ther* 18, 181-187.
 34. Trang P, Medina P P, J F Wiggins, L Ruffino, K Kelnar, M Omotola, R Homer, D Brown, A G Bader, J B Weidhaas, F J Slack. (2010). *Oncogene* 2010 Mar 18;29(11):1580-7.
 35. Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microARNs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 17, 3011-3016.

Si desea citar nuestro artículo:

Valor terapéutico de la restauración de microARNs supresores tumorales en el desarrollo de cáncer de pulmón

Pedro Medina Vico

An Real Acad Farm (Internet].

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº (2023) · pp. 287-296

DOI: <http://dx.doi.org/10.53519/analesranf.2023.89.03.03>

Therapeutic value of restoration of tumor suppressor microRNAs in the development of lung cancer

Pedro Medina Vico

An. Real Acad. Farm. Vol. 89. nº 3 (2023) · pp. 287-296