



Trabajo Fin de Grado  
Grado en Bioquímica y Biología Molecular

# MicroRNAs en la Quimiorresistencia del Cáncer Hepático

Autora:

Inés Oyarzabal Echevarri

Director:

Dr. Antonio Gómez Muñoz

Co-directora:

Dra. M<sup>ª</sup> Luz Martínez-Chantar

© 2017, Inés Oyarzabal Echevarri

Leioa, 20 de junio de 2017

# ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	1-3
<b>2. Objetivos</b> .....	3
<b>3. Materiales y Métodos</b> .....	3-5
3.1. Muestras humanas .....	3
3.2. Líneas celulares .....	3
3.3. Cultivos celulares .....	3
3.4. RT-qPCR para miRNA .....	3
3.5. Extracción de RNA a partir de células y posterior RT-qPCR .....	4
3.6. Inhibición/sobreexpresión <i>in vitro</i> de miR-518d-5p y silenciamiento de c-Jun .....	4
3.7. Tratamiento con fármacos .....	4
3.8. SDS-PAGE y posterior Western Blot .....	4
3.9. Ensayo de citotoxicidad celular por MTT .....	5
3.10. Análisis de la apoptosis mediante ensayo de Anexina V-FITC .....	5
3.11. Inmunofluorescencia. ....	5
3.12. Análisis estadístico .....	5
<b>4. Resultados</b> .....	5-12
4.1. miR-518d está sobreexpresado en carcinoma hepatocelular .....	6
4.2. La modulación de miR-518d afecta a la viabilidad celular .....	6-7
4.3. La inhibición de miR-518d sensibiliza a la muerte inducida por fármacos .....	7-8

4.4. La sobreexpresión de miR-518d disminuye la muerte inducida por fármacos.....	9-10
4.5. c-Jun, diana de miR-518d y está implicado en la resistencia al sorafenib.....	11-12
<b>5. Discusión .....</b>	<b>12-13</b>
<b>6. Conclusión .....</b>	<b>13</b>
<b>7. Agradecimientos .....</b>	<b>14</b>
<b>8. Bibliografía .....</b>	<b>14-15</b>
<b>Anexo</b>	

## RESUMEN

La glicina-N-metiltransferasa (GNMT) es un regulador esencial del equilibrio de transmetilación hepático, cuya expresión se ve drásticamente reducida en carcinoma hepatocelular (CHC). Se ha observado una correlación negativa entre los niveles de GNMT y el microRNA miR-518d-5p de pacientes con buen y mal pronóstico para CHC. *In vitro*, la modulación de la expresión de miR-518d-5p ha permitido determinar que niveles inferiores del microRNA, favorecen la apoptosis y disminuyen la viabilidad celular de líneas tumorales. De esta manera, se ha situado al miR-518d-5p como diana de estudio en el desarrollo de resistencia al quimioterapéutico sorafenib. Niveles reducidos de miR-518d-5p inducen la respuesta apoptótica de células tumorales tratadas con sorafenib, mediante el aumento de la expresión de moduladores pro-apoptóticos importantes tales como ERK, Mcl-1, PUMA o c-Jun. El silenciamiento de c-Jun, ha permitido observar que dicho aumento de la respuesta apoptótica está mediado por la regulación directa de miR-518d sobre c-Jun. Estos resultados sugieren que la inhibición del miR-518d-5p, presenta potencial terapéutico para solventar la resistencia al sorafenib desarrollada por muchos pacientes con CHC.

## 1. INTRODUCCIÓN

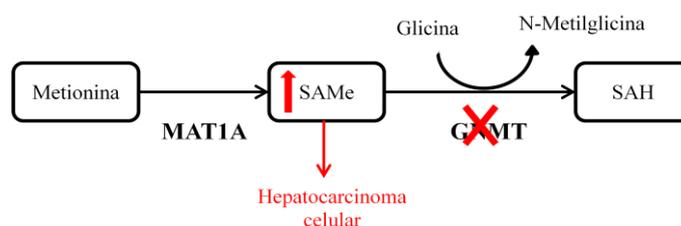
De acuerdo con los datos de la Red Española de Registros de Cáncer, esta enfermedad es ya la segunda causa de muerte en la población general española y la primera en varones. (Galceran *et al.*, 2014.). Concretamente, el carcinoma hepatocelular (CHC) es la sexta causa más común de cáncer a nivel mundial, siendo responsable en 2014 de la muerte de 5039 pacientes según el Centro Nacional de Epidemiología (Instituto de Salud Carlos III, 2014)

Actualmente, el tratamiento del hepatocarcinoma depende principalmente del estadio de la patología. Puede llevarse a cabo una ablación en pacientes con tumores pequeños o una resección hepática cuando la porción restante sea suficiente para mantener la función hepática. La radiación, no suele emplearse debido a la lesión que generalmente ocasiona en el tejido funcional; mientras que la quimioterapia sistémica convencional presenta escasa actividad antitumoral en el hígado, probablemente debido a la alta expresión de proteínas asociadas a multirresistencia a fármacos. Estas técnicas terapéuticas suelen servir como tratamiento principalmente para aquellos pacientes en estados tempranos de la enfermedad. Desgraciadamente, el diagnóstico tardío en la mayoría de los pacientes, provoca que los tratamientos resulten ineficaces. Sin embargo, el cada vez mayor conocimiento de cómo se disemina el cáncer, está permitiendo identificar las etapas moleculares del desarrollo tumoral, las cuales pueden servir como potenciales dianas terapéuticas.

En los últimos años se han investigado diferentes agentes que bloquean vías moleculares concretas, responsables de la progresión tumoral. De estos agentes, el único que ha demostrado eficacia en términos de supervivencia (entre 3 y 6 meses) en pacientes con cáncer de hígado avanzado, ha sido el sorafenib (Llovet *et al.*, 2008). La principal acción del sorafenib es la reducción de la angiogénesis mediante su efecto sobre los receptores del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y del factor de crecimiento derivador de plaquetas (PDGF). Además, es un potente inhibidor multiquinasa, capaz de inhibir la actividad de proteínas como Raf quinasa, o la quinasa BCR/ABL. Se ha observado que el sorafenib induce la muerte celular, vía estimulación de caspasas, activación de BAX y BAK, aumento en los niveles proapoptóticos de PUMA y BIM y descenso en los niveles antiapoptóticos de MCL1 y survivina. (Fernando *et al.*, 2012).

Aunque el tratamiento con sorafenib es prometedor y ha aumentado la supervivencia de los pacientes con CHC, algunos de ellos acaban desarrollando resistencia al tratamiento. Por tanto, el conocimiento exhaustivo de las vías de señalización implicadas en la eficacia antitumoral del sorafenib, resulta crucial para diseñar nuevas alternativas terapéuticas que permitan solventar la resistencia desarrollada por algunos pacientes.

En el contexto del metabolismo de metionina en mamíferos, los primeros pasos consisten en la conversión a S-adenosilmetionina (S-AdoMet) actuando como principal donador de grupos metilo, al transferirlos a diversos sustratos como DNA, RNA, histonas, glicina, fosfatidiletanolamina... La metilación de glicina mediante glicina N-metiltransferasa (GNMT) para formar sarcosina (N-metilglicina) y S-adenosilhomocisteína (SAH), es una de las reacciones con mayor contribución al equilibrio total de transmetilación. Por tanto, GNMT resulta esencial en la eliminación del exceso de S-AdoMet para el mantenimiento constante del ratio hepático S-AdoMet/SAH y así evitar metilaciones aberrantes. En el hígado tienen lugar el 85% de las reacciones de transmetilación y el 50% de las reacciones metabólicas de la metionina. El enzima GNMT se expresa en páncreas, próstata y preferentemente en el hígado adulto y se ha visto que su expresión se ve reducida en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) (Chen *et al.*, 1998), provocando la acumulación de S-AdoMet (**Figura 1**).



**Figura 1. GNMT en el metabolismo hepático de S-AdoMet.** La deficiencia hepática de GNMT favorece la acumulación de S-AdoMet, provocando metilaciones aberrantes que promueven el desarrollo de CHC.

Estudios realizados *in vivo*, muestran el desarrollo del fenotipo de daño hepático en ratones knockout para *GNMT* de forma espontánea, con una progresión desde esteatosis a fibrosis, y hepatocarcinoma (Martínez-Chantar *et al.*, 2007), todo ello, coincidiendo con la hiperactivación de las principales rutas oncogénicas (Ras y JAK/STAT). Correlativamente a estos hallazgos, se ha descrito la inducción de la detención de la proliferación celular, frenando de esta manera la progresión del tumor, ante la sobreexpresión de *GNMT* en líneas celulares de hepatoma (Yen *et al.*, 2012). Todas estas observaciones han llevado a considerar a *GNMT* como un supresor tumoral hepático ya que su presencia resulta determinante en el desarrollo y mantenimiento de un hígado sano y diferenciado.

Aunque la hipermetilación del promotor de *GNMT* se ha identificado como posible causa de su reducida expresión en pacientes con cáncer hepático, éste no parece ser el único mecanismo eficiente que regule dicho gen (Huidobro *et al.*, 2013). En los últimos años, los microRNAs han sido relacionados con la regulación de importantes funciones biológicas como la diferenciación, el metabolismo, la muerte celular y la tumorigénesis. Estos pequeños RNAs no codificantes actúan como reguladores de la expresión génica ya que se unen al RNA mensajero de forma específica e impiden su traducción. En el hígado, se han identificado microRNAs implicados en el desarrollo de hígado graso no alcohólico, cirrosis y cáncer hepático (Michelotti *et al.*, 2013; Toffanin *et al.*, 2011).

Por último, también se ha descrito que la desregulación de ciertos microRNAs confiere quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer (Jin *et al.*, 2017). De esta manera, la corrección de sus niveles puede sensibilizar dichas células a determinadas terapias, posicionando a los microRNAs como excelentes dianas para nuevas aproximaciones terapéuticas.

## **2. OBJETIVOS**

Tras la identificación *in silico* del miR-518d-5p como regulador de GNMT, los objetivos generales del proyecto se centraron en examinar la posible correlación entre los niveles de miR-518d y la expresión de GNMT en el tejido hepático de pacientes con CHC. Por otro lado, se trató de explorar la posible influencia de los niveles de miR-518d/GNMT en el desarrollo de resistencia a agentes quimioterapéuticos (sorafenib) empleados en el tratamiento del CHC, en modelos *in vitro* (células de hepatomas con niveles variables de miR-518d-5p).

## **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **3.1. MUESTRAS HUMANAS:**

RNA extraído de tejido hepático tumoral y no tumoral de una cohorte de 19 pacientes con CHC proporcionado por la Profesora Erica Villa (Departamento de Gastroenterología del Hospital Universitario Azienda y la Universidad de Módena y Reggio Emilia, Módena, Italia).

### **3.2. LÍNEAS CELULARES:**

La línea celular de hepatoma humano BCLC3, fue facilitada por Dr. Jordi Bruix y Dr. Loreto Boix (Grupo BCLC del Hospital Clínico, Barcelona, España). La línea tumoral Huh7 fue proporcionada por Nakabayshi, H. y Sato, J., originalmente tomada del tumor hepático de un varón japonés de 57 años.

### **3.3. CULTIVOS CELULARES**

Las células Huh7/BCLC3 fueron cultivadas en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%, a 37°C y en medio DMEM (Life Technologies) que contiene 10% de suero bovino fetal (Life Technologies), penicilina (100 unidades/mL), estreptomina (100 µg/mL), l-glutamina (2 mmol/L), y piruvato sódico (1 mmol/L; Invitrogen).

### **3.4. RT-PCR y qPCR PARA miRNA.**

Una vez se dispone del RNA extraído, se midió la concentración de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop, para igualar la concentración de RNA en todas ellas y poder realizar la RT-qPCR. Se desarrolló la RT-PCR específica para miR-518d-5p siguiendo el procedimiento TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit. La mezcla de reacción contenía 4,162µl de H<sub>2</sub>O sigma, 1,5µl de buffer RT, 0,15µl de dNTP 100mM, 0,188µl de inhibidor de RNAasa, 1µl de transcriptasa inversa, 3µl de “primers” específicos para miR-518d-5p (en este caso no se utilizan “random primers”) y 50ng RNA diluidos en 5µl. Se llevó a cabo la reacción RT-PCR en un termociclador Bio-Rad iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) y las muestras se analizaron por duplicado. A continuación, tomando 4µl de la muestra obtenida por RT-PCR, se desarrolló la qPCR en el termociclador Bio-Rad iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) empleando 7µl de H<sub>2</sub>O sigma, 8µl de Taqman Universal PCR Master Mix/No AmpErase UNG kit y 1µl de “primers” específicos para el miR-518d-5p. Los datos fueron normalizados con la expresión de snRNA U6.

### **3.5. EXTRACCIÓN DE RNA A PARTIR DE CÉLULAS Y POSTERIOR RT-qPCR**

Tras eliminar el medio del cultivo celular y lavar con PBS, se extrajo el RNA lisando las células con Trizol (Invitrogen, Carlsbad, CA), y empleando cloroformo e isopropanol para la precipitación del RNA a partir de la fase acuosa obtenida previamente. Tras la incubación a  $-20^{\circ}\text{C}$  se añadió etanol, y se centrifugó la muestra para eliminar el sobrenadante, resuspendiendo finalmente el RNA en  $\text{H}_2\text{O}$  sigma. Se midió la concentración de RNA de cada muestra en un espectrofotómetro NanoDrop, para igualar la concentración (a  $2\mu\text{g}$ ). Se tomaron  $7,5\mu\text{l}$  de muestra,  $1\mu\text{l}$  de buffer 10x y  $1,5\mu\text{l}$  de DNAasa para incubarlos durante 15 minutos a temperatura ambiente. Se detuvo la reacción mediante la adición de EDTA y se incubó a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos en el termociclador BioRad iClycer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). A continuación, se añadieron  $39\mu\text{l}$  de la mezcla para RT-PCR (Buffer, DTT, “random primers”, dNTPs, RNAasa out, retrotranscriptasa M-MLV y  $\text{H}_2\text{O}$  Sigma) y se llevó a cabo la reacción durante 1 hora y 30 minutos en el termociclador BioRad iClycer (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). Se tomaron  $1,5\mu\text{l}$  de una dilución 1:20 del cDNA obtenido por RT-PCR (placa de 384 pocillos) y se añadieron  $0,5\mu\text{l}$  de primers específicos de cada gen,  $3\mu\text{l}$  SYBR Green/Select y  $1,5\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Sigma. Se realizó la reacción qPCR en el termociclador BioRad iCycler (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA), empleando GAPDH como control para normalizar los datos.

### **3.6. INHIBICIÓN/SOBREEXPRESIÓN *IN VITRO* DE miR-518d-5p Y SILENCIAMIENTO DE cJUN**

Las células BCLC3 y Huh7 fueron transfectadas respectivamente con miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor anti-miR-518d-5p (Sigma-Aldrich, USA) y miRIDIAN microRNA Hairpin Mimic miR-518d-5p (Sigma-Aldrich, USA), a una concentración final en el medio de cultivo de  $25\text{nM}$ , empleando el vehículo de transfección DharmaFECT y siguiendo el procedimiento del fabricante. Tras 24 horas, cierta población de las células BCLC3 anteriormente transfectadas, se transfectaron con siRNA específico frente a c-Jun (Sigma-Aldrich, USA), con una concentración final de  $375\text{nM}$  en el medio de cultivo. Se siguió el mismo procedimiento anterior, pero empleando lipofectamina como vehículo de transfección. Los controles se transfectaron con siRNA control negativo (Sigma-Aldrich, USA).

### **3.7. TRATAMIENTO CON FÁRMACOS:**

Las células BCLC3 y Huh7 fueron sometidas durante 24 horas al tratamiento con sorafenib, en una concentración final de  $10\mu\text{M}$  para observar los efectos del fármaco quimioterapéutico ante la variación del miR-518d-5p. Como control, se trataron las células con DMSO.

### **3.8. SDS-PAGE Y POSTERIOR WESTERN BLOT**

Se añadió al cultivo celular Buffer RIPA, el cual permite la lisis celular y la solubilización de proteínas. Las muestras se centrifugaron para eliminar las membranas y restos celulares. Tras medir la concentración de proteína mediante el método Bradford, se realizó una separación electroforética SDS-PAGE y posterior electrotransferencia a una membrana de nitrocelulosa. Se empleó la actina como control interno. Una vez realizado el bloqueo con leche al 5% en TBS-T, se incubó con el anticuerpo primario durante toda la noche a  $4^{\circ}\text{C}$  (dilución 1:1000 en TBST al 5% leche). Finalmente, se emplearon anticuerpos secundarios en una dilución 1:5000 en TBS-T al 5% leche, y se incubaron las muestras durante 2 horas a temperatura ambiente. Los anticuerpos secundarios (antirabbit o antimouse, en función del anticuerpo primario en cuestión) estaban conjugados con peroxidasa de rábano (Invitrogen, Carlsbad, CA) y el agente quimioluminiscente luminal (ECL; Perkin Elmer). Por último, las membranas fueron expuestas a rayos X y se analizaron los autoradiogramas.

### **3.9. ENSAYO DE CITOTOXICIDAD CELULAR POR MTT**

Se trata de un ensayo colorimétrico basado en la reducción del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT), para dar formazán (compuesto hidrofóbico de color morado azulado), llevado a cabo por el enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa de células metabólicamente activas. Las células se incubaron con MTT (0,5 mg/ml) a 37°C durante una hora y tras disolverse en una disolución DMSO/isopropanol 1:1, se midió la actividad en una placa de 96 pocillos en el espectrofotómetro (SpectraMax M2) a una longitud de onda de 570 nm.

### **3.10. ANÁLISIS DE LA APOPTOSIS MEDIANTE ENSAYO DE ANEXINA V-FITC**

En células viables la fosfatidilserina se mantiene en la monocapa interior de la membrana celular, mientras que cuando se empieza a desencadenar el proceso apoptótico, migra a la capa externa. Esta localización puede ser detectada fácilmente mediante Anexina V (unida a un fluoróforo), ya que se une específicamente a la fosfatidilserina en una reacción dependiente de calcio. Una vez se tripsinizaron y se centrifugaron las células, se resuspendieron en 100µl de buffer de anexina. Se analizó la apoptosis celular mediante la combinación de 2µl de anexina V con un fluorocromo denominado fluoresceína (FITC) y 2µl del marcador catiónico yoduro de propidio (IP), que tiñe el DNA. Tras 15 minutos de incubación en oscuridad, se añadieron 400µl de buffer anexina V para parar la reacción. Se llevó a cabo el análisis de la población celular en el citómetro de flujo. La anexina V-FITC se detectó mediante la emisión a 520 nm y el IP mediante la emisión de a 580 nm de la ficoeritrina (PE) unida. Mediante este procedimiento se pueden registrar células no apoptóticas (anexina V-FITC negativo / IP negativo), células en apoptosis temprana (anexina V-FITC positivo / IP negativo) y células necróticas (anexina V-FITC positivo / IP positivo).

### **3.11. INMUNOFLUORESCENCIA**

Las células se fijaron durante 10 minutos con formaldehído para la visualización de c-Jun, y tras aplicar la mezcla de bloqueo (PBS, 0.1% BSA, 10% suero de cabra y tritón), se incubaron durante toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario 1:100 en la siguiente mezcla de disolución (96% PBS 1x y 4% BSA al 30%). Finalmente, se incubaron durante una hora con anticuerpo secundario 1:200 en la anterior mezcla de disolución. Para su visualización, el anticuerpo secundario antirrabit se marcó con el fluoróforo Cy3 (rojo) o FITC (verde). Se empleó 4'6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) a una concentración 1:1000 para la visualización de los núcleos celulares. Las imágenes se analizaron mediante microscopía óptica de fluorescencia.

### **3.12. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

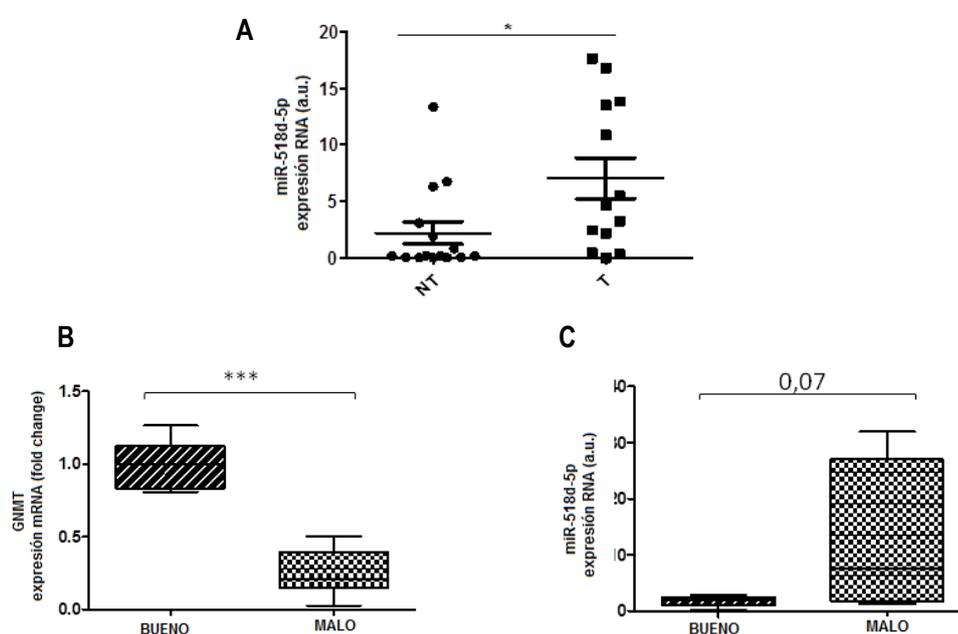
El análisis estadístico se llevó a cabo mediante la prueba T de Student tipo 2 para muestras no pareadas y de dos colas.

## **4. RESULTADOS**

La regulación de miR-518d-5p sobre la expresión de GNMT, se confirmó previamente mediante ensayos de actividad luciferasa empleando plásmidos con la región 3'UTR de *GNMT* (**Anexo 1**).

#### 4.1. miR-518d-5p ESTÁ SOBREEXPRESADO EN CARCINOMA HEPATOCELULAR

Para comenzar, se analizaron los niveles de miR-518d-5p presentes en tejido tumoral y no tumoral de una cohorte de 19 pacientes con CHC. Como se muestra en la **Figura 2A**, los niveles de miR-518d-5p en la zona no tumoral hepática eran significativamente inferiores a los observados en la región tumoral ( $p < 0,05$ ). Asimismo, se realizó un estudio retrospectivo de los niveles de mRNA de GNMT y del miR-518d-5p presentes en esas muestras hepáticas, clasificando a los pacientes con buen y mal pronóstico de CHC (mayor o menor supervivencia de 3 meses respectivamente) (Villa et al., 2015). La expresión de *GNMT* se ve significativamente disminuida en pacientes con mal pronóstico en comparación con aquellos cuya supervivencia supera los 3 meses (**Figura 2B**). Por el contrario, los niveles de miR-518d-5p en dichos individuos con peor pronóstico, se veían inducidos y con una distribución variable entre los diferentes pacientes (**Figura 2C**).



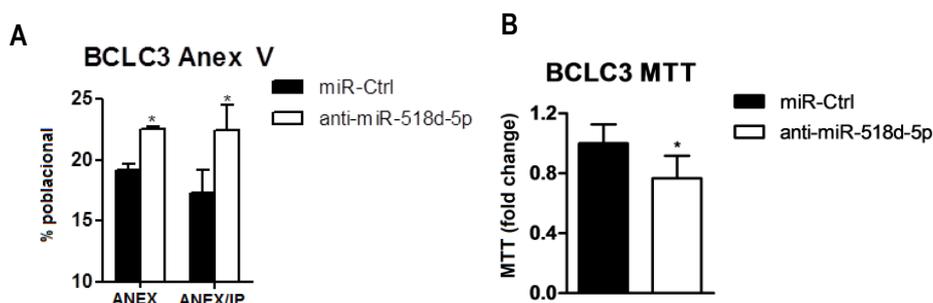
**Figura 2. Expresión de miR-518d/GNMT en 19 pacientes con CHC.** (A) Expresión disminuida de miR-518d en tejido tumoral hepático. Los niveles de expresión fueron analizados en 19 muestras de CHC y tejido adyacente no tumoral hepático mediante RT-qPCR. (B) (C) Diagrama de cajas para observar la distribución y asimetría de los niveles de mRNA de GNMT y de miR-518d, presentes en pacientes con un buen y mal pronóstico para CHC. \* $P < 0,05$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.2. LA MODULACIÓN DE miR-518d-5p EN LÍNEAS CELULARES DE CHC AFECTA A LA VIABILIDAD CELULAR

Teniendo en cuenta los anteriores resultados, se llevó a cabo un estudio *in vitro* para estudiar la funcionalidad del miR-518d-5p. Las líneas celulares empleadas fueron BCLC3 y Huh7, debido a la elevada concentración de miR-518d-5p a nivel basal en las BCLC3, frente a los niveles disminuidos del microRNA de estudio en las Huh7.

De esta manera, se quiso comprobar el efecto de la modulación de los niveles de miR-518d-5p en cada una de las líneas celulares. Por un lado, se analizó el efecto obtenido al disminuir los niveles del miR-518d-5p, mediante la transfección de células BCLC3 con anti-miR-518d-5p. Con motivo de evaluar si el microRNA estaba implicado en la muerte celular por apoptosis, las células fueron tratadas con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (IP) y posteriormente analizadas mediante citometría de flujo.

Tal y como se puede observar en la **Figura 3A**, el porcentaje de células marcadas tanto con Anexina V-FITC como con IP, indicativo de células en apoptosis tardía, se vio significativamente incrementado en presencia de la sonda anti-miR-518d-5p; de manera que niveles inferiores del microRNA, parecían dotar a las células de mayor sensibilidad a la apoptosis. Para analizar la viabilidad de las células se llevó a cabo un ensayo MTT, y los resultados revelaron que las células BCLC3 con menores niveles de miR-518d-5p (anti-miR-518d-5p) presentaban niveles inferiores de formazán (**Figura 3B**). Por tanto, niveles inferiores de miR-518d-5p se asociaban a células metabólicamente menos activas, es decir, con menor viabilidad.



**Figura 3. La modulación de la expresión de miR-518d-5p afecta al ratio apoptótico y a la viabilidad celular.** (A), Se midió el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina positivo) y tardía (Anexina positivo/IP positivo) de líneas tumorales BCLC3, mediante el método Anexina V y posterior citometría de flujo. La anexina V-FITC se detectó mediante la emisión a 520nm y el IP-PE a 580nm. (B), Se analizó la viabilidad de células tumorales BCLC3 con diferentes niveles de miR-518d-5p, midiendo el MTT reducido a 570nm. Los resultados fueron normalizados respecto al control. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

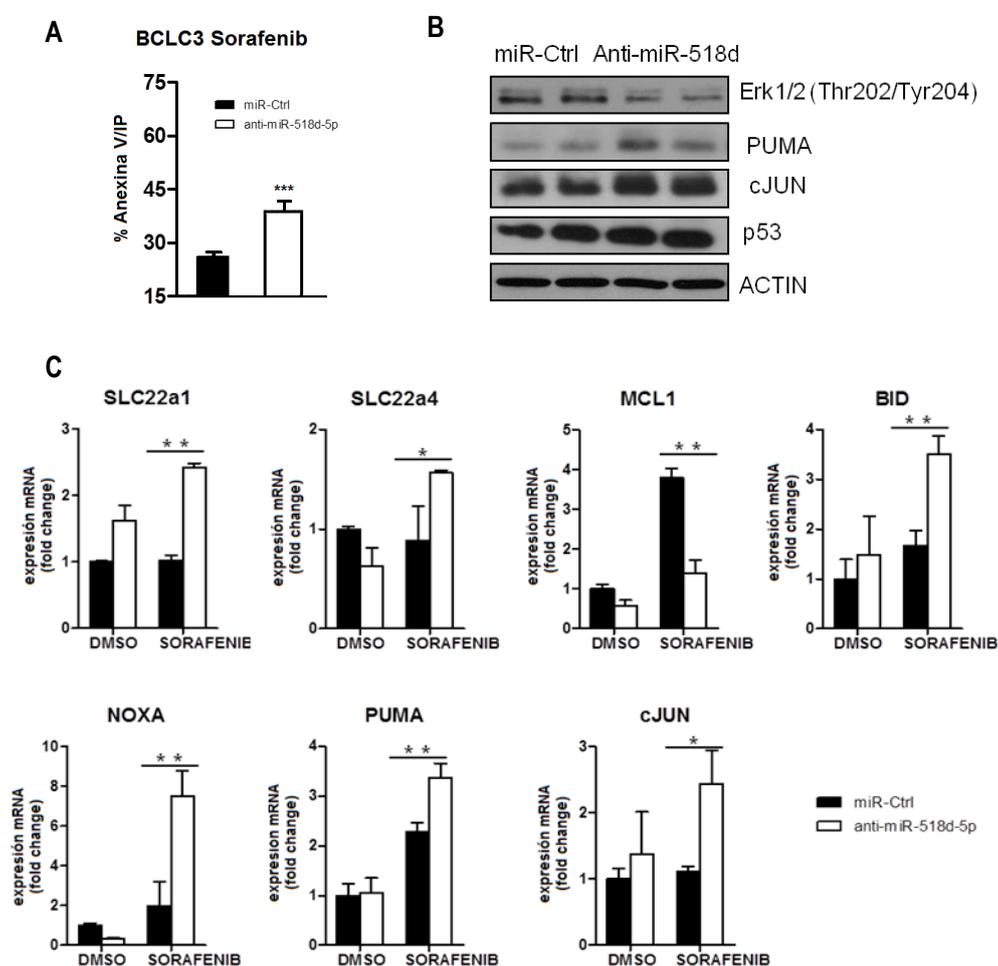
Paralelamente, se realizó el mismo procedimiento de transfección en las células Huh7 pero en este caso, empleando como sonda mimic-miR-518d-5p, para observar el efecto obtenido al sobreexpresar el microRNA. Las células Huh7 con sobreexpresión del miR-518d-5p, presentaban de forma significativa menor ratio de apoptosis temprana y necrosis en el ensayo con Anexina V (ver **Anexo 2**). En cuanto a los resultados de viabilidad, las células con mayores niveles de miR-518d-5p, llevaban a cabo un metabolismo incrementado de MTT (MTT reducido significativamente superior) en comparación con las Huh7 basales, lo que se asociaba a una mayor viabilidad celular (ver **Anexo 2**).

#### 4.3. LA INHIBICIÓN DE miR-518d-5p SENSIBILIZA A LAS CÉLULAS TUMORALES A LA MUERTE INDUCIDA POR FÁRMACOS:

Se quiso comprobar el efecto que provocaba la modulación de los niveles de miR-518d-5p en células tumorales, cuando estas se trataban con sorafenib, uno de los quimioterapéuticos más utilizados al que desgraciadamente algunos pacientes desarrollan resistencia.

Para ello, mediante el ensayo de Anexina V, se comparó la muerte por apoptosis cuando las células BCLC3, con diferentes niveles de miR-518d-5p, eran tratadas con sorafenib. Los resultados recogidos en la **Figura 4A**, muestran que al inducir la muerte celular mediante el tratamiento con sorafenib, aquellas células transfectadas con anti-miR-518d-5p, y que por consiguiente presentaban niveles inferiores del microRNA, resultaban más sensibles al tratamiento (se detectaba mayor apoptosis), en comparación con las BCLC3 cuyos niveles basales de miR-518d-5p eran elevados.

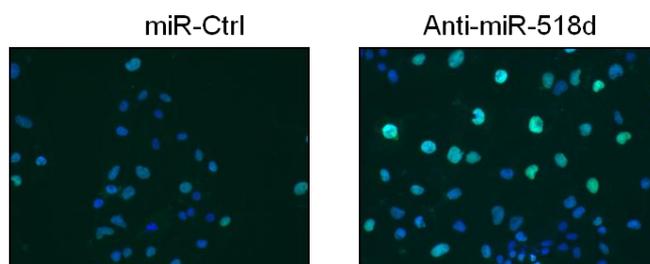
Tal y como describió Liu *et al.*, (2006), el sorafenib es un inhibidor multiquinasa capaz de inhibir Raf quinasa; inhibiendo por tanto la ruta de señalización RAF/MEK/ERK implicada en la proliferación celular. Una vez lisadas las células, los niveles de proteína ERK desfosforilada se analizaron mediante Western Blot y se observó (**Figura 4B**) que las células transfectadas con anti-miR-518d-5p, mostraban menores niveles de fosforilación de ERK en comparación con las células cuyos niveles de miR-518d-5p eran superiores. Por tanto, las células con anti-miR-518d-5p eran más sensibles a la inhibición de Raf quinasa llevada a cabo por el sorafenib, inhibiendo así la proliferación celular. Por otro lado, mediante RT-qPCR, se analizaron los niveles de mRNA de determinados genes implicados en la captación de fármacos. Ante el tratamiento con sorafenib, se detectaron niveles superiores de expresión de SLC22a1 y SLC22a4 en las células que presentaban niveles inferiores de miR-518d-5p (anti-miR-518d-5p) (**Figura 4C**) indicando por tanto, que la regulación negativa del microRNA estaría otorgando a las BCLC3 sensibilidad al tratamiento con Sorafenib.



**Figura 4. Sensibilización de las BCLC3 a sorafenib ante la inhibición de miR-518d-5p.** (A) Población de células BCLC3 necróticas (Anexina V positivo/IP positivo), mediante el método Anexina V y posterior citometría de flujo. La anexina V-FITC se detectó mediante la emisión a 520 nm y el IP-PE a 580 nm. (B) Western Blot de proteína ERK desfosforilada, PUMA, cJUN y p53 en células BCLC3 basales y con anti-miR-518d, tratadas con Sorafenib. Actina como control interno. (C) Expresión de mRNA de diferentes genes implicados en la captación de drogas, en rutas apoptóticas y antiapoptóticas, medidos mediante RT-qPCR en células BCLC3 tratadas con DMSO o Sorafenib. Los datos fueron normalizados respecto al miR control en DMSO. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

A pesar de la importancia de la ruta Raf/MEK/ERK en los mecanismos antitumorales del sorafenib, también se han descrito mediadores independientes de esta ruta, como Mcl-1 (myeloid cell leukemia-1), que presenta un papel anti-apoptótico (Rahmani *et al.* 2005). Se detectaron niveles más bajos de Mcl-1 a nivel de mRNA, en células con anti-miR-518d-5p, en comparación con las BCLC3 a nivel basal (**Figura 4C**). Además, se analizaron los niveles de mRNA de BID y NOXA, que codifican proteínas pro-apoptóticas perteneciente a la familia de proteínas Bcl-2. En la **Figura 4C** se puede observar como ambos casos, los niveles de mRNA se veían incrementados en células transfectadas con anti-miR-518d-5p.

Ante la exposición a sorafenib, PUMA (modulador de apoptosis regulado por p53) actúa como un iniciador clave de la apoptosis en células tumorales (Dudgeon *et al.* 2012). Por tanto, se compararon los niveles de PUMA, a nivel de mRNA y a nivel proteico, y los resultados mostraron que PUMA se ve inducido en las células BCLC3 transfectadas con anti-miR-518d-5p (**Figura 4B y 4C**). Yu y Zhang (2008) demostraron que PUMA puede inducir la apoptosis tanto por una vía dependiente de p53, como por vías alternativas independientes de p53. En este contexto, se ha descrito que el factor de transcripción AP-1 (combinación c-Fos y c-Jun) media la expresión de PUMA durante la lipoapoptosis (Cazanave *et al.*, 2010). Se analizaron los niveles proteicos de p53, y de mRNA y proteína de c-Jun; y los resultados mostraron que ambos aumentaban significativamente en células BCLC3 cuyos niveles de miR-518d-5p eran inferiores (**Figura 4B y 4C**). Finalmente, mediante inmunofluorescencia, se observó mayor presencia de c-Jun en células BCLC3 tratadas con sorafenib, cuando éstas eran transfectadas con anti-miR-518d-5p (**Figura 5**).

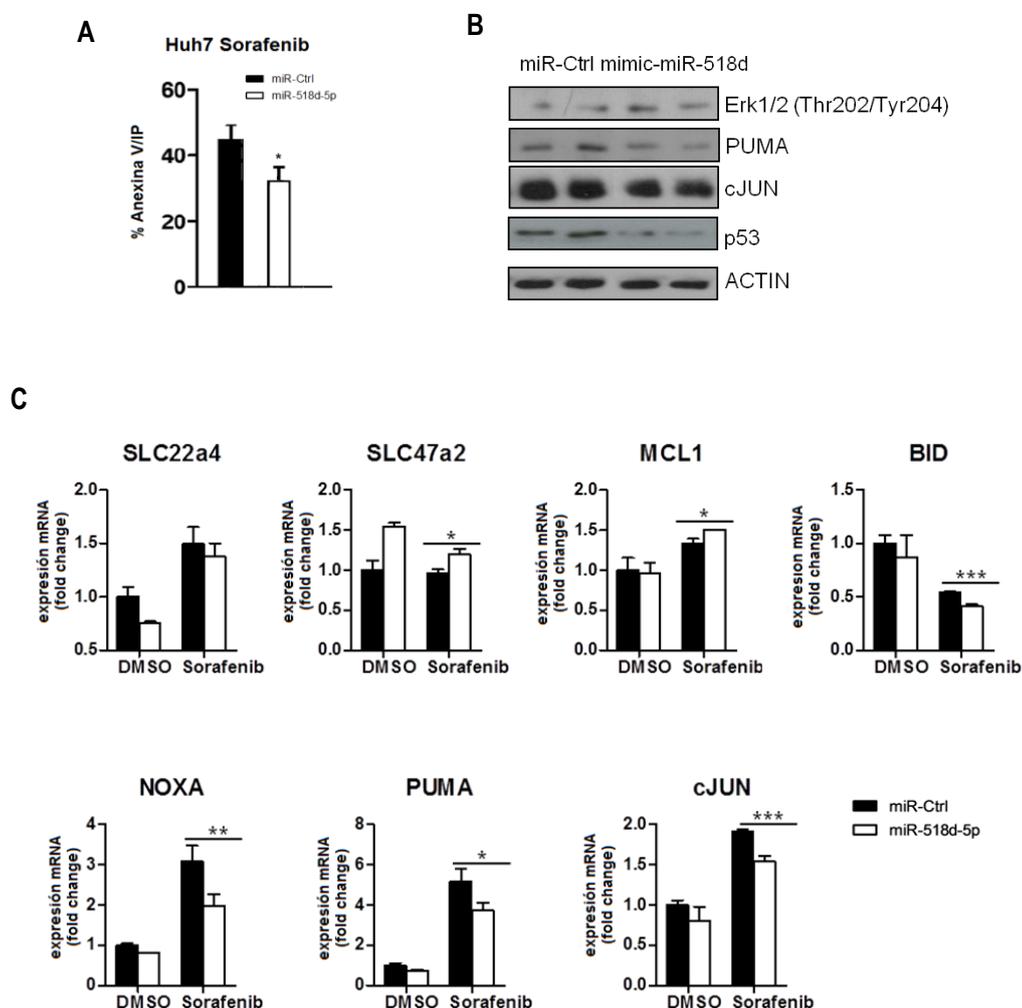


**Figura 5. Inmunofluorescencia de c-Jun en BCLC3 tratadas con Sorafenib.** Imágenes representativas de células BCLC3 miR-518d control y transfectadas con anti-miR-518d-5p, obtenidas mediante microscopía óptica de fluorescencia. El verde indica la presencia de c-Jun, debido al marcaje con el fluoróforo FITC, mientras que en azul se visualizan los núcleos, marcados con DAPI.

#### **4.4. LA SOBREENPRESIÓN DE miR-518-5p EN CÉLULAS TUMORALES DISMINUYE LA MUERTE CELULAR EN RESPUESTA A FÁRMACOS**

De manera paralela, se quiso comprobar el efecto que provocaba la sobreexpresión de miR-518d-5p, en las células tumorales Huh7, cuyos niveles basales son muy bajos, cuando estas se trataban con sorafenib. Para ello, se llevaron a cabo los mismos ensayos detallados anteriormente para la línea tumoral BCLC3, pero en este caso en las Huh7. Los resultados del ensayo con Anexina V, observados en la **Figura 6A**, revelaron que el porcentaje de células necróticas inducidas por sorafenib, era menor en células con sobreexpresión del miR-518d-5p, en comparación con los niveles basales. Por otro lado, las células transfectadas con mimic-miR-518d-5p, presentaban niveles de expresión de SLC47a2 (gen implicado en la expulsión de fármacos) significativamente superiores en comparación con las Huh7 control, cuando se sometían al tratamiento con sorafenib.

Se observó que ante la sobreexpresión de miR-518d-5p, la expresión de genes implicados en los mecanismos antitumorales del sorafenib, como Mcl-1 (**Figura 6C**), aumentaba de forma significativa, así como el nivel de proteína ERK desfosforilada, implicada en la ruta Raf/MEK/ERK (**Figura 6B**). En la **Figura 6C** también se puede observar como con sorafenib, la expresión a nivel de mRNA de proteínas pro-apoptóticas, como BID y NOXA, se veía significativamente más inducida en células cuyos niveles de miR-518d-5p eran elevados. Por otro lado, cuando las células Huh7 se trataban con sorafenib, PUMA y c-Jun se veían disminuidos de forma significativa tanto a nivel proteico como de mRNA, en aquellas células con miR-518d-5p sobreexpresado, en comparación con miR-518d-5p control (**Figura 6B y C**). Este descenso de la expresión en presencia de concentraciones elevadas del microRNA de estudio, también se observaba para p53 (**Figura 6B**). Finalmente, se observó mediante inmunofluorescencia (**Anexo 3**), como al tratar las células Huh7 con sorafenib, la presencia de c-Jun disminuía significativamente en aquellas células que habían sido transfectadas con mimic-miR518d.

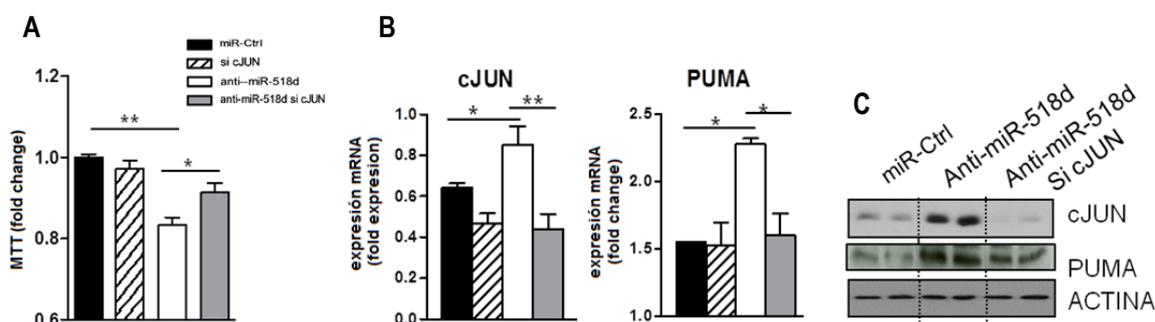


**Figura 6. Resistencia al sorafenib de las Huh7 ante la sobreexpresión de miR-518d.** (A) Población de células Huh7 necróticas (Anexina V positivo/IP positivo), mediante el método Anexina V y posterior citometría de flujo. La anexina V-FITC se detectó mediante la emisión a 520 nm y el IP-PE a 580 nm. (B) Western Blot de proteína ERK desfosforilada, PUMA, cJUN y p53 en Huh7 basales y con mimic-miR-518d, tratadas con Sorafenib. Actina como control interno. (C) Expresión de mRNA de genes implicados en la captación de drogas, en rutas apoptóticas y antiapoptóticas, medidos mediante RT-qPCR en células Huh7 tratadas con DMSO o Sorafenib. Los datos fueron normalizados respecto al miR control en DMSO. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ ; \*\*\* $P < 0,001$ .

#### 4.5. c-Jun ACTÚA COMO DIANA DE miR-518d-5p Y ESTÁ IMPLICADO EN LA RESISTENCIA AL SORAFENIB

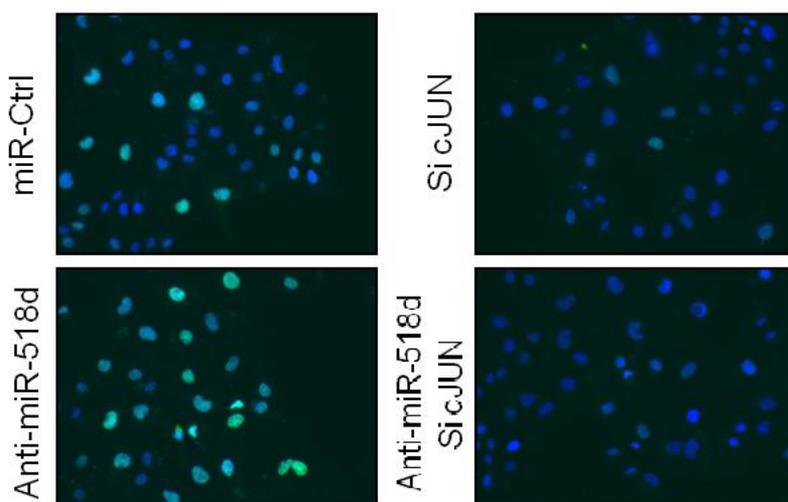
Debido a la intensa variación de c-Jun a nivel proteico y de mRNA cuando se modulaba la expresión de miR-518d-5p, se decidió silenciar el gen c-Jun en las BCLC3 para comprobar su papel en la apoptosis inducida por sorafenib. Para ello, las BCLC3 se transfectaron, además de con anti-miR-518d-5p, con siRNAs específicos de c-Jun. Tras el proceso de transfección se obtuvieron cuatro tipos celulares distintos: BCLC3 control, BCLC3 anti-miR-518d-5p, BCLC3 si-cJun y BCLC3 anti-miR-518d-5p si-cJun.

Mediante el ensayo de viabilidad celular MTT, se observó que con elevados niveles del microRNA (nivel basal), el silenciamiento de c-Jun no afectaba significativamente a la viabilidad celular. Sin embargo, la actividad metabólica disminuía de forma significativa cuando únicamente se bloqueaba miR-518d-5p, en comparación con el control. Además, la viabilidad se recuperaba significativamente cuando a pesar de estar bloqueando el miR-518d-5p, se silenciaba c-Jun. (**Figura 8A**). Se confirmó la regulación directa del miR-518d-5p sobre c-Jun mediante el análisis de los niveles de mRNA (**Figura 8B**) y proteína (**Figura 8C**) de c-Jun. Ante el tratamiento con sorafenib, se observó que c-Jun aumentaba significativamente cuando se bloqueaba la acción del miR-518d-5p (BCLC3 anti-miR-518d-5p), en comparación con el control; mientras que dichos niveles disminuían significativamente al silenciar también c-Jun, simulando el efecto ejercido por el microRNA en condiciones basales.



**Figura 8.** siRNA específico frente a c-Jun, bloquea la respuesta apoptótica frente al sorafenib en células BCLC3 anti-miR.518d-5p. (A) Se analizó la viabilidad de los cuatro tipos celulares BCLC3 obtenidos tras la transfección con anti-miR-518d-5p y/o si-cJun, midiendo el MTT reducido a 570nm. Los resultados están normalizados respecto al control. (B) Expresión a nivel de mRNA de cJUN y PUMA, medidos mediante RT-qPCR en los cuatro tipos celulares de BCLC3 tratadas con sorafenib. (C) Comparación del nivel proteico de cJUN y PUMA en los diferentes tipos celulares mediante Western Blot. Se empleó actina como control interno. \* $P < 0,05$ ; \*\* $P < 0,01$ .

Tal y como se presenta en la **Figura 9**, empleando microscopía óptica de fluorescencia, se observó un considerable aumento de la presencia de c-Jun, cuando se inhibía la acción del miR-518d-5p (anti-miR). Sin embargo, dicho aumento se revertía al emplear siRNA específico frente c-Jun, bloqueándolo. Finalmente, se analizaron los niveles de expresión a nivel de mRNA y proteína de PUMA en las células tratadas con sorafenib. En la **Figura 8B** y **8C**, se puede observar cómo los niveles de PUMA se veían incrementados de forma significativa ante el bloqueo del miR-518d-5p en comparación con el control. Sin embargo, se recuperaba la expresión basal cuando c-Jun se silenciaba (imitando el bloqueo llevado a cabo por miR-518d-5p), es decir, la concentración de PUMA estaba directamente relacionada con la de c-Jun.



**Figura 9.** Imágenes representativas de los cuatro tipos celulares tratadas con sorafenib, obtenidas mediante microscopia de fluorescencia. El color verde indica la presencia de c-Jun, debido al marcaje con el fluoróforo FITC, mientras que en azul se visualizan los núcleos, marcados con DAPI.

## 5. DISCUSIÓN

GNMT es un enzima muy abundante en el hígado de mamíferos, cuya función principal está relacionada con la regulación epigenética, mediante el mantenimiento del ratio SAME/SAH. Los niveles de expresión de *GNMT* se ven drásticamente disminuidos en pacientes con carcinoma hepatocelular (Chen *et al.*, 1998) y la importancia de su déficit en el desarrollo de enfermedades hepáticas se observa en los ratones *Gnmt*-KO (Martinez-Chantar *et al.*, 2007). Por tanto, GNMT se ha considerado como un supresor de tumores en el desarrollo del cáncer hepático.

Se ha observado que la hipermetilación del promotor de *GNMT* es una de las causas de la reducción de la expresión de GNMT en algunos pacientes con CHC, pero parece que este no es el único mecanismo responsable de su regulación (Huidobro *et al.*, 2013). Los microRNAs en el hígado se han identificado con el desarrollo de hígado graso no alcohólico, cirrosis y cáncer hepático (Michelotti *et al.*, 2013; Toffanin *et al.*, 2011) y su desregulación parece conferir cierta quimiorresistencia en diferentes tipos de cáncer (Jin *et al.*, 2017). Estudios previos en el laboratorio, permitieron identificar *in silico* el miR-518d-5p como posible regulador de GNMT y se observó una correlación negativa en pacientes con CHC entre los niveles de dicho microRNA y la disminución de la expresión de GNMT.

En este proyecto, se han observado niveles de miR-518d-5p más inducidos en tejido hepático tumoral, en comparación con la región no tumoral hepática de pacientes con CHC. De forma adicional, se ha relacionado un peor pronóstico en el desarrollo de la enfermedad (supervivencia menor de 3 meses) con unos niveles incrementados del miR-518d-5p y disminuidos de GNMT. Estos resultados, han permitido validar que los niveles del GNMT/miR-518d-5p están negativamente relacionados y se ven regulados de forma diferencial en pacientes con carcinoma hepatocelular.

En base a esta evidencia, se estudió la funcionalidad del miR-518d-5p en modelos *in vitro*. La modulación de la expresión del miR-518d-5p en células tumorales BCLC3 y Huh7, permitió observar que niveles superiores de miR-518d-5p otorgaban a las células una mayor viabilidad y una reducción de muerte celular, es decir, el miR-518d-5p generaba que las células fueran más resistentes a la apoptosis. Dicha variación en la sensibilidad de las células a la apoptosis, situó al miR-518d-5p como posible diana responsable de la quimiorresistencia desarrollada a algunos fármacos.

El sorafenib fue el primer fármaco cuya eficacia clínica en el tratamiento de CHC fue demostrada (Llovet *et al.*, 2008). Sin embargo, muchos pacientes desarrollan resistencia a esta terapia, haciendo que sea necesario comprender los mecanismos implicados en sus efectos y las razones responsables de la quimiorresistencia generada. Por ello, se decidió comprobar el efecto que provocaba la variación de los niveles de miR-518d-5p en las células tumorales, cuando estas se trataban con sorafenib. En las líneas tumorales BCLC3 y Huh7 tratadas con sorafenib, se vio que niveles disminuidos de miR-518d-5p, se asociaban con un mayor ratio apoptótico y una viabilidad celular disminuida, es decir, parecía dotar a las células de mayor sensibilidad al sorafenib. Estudios previos indicaban la acción inhibitoria de este fármaco sobre la ruta de señalización RAF/MEK/ERK implicada en la proliferación celular (Liu *et al.*, 2006). En este caso, se observó que al disminuir los niveles miR-518d-5p tras su inhibición, las células BCLC3 eran más sensibles a la inhibición de Raf quinasa, bloqueando así la proliferación celular, además de aumentar la expresión de genes implicados en la captación de fármacos (SLC22a4) y disminuir otros implicados en su expulsión (SLC47a2). Por tanto, estos resultados apoyan la hipótesis de que la disminución de la expresión de miR-518d-5p, favorece la eficacia antitumoral del sorafenib sobre las células.

Se analizó la expresión de genes anti-apoptóticos Mcl-1 y pro-apoptóticos BID y NOXA, debido a su implicación en los mecanismos anti-tumorales del sorafenib (Rahmani *et al.*, 2005). Ante la exposición con sorafenib, la disminución de la presencia del miR-518d-5p, se asociaba con niveles inferiores de Mcl-1 y con una mayor expresión de los genes pro-apoptóticos BID y NOXA, indicando una mayor sensibilidad a la muerte inducida por sorafenib. Además, en respuesta al sorafenib, PUMA, iniciador clave de la apoptosis en células tumorales (Dudgeon *et al.*, 2012), se veía inducido al disminuir miR-518d-5p, al igual que p53 y c-Jun. Aunque la expresión de PUMA está regulada directamente por p53, estudios previos habían detallado que su expresión también podía estar controlada por c-Jun (Cazanave *et al.*, 2010). De esta manera, el drástico aumento de c-Jun al bloquear miR-518d-5p, permitió plantear la hipótesis de una importante implicación de c-Jun en la apoptosis (inducida por sorafenib) mediada por el microRNA.

Con el objetivo de comprobar el papel que desempeñaba c-Jun en la resistencia al sorafenib mediada por el miR-518d-5p, se observó el efecto obtenido al silenciar el gen. La inhibición del miR-518d-5p, aumentaba significativamente la expresión de c-Jun, y la activación de la transcripción de PUMA, principal efector de la apoptosis en respuesta al sorafenib. Sin embargo, si se silenciaba c-Jun en dichas células, imitando el bloqueo llevado a cabo por el microRNA, se bloqueaba la respuesta apoptótica iniciada por sorafenib. Estos resultados indican que los niveles de c-Jun, se regulan por la presencia del miR-518d-5p, limitando con ello la sensibilidad de las células a la apoptosis inducida por sorafenib. Además, apoyan la hipótesis de que c-Jun actúa como mecanismo alternativo de regulación sobre PUMA. Estudios posteriores en el laboratorio han confirmado que c-Jun es diana directa del miR-518d-5p y han revelado que silenciando p53, no se observa modulación de la apoptosis mediada por PUMA.

## 6. CONCLUSIÓN

En definitiva, el miR-518d-5p además de regular GNMT, tiene como diana c-Jun siendo capaz de modular su expresión. De esta manera, la respuesta apoptótica favorecida por niveles disminuidos del miR-518d-5p, se debe a la regulación negativa que ejerce sobre c-Jun. La corrección de los niveles del miR-518d-5p, incrementados en tejido tumoral y en pacientes con peor pronóstico de CHC, puede sensibilizar a las células tumorales a la quimioterapia con sorafenib (ver **Anexo 4**). Todo esto posiciona al miR-518d-5p como excelente diana prometedora para nuevas aproximaciones terapéuticas.

## 7. AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido posible gracias al grupo de Investigación de Enfermedades Hepáticas de la Unidad de Metabólica del CICbioGUNE dirigido por M<sup>a</sup> Luz Martínez-Chantar.

## 8. BIBLIOGRAFÍA

Cazanave, S. C., Elmi, N. A., Akazawa, Y., Bronk, S. F., Mott, J. L., Gores, G. J. (2010). CHOP and AP-1 cooperatively mediate PUMA expression during lipopapoptosis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 299(1): 236-43.

Chen, YM., Shiu, JY., Tzeng, SJ., Shih, LS., Chen, YJ., Lui, WY., Chen, PH. (1998). Characterization of glycine-n-methyltransferase-gene expression in human hepatocellular carcinoma. *Int. J. Cancer.* 75(5): 787-93

Dudgeon, C., Peng, R., Wang, P., Sebastiani, A., Yu, J., & Zhang, L. (2012). Inhibiting oncogenic signaling by sorafenib activates PUMA via GSK3 $\beta$  and NF- $\kappa$ B to suppress tumor cell growth. *Oncogene.* 31(46): 4848-58.

Fernando, J., Sancho, P., Fernández-Rodríguez, C. M., Lledó, J. L., Caja, L., Campbell, J. S., Nelson, F., Fabregat, I. (2012). Sorafenib sensitizes hepatocellular carcinoma cells to physiological apoptotic stimuli. *J Cell Physiol.* 227(4): 1319-25.

Galceran, J., Ameijide, A., Carulla, M., Mateos, A., Quirós, JR., Alemán, A. et al. (2014). Estimaciones de la Incidencia y la supervivencia del cáncer en España y su situación en Europa. Informe de la Red Española de Registros de Cáncer (Redecan).

Huidobro, C., Toraño, EG., Fernández, AF., Urdinguio, RG., Rodríguez, RM., Ferrero, C., Martínez-Cambor, P., Boix, L., Bruix, J., García-Rodríguez, JL., Varela-Rey, M., Mato, JM., Martínez-Chantar, ML., Fraga, MF. (2013). A DNA methylation signature associated with the epigenetic repression of glycine N-methyltransferase in human hepatocellular carcinoma. *J Mol Med.* 91(8): 939-50

Jin, F., Wang, Y., Li, M., Zhu, Y., Liang, H., Wang, C., Wang, F., Zhang, C.Y., Zen, K., Li, L. (2017). MiR-26 enhances chemosensitivity and promotes apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through inhibiting autophagy. *Cell Death Dis.* 8: e2540

Liu, L., Cao, Y., Chen, C., Zhang, X., Mcnabola, A., Wilkie, D., Wilhelm, S., Lynch, M., Carter, C. (2006). Sorafenib blocks the RAF/MEK/ERK pathway, inhibits tumor angiogenesis, and induces tumor cell apoptosis in hepatocellular carcinoma model PLC/PRF/5. *Cancer Res.* 66(24): 11851-58.

Llovet, JM., Ricci, S., Mazzaferro, V., Hilgard, P., Gane, E., Blanc, JF., de Oliveira, AC., Santoro, A., Raoul, JL., Forner, A., Schwartz, M., Porta, C., Zeuzem, S., Bolondi, L., Greten, TF., Galle, PR., Seitz, J., Borbath, I., Haussinger, D., Giannaris, T., Shan, M., Moscovici, M., Voliotis, D., Bruix, J. (2008). Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 359(4):378–90.

Martínez-Chantar, M. L., Vázquez-Chantada, M., Ariz, U., Martínez, N., Varela, M., Luka, Z., Cpdevila, A., Rodríguez, J., Aransay, A.M., Matthiesen, R., Yang, H., Calvisi, D.F., Esteller, M., Fraga, M., Lu, S.C., Wagner, C., Mato, J. M. (2007). Loss of the glycine N-methyltransferase gene leads to steatosis and hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology.* 47(4): 1191-99.

Michelotti, G. A., Machado, M. V., & Diehl, A. M. (2013). NAFLD, NASH and liver cancer. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 10(11): 656-665.

Rahmani, M., Davis, E. M., Bauer, C., Dent, P., & Grant, S. (2005). Apoptosis Induced by the Kinase Inhibitor BAY 43-9006 in Human Leukemia Cells Involves Down-regulation of Mcl-1 through Inhibition of Translation. *J Biol Chem.* 280(42): 35217-27.

Servicios Científicos-Técnicos proporcionados por el Instituto de Salud Carlos III. Mortalidad de cáncer en España. (2014). [último acceso el 14/06/17]. Accesible en: <http://www.isciii.es/ISCIII/es/contenidos/fd-servicios-cientifico-tecnicos/fd-vigilancias-alertas/fd-epidemiologia-ambiental-y-cancer/mortalidad-cancer-en-espana.shtml>

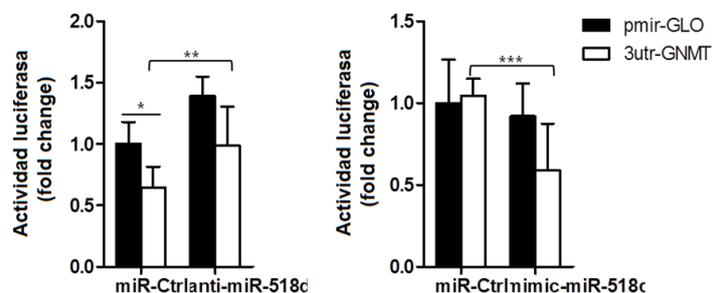
Toffanin, S., Hoshida, Y., Lachenmayer, A., Villanueva, A., Cabellos, L., Minguez, B., Savic, R., Stephen C.W., Thung, S., Chiang, D.Y., Alsinet, C., Tovar, V., Roayaie, S., Schwartz, M., Bruix, J., Waxman, S., Friedman S.L., Golub, T., Mazzaferro, V., Llovet, J.M. (2011). MicroRNA-based classification of hepatocellular carcinoma and oncogenic role of miR-517a. *Gastroenterology.* 140(5): 1618-28.

Villa, E., Critelli, R., Lei, B., Marzocchi, G., Camma, C., Giannelli, G., Pontisso, P., Gabibbo, G., Enea, M., Colopi, S., Caporali, C., Pollicino, T., Milosa, F., Karampatou, A., Todesca, P., Bertolini, E., Maccio, L., Martinez-Chantar, ML., Turola, E., Del Buono, M., De María, N., Ballestri, S., Schepis, F., Loria, P., Enrico Gerunda, G., Losi, L., Cillo, U. (2016) Neoangiogenesis-related genes are hallmarks of fast-growing hepatocellular carcinomas and worst survival. Results from a prospective study. *Gut.* 65(5):861-9

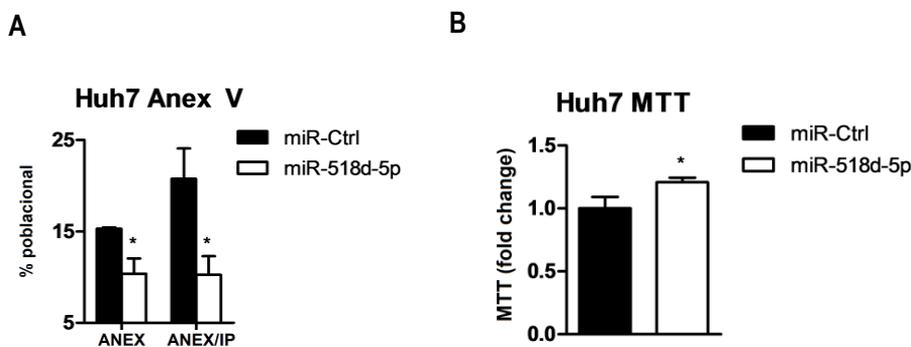
Yen, CH., Lu, YC., Li, CH., Lee, CM., Chen, CY., Cheng, MY., Huang, SF., Chen, KF., Cheng, AL., Liao, LY.W., Lee, YH., Chen, YM.A. (2012). Functional characterization of glycine N-methyltransferase and its interactive protein DEPDC6/DEPTOR in hepatocellular carcinoma. *Mol Med.* 18(1): 286-96.

Yu, J., & Zhang, L. (2008). PUMA, a potent killer with or without p53. *Oncogene.* 27: S71-S83.

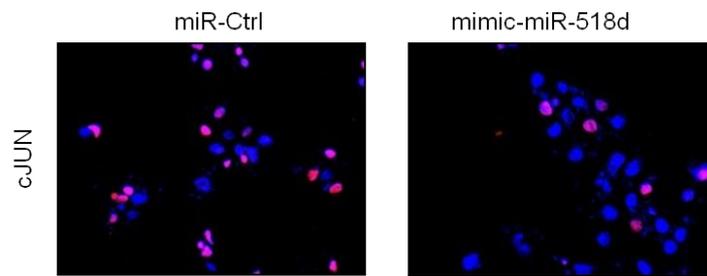
## ANEXO



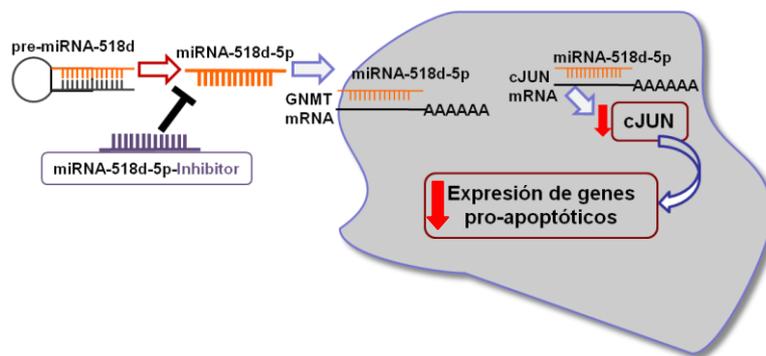
**Anexo 1. Regulación directa de miR-518d-5p sobre GNMT.** En un plásmido que contiene el gen de luciferasa, se introduce la región 3'UTR de GNMT, a la cual se une generalmente el microRNA. En ausencia del microRNA, la luciferasa se expresa con normalidad; sin embargo si el miR-518d se une a la región 3'UTR de GNMT, no permite su expresión. Inhibiendo el miR-518d-5p, se detecta mayor actividad luciferasa, mientras que su sobreexpresión provoca una disminución de los niveles de luciferasa. Se está dando la unión del miR-518d-5p a la región 3'UTR de GNMT, confirmando su regulación directa. pmir-GLO: plásmido vacío; 3utr-GNMT: plásmido con la región 3'UTR de GNMT



**Anexo 2. La modulación de la expresión de miR-518d afecta al ratio apoptótico y a la viabilidad celular.** (A), Se midió el porcentaje de células en apoptosis temprana (Anexina positivo) y tardía (Anexina positivo/IP positivo) de células Huh7, mediante el método Anexina V y posterior citometría de flujo. La anexina V-FITC se detectó mediante la emisión a 520nm y el IP-PE a 580nm. (B), Se analizó la viabilidad de células tumorales Huh7 con diferentes niveles de miR-518d-5p, midiendo el MTT reducido a 570nm. Los resultados están normalizados respecto al control. \* $P < 0,05$ .



**Anexo 3 Inmunofluorescencia de c-Jun en células Huh7 tratadas con Sorafenib.** Imágenes representativas de las Huh7 miR-518d control y transfectadas con mimic-miR-518d, obtenidas mediante microscopía de fluorescencia. En rosa se indica la presencia de c-Jun, debido al marcaje con el fluoróforo Cy3, mientras que en azul se visualizan los núcleos, marcados con DAPI.



**Anexo 4. Esquema del efecto obtenido al bloquear miR-518d.** La inhibición del miR-518d.5p, va a provocar que el microRNA no pueda bloquear a c-Jun, favoreciendo por tanto su expresión y permitiendo la transcripción de diversos genes pro-apoptóticos.