



**Universidad
Andrés Bello®**

UNIVERSIDAD ANDRÉS BELLO
FACULTAD DE MEDICINA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA

**USO DE microRNAS COMO MÉTODO DIAGNÓSTICO PARA
CÁNCER DE COLON**

Unidad de Investigación presentada para obtener el título de Tecnólogo Médico con
mención en Bioanálisis Clínico, Inmunohematología y Banco de Sangre

Autores:

Fernanda Diaz Carvajal

María José Lawrence Campos

Profesor guía:

Mario Párraga San Román.

Profesor co-guía:

Juan Villena García

Viña del Mar, Chile

2020

Índice

Resumen	4
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	8
CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO	11
2.1 Cáncer colorrectal	11
2.1.1 Epidemiología	12
FIGURA 2.1: Gráfico tasa de mortalidad ajustada de cáncer de colon y recto en Chile durante el año 2000 a 2016	12
2.1.2 Factores de riesgo	13
2.1.3 Signos, síntomas y clasificación	14
2.1.4 Diagnóstico de cáncer colorrectal	15
2.1.4.1 Detección de sangre oculta en heces	16
2.1.4.2 Colonoscopia	17
2.1.4.3 Biomarcadores	18
2.1.5 Tumorigénesis del cáncer colorrectal	20
FIGURA 2.2: Señalización EGFR/MAPK	22
FIGURA 2.3: Vía del factor de crecimiento beta (TGF- β)	24
FIGURA 2.4: Ilustración de progresión de tumorigénesis de cáncer colorrectal.	27
2.2 MicroRNAs	29
FIGURA 2.5: Biogénesis de microRNAs	31

2.2.1	Desregulación de microRNAs	32
	FIGURA 2.6: Desregulación de microRNAs	34
2.2.2	microRNAs en fluidos y desechos corporales	36
	CAPÍTULO 3: OBJETIVOS	39
3.1	Objetivo general	39
3.2	Objetivos específicos	39
	CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA	41
	FIGURA 4.1: Diagrama de flujo de selección de estudios.	43
	CAPÍTULO 5: RESULTADOS	44
	FIGURA 5.1: Factores influyentes para la estandarización de la cuantificación de microRNAs	45
5.1	MicroRNA-21	46
5.2	MicroRNA-200c	47
5.3	MicroRNA-92a	49
5.4	MicroRNA-135b	50
5.5	MicroRNA-802	52
	TABLA 5.1: Resumen de resultados	52
	CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN	54
	CAPÍTULO 7: CONCLUSIÓN	60
	CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

Resumen

En Chile, el cáncer colorrectal (CCR) es una patología que ha aumentado su incidencia y mortalidad en los últimos años. Actualmente su diagnóstico es realizado en base a métodos invasivos, costosos o poco confiables. En consecuencia, surge la necesidad de buscar nuevas alternativas para su detección temprana, donde los microRNAs (miRNAs) emergen como una opción viable como biomarcadores diagnósticos de CCR. Los microRNAs son pequeñas moléculas de RNA no codificantes capaces de regular indirectamente la expresión génica y pueden sufrir desregulaciones que en algunos casos promueven la proliferación celular y otros procesos que llevan a la transformación tumoral por sus actividades como oncogenes y/o supresores de tumores.

En esta investigación se analizaron 5 microRNAs (miR-21, miR-92a, miR-135b, miR-200c y miR-802) que podrían ser un posible blanco de estudio como nuevas herramientas en el diagnóstico del CCR, también se distinguieron factores que inciden sobre la estandarización de la medición de estos. Como resultado, obtuvimos que miR-21 con miR-92a podrían ser los más aptos para la detección temprana de CCR, pero no específicos de la patología al encontrarse desregulados en distintos cánceres e incluso en otras enfermedades.

En cuanto a miR-135b y miR-802 no se pudo llegar a discernir su utilidad clínica pues deben ser estudiados con mayor profundidad y enfoques.

Respecto a miR-200c, este fue descartado debido a su actividad contradictoria en CCR, falta de datos sobre su especificidad y sensibilidad y ser estudiado principalmente en cultivos celulares.

Además, evidenciamos que actualmente no existe una estandarización universal para la cuantificación de miRNAs que permitan la comparación y reproducibilidad entre estudios relacionados a ello. Complementario a lo anterior, se sugiere la búsqueda de nuevos microRNAs que sean específicos para CCR tomando en cuenta los factores que influyen en sus mediciones, como el tipo de muestra y extracción de RNA, entre otros.

Palabras clave: microRNA CCR, diagnóstico de cáncer colorrectal, biomarcador.

Abstract

Colorectal cancer (CCR) incidence and mortality has increased in Chile in the last few years. CCR diagnosis is normally performed using invasive and expensive methods yet with not total precision. As a consequence, searching for new early detection alternatives has become a must. At this point is where microRNAs (miRNAs) are considered as a viable and reliable option as CCR diagnostic biomarkers. MicroRNAs are small noncoding RNA molecules involved in gene expression regulation. In occasions miRNAs can be dysregulated themselves pathologically promoting cell proliferation and other processes that drive to tumorous cell transformation. miRNAs involved in these diseases are those with oncogene like or tumor suppressor activities.

In this job, we focused on 5 microRNAs (miR-21, miR-92a, miR-135b, miR-200c and miR-802) that may be studied as new diagnostic tools in CCR diagnosis. In this study we also distinguished factors that may have an effect on the standardization of these miRNAs' measurements. As a result, we conclude that both miR-21 and miR-92a might be the most suitable miRNAs out of the five selected for early detection of CCR. However, they are not CCR specific because they are also dysregulated in other different cancers or even in other different diseases.

In relation to miR-135b and miR-802 we could not reach any conclusion related to its clinical usefulness. More and deeper studies involving these two RNAs are needed.

We finally discarded mir-200 as a diagnostic marker because there is contradictory data related to its role in CCR, a lack of knowledge about its specificity and sensitivity and because it has been studied mainly in cell culture lines

In general terms we found that there are no clear standard rules about miRNA quantification that may allow to compare among different studies establishing reproducibility of the results. Moreover, we suggest that a search for new CCR specific miRNAs should be done taking into account the factors that influence in their measurements as the type of sample and RNA extraction among them.

Key words: microRNA CRC, colorectal cancer diagnosis, biomarker

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

El cáncer es una patología generada por la transformación progresiva de células normales a un estado neoplásico. En esta transformación adquieren una serie de capacidades distintivas tales como evadir supresores de crecimiento, activar invasión y metástasis, resistir muerte celular, adquirir inmortalidad replicativa e inducir angiogénesis y mantener señalización proliferativa. Todas estas en conjunto constituyen un principio de organización que le proporciona a la célula ventajas proliferativas y permite un marco para el estudio y la comprensión frente a la diversidad de enfermedades neoplásicas (Hanahan & Weinberg, 2011).

En Chile, el cáncer constituye la segunda causa de mortalidad después de las enfermedades del aparato circulatorio y se espera que hacia el año 2023, esta sea la primera causa de muerte en el país (Ministerio de Salud, 2018). Durante el año 2016 el cáncer colorrectal (CCR) provocó el 9% de los decesos por patologías oncológicas en todo el territorio. (Ministerio de Salud, 2019). Y el año 2018 la incidencia de cáncer de colon por cada 100.000 habitantes aumentó en el país ocupando el tercer lugar en hombres y el segundo en mujeres (Ministerio de Salud, 2018).

Los factores de riesgo que predisponen para el CCR son principalmente la edad, los hábitos alimenticios, prácticas de consumo no saludables y factores genéticos (Thanikachalam & Khan, 2019). Aunque el 70% de los casos son esporádicos, existe un 20-25% de los casos de CCR en los que aparece un componente familiar y un 5-10% presenta predisposición hereditaria mendeliana (Ramón & Asensio, 2008), por lo tanto, estos tienen un origen genético.

En Chile el Ministerio de Salud (MINSAL) indica que la población objetivo para diagnóstico de CCR son personas de entre 50 y 75 años, ya que el 60% de los casos ocurre en personas de 65 años o más, grupo en el que también se observa la mayor mortalidad (Ministerio de Salud, 2018; Nuñez, 2017). Actualmente, los métodos que se utilizan para el diagnóstico generalmente son el test de sangre oculta en deposición para tamizaje de los pacientes y la colonoscopia para confirmación del diagnóstico (Ministerio de Salud, 2018). Dichas técnicas cuentan con ciertas limitaciones, el test de búsqueda de sangre oculta en heces al detectar la actividad peroxidasa del hemo (Issa & NouredDine, 2017) puede generar un alto número de resultados falsos positivos a causa de presencia de grupos hemo derivados de la dieta, sangrado gastrointestinal, entre otras causas (Kościelniak-Merak et al., 2018). La colonoscopia se conoce que es invasiva y muchas veces riesgosa para los pacientes, más aún si estos son de edad avanzada, ya que son quienes mayormente pueden sufrir complicaciones a consecuencia de la ejecución de la técnica (Rutherford & Calderwood, 2018). Otro método que se realiza a pacientes con CCR es la medición de la concentración del biomarcador llamado antígeno carcinoembrionario (ACE), el cual sólo se utiliza como apoyo para el seguimiento de dicho cáncer, la razón de ello es que la alteración en su concentración no ocurre en etapas tempranas de CCR y su desregulación no es exclusiva en la enfermedad (Lech et al., 2016).

A causa de las limitaciones y/o invasividad de los métodos existentes para el diagnóstico de CCR que dificultan el diagnóstico precoz, se fundamenta la necesidad de definir nuevos biomarcadores diagnósticos confiables y específicos. Una alternativa altamente viable frente al diagnóstico de CCR como biomarcadores podrían ser los microRNAs (Hao & Ma, 2018), ya que están relacionados con la existencia de tumores en etapa temprana, en etapa avanzada, con la recurrencia tumoral y con la sensibilidad a los medicamentos (Mitchell et al., 2008; Fadaka et al., 2019).

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas no codificantes de RNA que influyen en todos los procesos de desarrollo biológicos y enfermedades a través de la degradación del mRNA diana o evitando su traducción (Bartel, D. 2018). Existen dos tipos de miRNAs cuya desregulación se relaciona con los procesos tumorales. Por un lado, se encuentran los miRNAs que tienen actividad oncogénica (Oncomirs), éstos promueven el desarrollo tumoral al unirse y bloquear la traducción de genes supresores de tumores. Y por otro lado, los miRNAs supresores de tumores que son responsables de detener el desarrollo del tumor inhibiendo la traducción de genes pro-proliferación como algunos oncogenes (Saliminejad et al., 2019). Estos se han encontrado como entidades circulantes en fluidos corporales de mamíferos, circulación sanguínea, heces y orina (Lu & Rothenberg, 2017). Por lo cual estos miRNAs se han investigado como método de diagnóstico de CCR, debido a que son fáciles de obtener, poseen una alta estabilidad y es posible medir los cambios que presentan sus niveles durante el desarrollo de cáncer (Cai et al., 2013).

CAPÍTULO 2: MARCO TEÓRICO

2.1 Cáncer colorrectal

El cáncer de colon, también conocido como cáncer colorrectal es un tumor maligno que surge de la pared interna del intestino grueso (colon) o el recto y tiene la capacidad de invadir otras partes del cuerpo (Ni et al., 2019). La evidencia respecto al origen de la mayoría de los carcinomas colorrectales sugiere que inician como adenomas y que progresan gradualmente a través de aumentos de tamaño, displasia y la adquisición de morfología vellosa (Fearon & Vogelstein, 1990).

2.1.1 Epidemiología

Datos epidemiológicos de Chile indican que el cáncer de colon es el cuarto de mayor frecuencia de egresos hospitalarios entre el año 2010 y 2016 y que su incidencia por cada 100.000 habitantes aumentó durante el año 2018 ocupando el tercer lugar en hombres y el segundo en mujeres (Ministerio de Salud, 2018). Entre los años 2000 a 2016 hubo un aumento en la tasa de mortalidad ajustada de ambos cánceres (FIGURA 2.1). Además, durante el año 2016 en el país se registraron 1.861 muertes por cáncer de colon y 501 a causa de cáncer de recto, provocando en conjunto el 9% de los decesos por patologías oncológicas en todo el territorio (Ministerio de Salud, 2019).

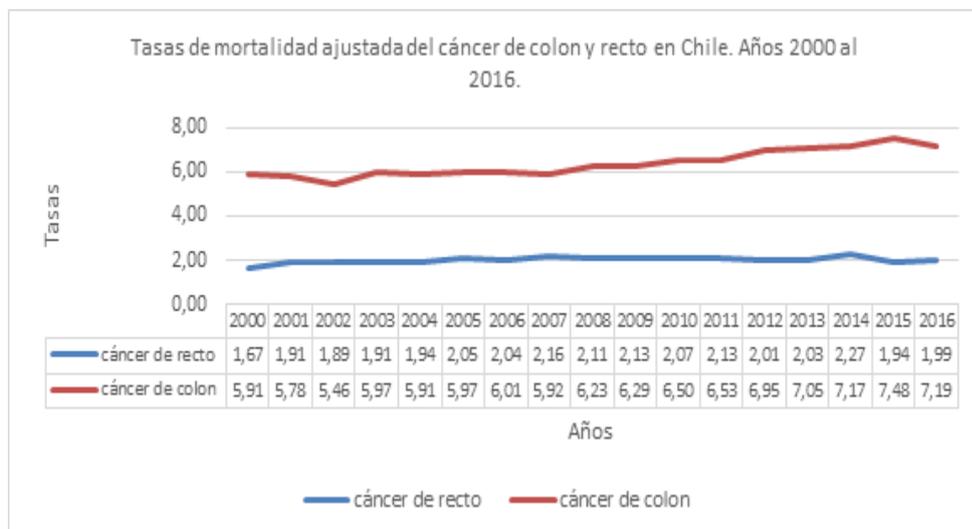


FIGURA 2.1: Gráfico de la tasa de mortalidad ajustada de cáncer de colon y

recto en Chile entre el año 2000 a 2016.

Entre los años 2000 a 2016 la tasa de mortalidad ajustada aumentó de 5,91 a 7,19 por cada 100.000 habitantes en cáncer de colon y de 1,67 a 1,99 por cada 100.000 habitantes en cáncer de recto. Extraído de Ministerio de Salud, 2019.

2.1.2 Factores de riesgo

Existen diversos factores de riesgo asociados a esta patología, dentro de los cuales se encuentra la edad, siendo este el factor que influye mayormente por sobre otros, puesto que el 60% de los casos ocurre en personas mayores de 65 años (Ministerio de Salud, 2018; Nuñez, 2017). También se encuentra la dieta pobre en fibra, fruta y verduras en contraste a un alto consumo de carnes rojas y alimentos procesados que podrían conducir a la generación de CCR; asimismo el consumo de alcohol, el tabaco, el sedentarismo y la obesidad se asocian a un aumento de riesgo de CCR (Thanikachalam & Khan, 2019). Por último están los factores genéticos, a pesar de que la mayoría de los casos de CCR son esporádicos (70%), existe un grupo denominado agregación familiar correspondiente al 15-20% de los casos de cáncer de colon, asociado a genes de baja penetrancia modificadores de riesgo en interacción con carcinógenos medioambientales (Ramón & Asensio, 2008) como algunos metales pesados presentes en carnes rojas (Domingo & Nadal, 2017). También se encuentran los síndromes de cáncer colorrectal hereditarios como la poliposis adenomatosa familiar (PAF), debida a mutaciones en el gen *APC* con patrón de herencia autosómica dominante (Weinberg et al., 2017) y el síndrome de

Lynch (HNPCC) asociado a la mutación de los genes *MMR*, los cuales permiten la reparación del DNA (Boland et al., 2018) con un patrón de herencia autosómica recesiva; que corresponden alrededor del 5% respecto al total de casos de cáncer de colon (Kanth et al., 2017).

2.1.3 Signos, síntomas y clasificación.

El CCR se puede presentar con signos y síntomas como la rectorragia y la hematoquecia (deposiciones mezcladas con sangre), cambio de hábito intestinal persistente, asociado a baja de peso y apetito, dolor abdominal y anemia ferropriva (Thanikachalam & Khan, 2019). Estos síntomas aparecen cuando el cáncer está en etapas avanzadas, lo que se relaciona a un diagnóstico tardío (Moreno et al., 2016).

Los tumores presentes en el CCR se pueden clasificar de manera histológica en (Ministerio de Salud, 2013):

- Adenocarcinoma.
- Adenocarcinoma mucinoso (coloide).
- Adenocarcinoma en anillo de sello.
- Tumores escirrosos neuroendocrinos.
- Tumores carcinoides.

- Indiferenciado.
- Estromales.

2.1.4 Diagnóstico de cáncer colorrectal

En Chile, el diagnóstico de CCR se realiza principalmente a personas sintomáticas de entre 50 y 75 años, ya que como se indicó anteriormente el 60% de los casos se observa en personas de 65 años o más, grupo en el que también se observa la mayor mortalidad (Ministerio de Salud, 2018; Nuñez, 2017).

Los exámenes que actualmente se indican en el Plan Nacional de Cáncer 2018-2028 en el diagnóstico de CCR son la detección de sangre en deposiciones como método de tamizaje y colonoscopia como método diagnóstico confirmatorio.

2.1.4.1 Detección de sangre oculta en heces

La detección de sangre oculta en heces se utiliza como método de tamizaje en personas con sintomatología o en mayores de 50 años, el que hasta el año 2013 se realizaba de manera anual para controlar a dicha población (Ministerio de Salud, 2013). A pesar de ser este un método simple y barato se ha evidenciado que arroja gran cantidad de resultados falsos positivos debido al sangrado del tracto gastrointestinal y la presencia de grupos hemo derivados de la dieta, como por ejemplo de alimentos cárnicos (Kościelniak-Merak et al., 2018). Esto se explica debido a que la técnica se realiza a través de una reacción química que depende de la actividad peroxidasa del hemo (Issa & NouredDine, 2017). Se debe tener en consideración además de lo anterior que solo el 50% de los tumores y el 10% de los pólipos sangran lo suficiente para diagnosticarse por este método (Rodríguez-Montes & Menéndez Sánchez, 2014).

2.1.4.2 Colonoscopia

El cuadro clínico por lo general es inespecífico, por lo que el diagnóstico precoz requiere un alto índice de sospecha, donde el examen de elección es la colonoscopia (Ministerio de Salud, 2019). Dicho método brinda la oportunidad para la extirpación endoscópica de adenomas y la biopsia de lesiones masivas sospechosas (I. A. Issa & NouredDine, 2017) para su posterior etapificación, siendo a su vez capaz de detectar CCR con una sensibilidad de 95% y adenomas avanzados con una sensibilidad entre 88%-98% (Imperiale et al., 2000; Rockey et al., 2005). A pesar de los beneficios que se pueden obtener a través de la realización de la colonoscopia, esta tiene ciertas limitaciones, las cuales inciden en el diagnóstico oportuno de CCR, ya que se ha visto que casi el 90% de los pacientes con cáncer colorrectal se han diagnosticado al presentar síntomas y/o cursar una fase avanzada de la enfermedad a través de dicho método (Moreno et al., 2016). Una de las restricciones surge a partir de las condiciones que debe cumplir el paciente para la ejecución del examen, ya que necesita del vaciado intestinal, el cual es fundamental para que los resultados sean óptimos y la duración de la colonoscopia sea lo más breve posible (I. A. Issa & NouredDine, 2017), lo que puede verse dificultado por que el proceso de vaciamiento puede resultar bastante invasivo y algunas veces poco efectivo. El miedo que la colonoscopia puede generar en los pacientes a quienes se les indica su realización es otra de las limitaciones, el que posiblemente pueda implantarse a causa de la poca educación sanitaria que pueda tener la persona sobre el CCR (Brenner et al., 2015) o porque conozca las complicaciones que pueden ocurrir durante la ejecución de la técnica como la perforación intestinal, hemorragia y/o alteración de la frecuencia cardíaca (Kim et al., 2019), lo que ocurre mayormente en personas con enfermedad de base o edad avanzada (Rutherford & Calderwood, 2018), siendo estos últimos quienes justamente conforman la población con mayor probabilidad de

desarrollar o cursar con CCR, por lo tanto sería una restricción para la indicación de colonoscopia. Además de todo lo mencionado anteriormente, cabe destacar que el examen es de un alto costo monetario, por lo tanto, su valor elevado sería otra condición que puede dificultar su realización en pacientes de menores recursos (Cancer & Disparities, 2016).

Por otro lado, es relevante mencionar la responsabilidad de quien ejecuta la técnica de lograr un buen desarrollo del procedimiento en conjunto a la entrega de resultados óptimos a través de éste, lo cual depende netamente de sus capacidades y experiencia con colonoscopias para el diagnóstico oportuno y certero de CCR en sus diferentes fases (Simon, 2016).

2.1.4.3 Biomarcadores.

Un biomarcador es un indicador capaz de reflejar el estado de salud y procesos biológicos, siendo útil para la detección, diagnóstico, pronóstico, seguimiento y elección de tratamiento frente a enfermedades como el cáncer (Das et al., 2016).

Las características con las que debe contar un biomarcador ideal son (Courchoud & Calvo, 2016; Califf, 2018):

Ser capaz de modular procesos relevantes en la enfermedad de la cual se busca detectar y reflejar un cambio subclínico.

- Ser estable.
- Debe permitir una detección temprana de la enfermedad.
- Poder medirse en sangre, fluidos biológicos y/o tejidos sin ser invasivos y de manera rápida.
- Sensible y específico.
- Repetible a bajo costo.

Existen tres tipos de biomarcadores principales dentro de los cuales se encuentran los marcadores pronósticos, predictivos y diagnósticos (Das et al., 2016). Siendo los biomarcadores diagnósticos los de interés para este trabajo. Un marcador diagnóstico se define como aquel que “detecta o confirma la presencia de una enfermedad o condición de interés, o identifica a un individuo con un subtipo de la enfermedad” (Califf, 2018). Actualmente se utiliza sólo un biomarcador en cáncer colorrectal, este es el antígeno carcinoembrionario (ACE). ACE se emplea únicamente en el seguimiento de pacientes en tratamiento para CCR, no es posible utilizarlo en el diagnóstico de cáncer colorrectal pues se ha visto que su elevación no es tejido específico, por lo tanto, no es exclusivo de CCR, además pocas veces ha sido posible identificar su aumento en etapas tempranas de la enfermedad y se ha evidenciado que es poco útil en la discriminación entre pólipos benignos de malignos (Lech et al., 2016).

2.1.5 Tumorigenesis del cáncer colorrectal

El desarrollo de la tumorigénesis ocurre en al menos tres pasos, estos son: iniciación, promoción y progresión. El modelo de tumorigénesis de cáncer colorrectal requiere de la activación de oncogenes junto a la pérdida de genes supresores de tumores a causa de cambios epigenéticos y/o la acumulación de mutaciones genéticas. Se necesita además de la expansión clonal de la célula madre con las mutaciones, la cual se encuentra en las criptas del epitelio intestinal (Fearon & Vogelstein, 1990).

Para poder comprender de mejor manera que provocan las alteraciones genéticas, es necesario primero explicar las vías que principalmente se ven afectadas en la tumorigénesis del CCR (Shirafkan et al., 2018), las que se describen a continuación.

- Vía Wnt: La activación anómala en Wnt, provoca el crecimiento tumoral de cáncer colorrectal (Novellademunt et al., 2015), ya que esta influye en la regulación de células madre presentes en la base de las criptas intestinales (Koveitypour et al., 2019), tal activación puede ocurrir por la pérdida o mutación del gen *APC* ó del gen *CTNNB1*, debido a que el gen *CTNNB1* codifica para la proteína β -catenina y su mutación origina alteraciones en el dominio N-terminal de la proteína, lugar donde se ubican los sitios de fosforilación que son necesarios para su degradación (Sparks et al., 1998). El gen *APC* codifica para la

proteína APC, la que participa en la degradación de la β -catenina (Koveitypour et al., 2019).

Esta vía se divide en dos:

- Vía canónica: es aquella que depende de β -catenina para su funcionamiento y es la responsable de mantener en buen estado los compartimientos de las células madre normales presentes en las criptas del intestino. El funcionamiento irregular de esta vía ocurre por fallas en la degradación de β -catenina, la que se acumula en el citoplasma celular para luego moverse dentro del núcleo, desencadenando la activación de genes implicados en la proliferación celular (Koveitypour et al., 2019).
- Vía no canónica: es independiente de β -catenina (Koveitypour et al., 2019) y puede ocurrir por dos rutas, una de ellas es la ruta de la polaridad de la célula plana, donde la asociación de Wnt a otros receptores que controlan GTPasas (Kohn & Moon, 2005) pueden alterar el mecanismo de reordenamiento de actina y citoesqueleto (Topol et al., 2003). La otra ruta es dependiente de calcio, la cual promueve la diferenciación en el sistema neuronal y suprime la vía canónica de Wnt (Krishnamurthy & Kurzrock, 2018).
- Señalización EGFR/MAPK (FIGURA 2.2): EGFR1 es un receptor de crecimiento ubicado en la membrana celular con actividad tirosina quinasa en su dominio intracelular. Al unirse a su ligando este es capaz de estimular la activación de K-ras para comenzar una cascada

de señales hacia el núcleo celular que permiten la proliferación, metástasis y la inhibición de la apoptosis (Walther et al., 2009).

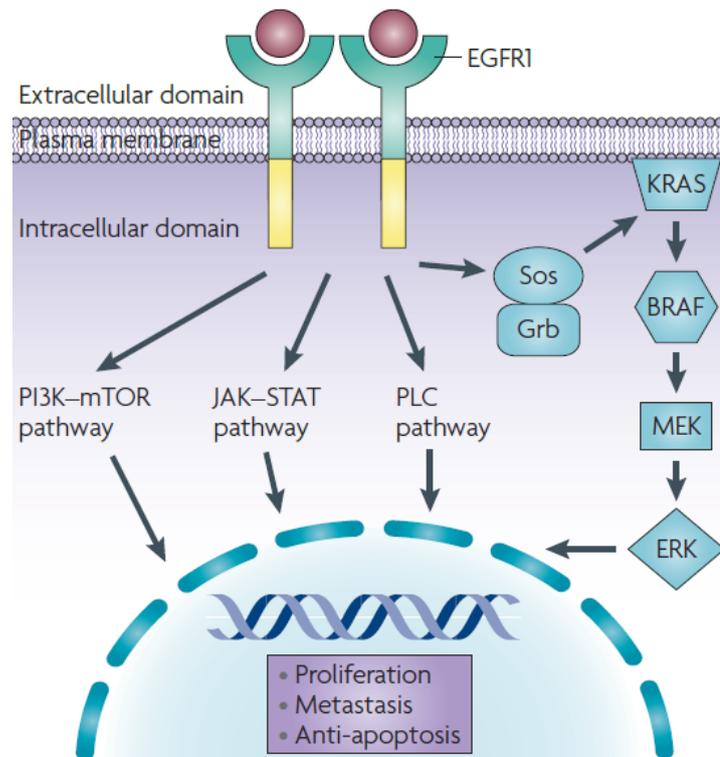


FIGURA 2.2: Ilustración de señalización EGFR/MAPK. Extraído de Walther

et al., 2009.

- Vía de señalización del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (FIGURA 2.3): esta vía controla procesos biológicos celulares como la apoptosis, proliferación, diferenciación, adhesión y migración (Koveitypour et al., 2019), por lo que la señalización de TGF- β en células que componen el epitelio colónico minimiza su multiplicación, promueve la apoptosis y su diferenciación (Jung et al.,

2017). La vía se divide en dos, en la vía canónica y no canónica. La vía canónica comienza con la unión del ligando a receptores TGF- β de tipo 2 (TGF- β -R2) el cual activa el receptor de tipo 1 TGF- β -R1 al fosforilarlo (ambos receptores luego son endocitados), este último es capaz de activar mediante la fosforilación a los factores de transcripción R-SMAD, SMAD2 y SMAD3, los que luego pueden unirse SMAD4 para migrar al núcleo y regular la expresión de genes blanco (Bailey et al., 2017; Jung et al., 2017) La vía no canónica se activa de la misma manera que la anterior pero, es independiente de los factores de transcripción SMAD, a través de esta vía es que pueden activarse otras cascadas de señalización como la vía Wnt y la vía MAPK (Staudacher et al., 2017).

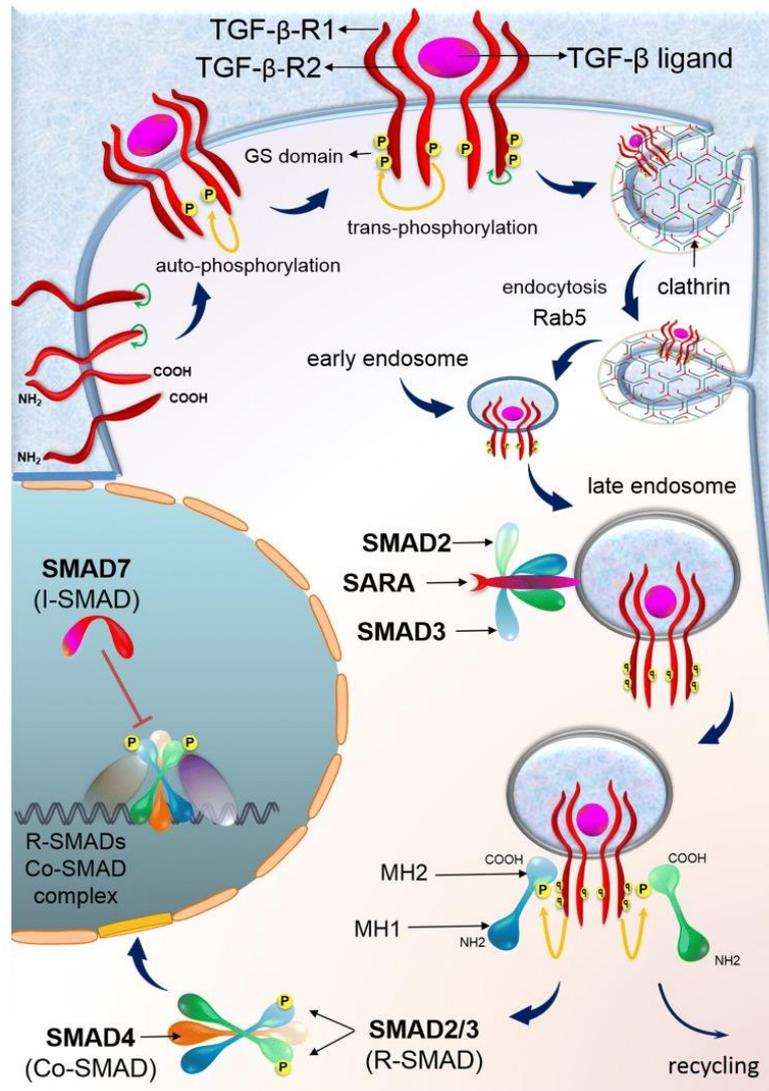


FIGURA 2.3: Ilustración de la vía de señalización del factor de crecimiento

transformante beta (TGF-β). Extraído de Koveitypour et al., 2019.

- TP53 o p53: la proteína TP53 o p53 está codificada por el gen supresor de tumores que lleva el mismo nombre que la proteína, esta se encuentra alterada en la mayoría de los cánceres humanos a causa de mutaciones o desactivación del gen. La vía de p53 se activa cuando

la célula se encuentra estresada o dañada, promoviendo la apoptosis o la detención del ciclo celular para evitar la proliferación y progresión celular al unirse a DNA específicos para su transcripción (Vogelstein et al., 2000).

El posible orden y los mecanismos principales por los cuales se explica la tumorigénesis de cáncer colorrectal son:

1. Inestabilidad cromosómica (CIN) esta es la variación genética más común en cáncer colorrectal, presentándose en el 65 a 70% de los casos (Markowitz & Bertagnolli, 2009). En esta se pueden producir cambios estructurales o numéricos en cromosomas generando en su mayoría aneuploidía (Walther et al., 2009), así como también poliploidía (Miyazaki et al., 1999). Estos cambios según Vogelstein et al., 1988 ocurren con mayor frecuencia en los cromosomas 5q, 17p y 18q.

El modelo por el cual la CIN produciría cáncer en colon y/o recto comienza con la formación de adenomas asociados a la pérdida del gen supresor de tumores *APC* (*Adenomatous polyposis coli*) (Walther et al., 2009), ubicado en el cromosoma 5q y que se vincula a la poliposis adenomatosa familiar (Komarova et al., 2002). El gen *APC* regula procesos biológicos como la migración celular, adhesión, apoptosis y reparación de ADN (Lui et al., 2016), por lo que se relaciona su inactivación o pérdida al desarrollo neoplásico celular (Vogelstein et al., 1988) así como también a la activación de la vía Wnt / β -catenina (McCullough, 2012; Nagase & Nakamura, 1993). Se cree que el gen *APC* es uno de los primeros en inactivarse en casos de cáncer colorrectal esporádico, hecho que ocurre con mayor frecuencia en casos donde existe inestabilidad genética previa (Komarova et al., 2002).

Otras de las mutaciones que ocurren en la tumorigénesis del cáncer colorrectal se produce en el gen *ras*, principalmente en el gen *K-ras* (Vogelstein et

al., 1988). Esta mutación produce en la mayoría de los casos proteínas GTPasas-ras con alteraciones en la capacidad de hidrólisis de moléculas GTP (Downward, 2003), siendo éste un evento iniciador de dicho cáncer (Fearon & Vogelstein, 1990) y uno de los responsables de su avance, ya que es capaz de inducir hacia la transformación celular (Vogelstein et al., 1988) debido a los genes diana de la vía EGFR/MAPK a la cual pertenece KRAS que regulan la proliferación celular, metástasis y apoptosis (FIGURA 2.2) (Walther et al., 2009). Otras de las mutaciones promotoras de CCR ocurren en el gen *CTNBI* siendo esta alteración excluyente a la del gen *APC*, ya que ambas pertenecen a la misma vía de señalización, pudiendo activar la vía Wnt (Sparks et al., 1998).

En etapas avanzadas de CCR con frecuencia ocurrirían deleciones en los cromosomas 17p y 18q (Vogelstein et al., 1988). El cromosoma 17p contiene el gen *TP53* o *p53* que codifica para la proteína p53 (Baker et al., 1989), la que es importante para evitar la proliferación y progresión celular (Vogelstein et al., 2000). En el caso de CCR como se evidencia en la FIGURA 2.4, la alteración en el gen *p53* ocurriría luego de la deleción del cromosoma 18q y previo a que el adenoma adquiriera características invasoras y se desarrolle el carcinoma franco. Como consecuencia de la deleción del cromosoma 18q comúnmente se pierde el gen *DCC* (*Deleted in Carcinoma Colorrectal*), el que codifica para un receptor transmembrana (Edelman, 1988) que podría aportar en el desarrollo de CCR a través de interacciones intercelulares o con la matriz extracelular (Fearon & Vogelstein, 1990) y el gen *SMAD4* que es miembro de la familia de proteínas del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β) (Walther et al., 2009).

2. La Inestabilidad de microsatélites (MSI o MIN) está presente en el 15-20% de los cánceres de colon esporádicos y mayor a un 95% en pacientes con síndrome de Lynch (Grady & Carethers, 2008). Ésta se define como el cambio en la longitud de microsatélites debido a inserción o eliminación de unidades repetidas de estos (Boland et al., 1998). Defectos en genes de reparación de DNA *MMR* están

asociados al origen de la inestabilidad de microsatélites, lo que ocurre ya sea por mutaciones puntuales de alguno de los componentes de la familia MMR o por metilaciones aberrantes en promotores de la isla CpG (Grady & Carethers, 2008).

3. El fenotipo metilador de isla CpG (CIMP) o las metilaciones irregulares en promotores de islas CpG son capaces de silenciar epigenéticamente genes supresores de tumores, evitando que estos se expresen debido a inactivación postranscripcional (Issa, 2004; Lin & Gregory, 2015), tal como puede ocurrir con microRNAs (Lin & Gregory, 2015).

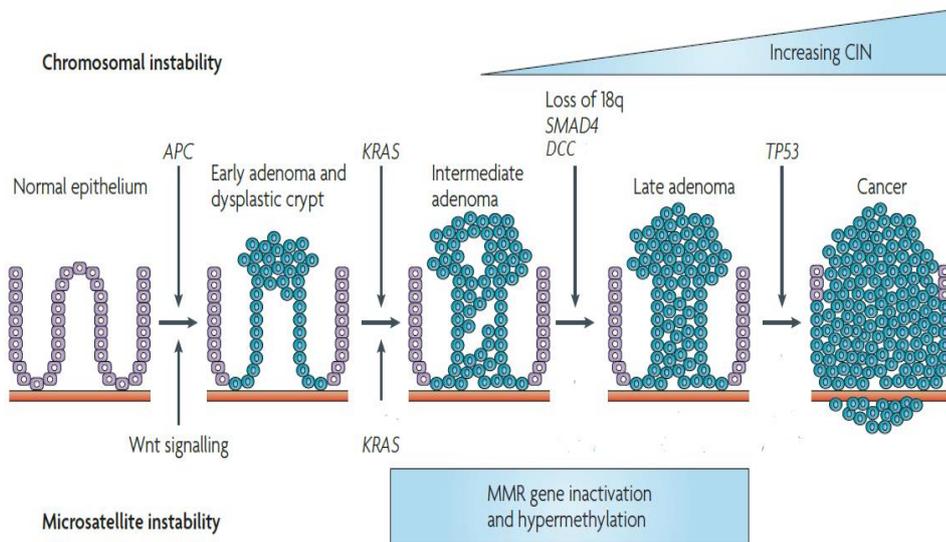


FIGURA 2.4: Ilustración de progresión de tumorigénesis de cáncer

colorrectal. Extraído y modificado de Walther et al., 2009.

Esta secuencia se generaría por la inestabilidad cromosómica a causa de alteraciones del gen APC permitiendo la formación de adenomas (Walther et al., 2009), seguida de la mutación del gen Kras asociada principalmente a adenomas de

gran tamaño (Fearon & Vogelstein, 1990), en la transición de adenoma intermedio a tardío ocurriría la pérdida del cromosoma 18q alterándose así la vía del TGF- β (Walther et al., 2009), finalizando con la modificación del gen p53 codificado en el cromosoma 17p (Baker et al., 1989). La inestabilidad de microsatélites es poco probable que ocurra en adenomas, aun así, se cree que este mecanismo se inicia con la desregulación de la vía Wnt y puede estar asociado a mutaciones del gen Kras (Walther et al., 2009), las fallas en el mecanismo de reparación de DNA MMR que se ven afectadas en la MSI (Grady & Carethers, 2008) pueden ocurrir de manera esporádica, provocando el aumento de la selección de células con mutaciones en sus microsatélites (Walther et al., 2009). Por otro lado, ocurren silenciamientos y activación de genes mediante la regulación epigenética provocada por metilaciones aberrantes (Issa, 2004; Lin & Gregory, 2015).

4. Los miRNAs a través de su interacción con mRNA dianas inciden en el desarrollo, apoptosis, diferenciación y proliferación celular (Mohammadi et al., 2016), por lo que su desregulación puede afectar en el control que ejercen sobre procesos biológicos críticos lo que conduce a la oncogénesis y otras patologías (Armand-Labit & Pradines, 2017). La alteración de estos miRNAs ocurre mediante la mutación ó pérdida de genes que codifican para microRNAs, factores de transcripción y/o moléculas que participan en su biogénesis (Lin & Gregory, 2015).

Los miRNAs se han visto involucrados en las principales vías de señalización desreguladas en el cáncer colorrectal ya mencionadas (Shirafkan et al., 2018).

5. Transición epitelio-mesénquima (EMT) es un proceso que colabora con las primeras etapas de metástasis de cáncer, donde las células pierden su epitelio característico y adquieren características mesenquimales (Pastushenko & Blanpain, 2019). Durante su desarrollo ocurre la regulación negativa del marcador epitelial E-cadherina y regulación positiva de marcadores mesenquimatosos como de N-

cadherina y vimentina, asociado a fenotipo invasivo (Cho et al., 2019), lo que permite que las células cancerosas pierdan polaridad, se separen entre sí, adopten las características de un fenotipo mesenquimatoso y adquieran movilidad además de capacidad invasora hacia otros sitios del cuerpo (Hao et al., 2019).

2.2 MicroRNAs

Los miRNAs son pequeñas moléculas de RNA de longitud entre 21 y 23 nucleótidos de cadena sencilla no codificante que actúan como reguladores de la expresión génica celular a nivel post-transcripcional. Su biogénesis (FIGURA 2.5) comienza al expresarse en forma de miRNA primario (pri-miRNA) en el núcleo celular por transcripción de la RNA pol II (Lee et al., 2002; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Allí son procesados por el complejo microprocesador compuesto por DROSHA y DGCR8 (proteína asociada a DROSHA), en donde sus dos dominios RNasa III cortan el pri-miRNA liberando bucles de tallos llamados pre-miRNAs (Lee et al., 2003). De esta manera salen al citoplasma a través de las proteínas exportina-5 y RAN-GTP (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004). En el citoplasma sufren un segundo procesamiento por medio de Dicer, convirtiéndose en miRNA dúplex al cortar ambas hebras del pre-miRNA (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Esta estructura se carga ahora con proteínas de la familia de las Argonautas (AGO), con ayuda de chaperonas que utilizan ATP para que las AGO adquieran una conformación abierta que permita la unión del miRNA dúplex a su estructura (Iwasaki et al., 2010). Una vez unido el miRNA dúplex a las

proteínas AGO, éstas seleccionan una de las dos hebras del miRNA dúplex para convertirse en el miRNA llamada también cadena guía del complejo silenciador (Kawamata and Tomari, 2010). Este proceso de selección no está bien descrito a la fecha. Tras esto, el complejo de proteínas AGO junto con la hebra de miRNA seleccionada, denominado complejo RISC (Complejo de Silenciamiento Inducido por RNA) se une, por complementariedad miRNA-mRNA, a la región 3' no traducida (3'-UTR) de los mRNA diana evitando la traducción del mismo o favoreciendo su destrucción (Bartel, 2018). Si esa complementariedad no es tan alta se produce represión de la traducción, en tanto que un emparejamiento completo produce una degradación del mRNA diana (Tume et al., 2016). Estos miRNAs actúan de dicha manera en prácticamente todos los procesos celulares y tienen un papel crucial en cuanto a procesos biológicos y condiciones específicas, como el desarrollo embrionario, apoptosis, proliferación celular, diferenciación celular, entre otros (Ortiz-Quintero, 2016).

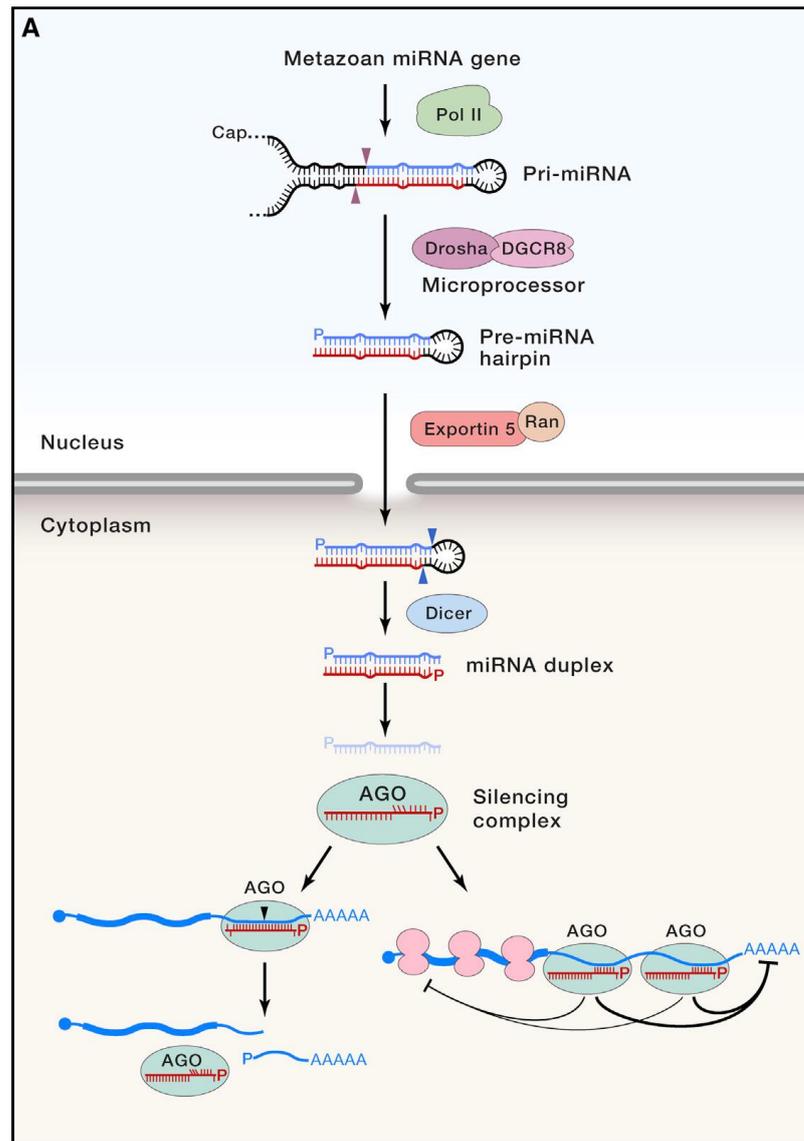


FIGURA 2.5: Ilustración de la biogénesis de los microRNAs. Extraído y

modificado de Bartel, 2018.

En el núcleo, el pri-miRNA es transcrito por la RNA pol II desde los intrones presentes en el material genético propio del huésped (Lee et al., 2002; Cai et al., 2004; Lee et al., 2004). Luego es cortado y liberado en forma de pre-miRNA por la RNA pol III presente en DROSHA (Lee et al., 2003) para posteriormente ser transportado al citoplasma por la exportina-5 (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004;

Lund et al., 2004). Una vez en el citoplasma, Dicer corta ambas hebras del pre-miRNA dejándolo como miRNA dúplex (Grishok et al., 2001; Hutvagner et al., 2001), el cual se carga a la proteína AGO (Iwasaki et al., 2010) para seleccionar una de sus hebras a través del complejo RISC que finalmente une el miRNA maduro y degrada o evita la traducción de la hebra sobrante (Bartel, 2018).

2.2.1 Desregulación de microRNAs

La presencia de estos miRNAs tiene un papel clave en el inicio del cáncer, su progresión y metástasis, ya que son capaces de controlar genes y objetivos celulares / moleculares que regulan procesos vitales como la apoptosis, la angiogénesis, la diferenciación y el ciclo celular (Mirzaei, Khataminfar et al., 2016; Mirzaei, Naseri et al., 2016; Mohammadi et al., 2016; Moridikia et al., 2018) para afectar el desarrollo del tumor, otorgándole a estas moléculas un papel crucial en el desarrollo del cáncer a través de su desregulación (FIGURA 2.6), resaltando la importante función que comprende la biogénesis de miRNAs en los tumores humanos (Lin & Gregory, 2015). La transcripción del pri-miRNA es el primer nivel en el que una desregulación de la biogénesis generará una alteración. La variación genómica del pri-miRNA altera la expresión de miRNAs cascada abajo pudiendo provocar el inicio y progresión de la patología (Zhang et al., 2006). Otro punto clave afectado por la desregulación está asociado al microprocesador, en donde se observa un aumento en la expresión de DROSHA, lo que aumenta en consecuencia la expresión de miRNAs, promoviendo la proliferación, migración e invasión celular dependiendo si

son OncomiRs o no; por otro lado, los niveles de DROSHA puede estar regulados negativamente, provocando una disminución en la expresión de miRNAs contribuyendo su alteración con la metástasis, invasión celular y supervivencia disminuida del paciente (Muralidhar et al., 2011). Junto a DROSHA, la sobreexpresión de DGCR8 promueve la transformación celular y el crecimiento tumoral (Kumar et al., 2007). Dentro de la exportación del pre-miRNA, una desregulación en la exportina-5 provoca una acumulación de estos pre-miRNAs dentro del núcleo celular causando defectos en la biogénesis de miRNAs, lo que contribuye al desarrollo de la tumorigénesis (Lin & Gregory, 2015). Por último, la desregulación más tardía presente en el proceso de biogénesis de los miRNAs se encuentra a nivel del citoplasma en Dicer, este es considerado un gen supresor de tumores, lo que lleva a estimular el crecimiento tumoral y desarrollo de tumorigénesis al encontrarse regulado negativamente (Kumar et al., 2009).

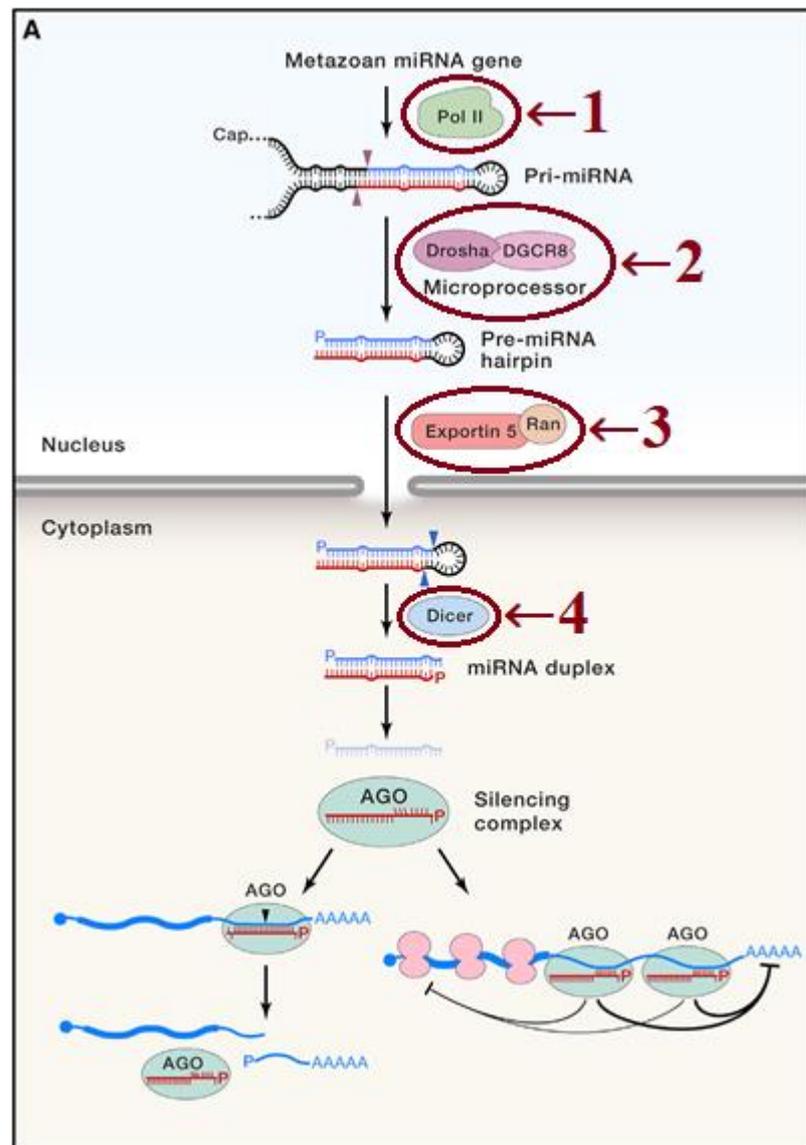


FIGURA 2.6: Niveles de desregulación de microRNAs Extraído y

modificado de Bartel, 2018.

Las desregulaciones de los miRNAs relacionadas a la biogénesis de éstos se encuentran en 4 niveles señalados con los números respectivos (1, 2, 3 y 4). El primer nivel (1) es en la transcripción de pri-miRNA causado por la RNA pol II, provocando el inicio y progresión del CCR (Zhang et al., 2006). El segundo nivel (2) es a la altura del microprocesador conformado por DROSHA y DGCR8. El aumento

en la expresión de DROSHA promueve la proliferación, migración e invasión celular en caso de tratarse de un OncomiR, si disminuye la expresión de DROSHA provoca alteraciones como metástasis, invasión y supervivencia celular (Muralidhar et al., 2011). Si la desregulación está presente en DGCR8, promueve la transformación celular y el crecimiento tumoral (Kumar et al., 2007). El tercer nivel (3) se encuentra en la exportina-5 que contribuye al desarrollo de la tumorigénesis (Lin & Gregory, 2015). El último nivel (4) se encuentra en Dicer, que al ser un supresor tumoral y disminuir su expresión provoca el crecimiento tumoral y desarrollo de la tumorigénesis (Kumar et al., 2009).

Dicho lo anterior, se pueden distinguir a grandes rasgos dos tipos de miRNAs que se alteran en procesos tumorales. Por un lado, se encuentran los miRNAs que actúan promoviendo indirectamente la proliferación y supervivencia celular, llamados OncomiR. Éstos promueven el desarrollo del tumor por la inhibición de genes supresores tumorales y genes que controlan la diferenciación celular o la apoptosis. Y, por otro lado, los miRNAs supresores de tumores que son responsables de detener el desarrollo del tumor inhibiendo a mRNAs de genes que promueven la proliferación y supervivencia celular (Saliminejad et al., 2019).

2.2.2 microRNAs en fluidos y desechos corporales

Los miRNAs se han reconocido en circulación sanguínea, heces y fluidos corporales como orina (Lu & Rothenberg, 2017), esto porque los miRNAs son liberados al medio extracelular donde son capaces de unirse a proteínas Argonautas, a lipoproteínas de alta densidad (HDL) (Saliminejad et al., 2019) o bien excretarse en vesículas extracelulares que comprenden tanto a exosomas como microvesículas, manteniéndose protegidos de la acción endógena de la RNAsa (Kosaka et al., 2010), pH bajo / alto, ciclos de congelación-descongelación, ebullición y almacenamiento a largo plazo (Ahmed et al., 2009; Hollis et al., 2015), lo que permite que su obtención y análisis sea simple, rápido y confiable. Como bien es sabido los niveles de ciertos miRNAs están alterados en muchas enfermedades, entre ellas el cáncer, por lo que hoy en día, estos microRNAs se consideran biomarcadores de enfermedades potencialmente útiles (Szelenberger et al., 2019).

La medición de microRNAs relacionados a CCR se ha estudiado en diversos tipos de muestras como plasma, suero (H. Wang et al., 2018) y heces (Duran-Sanchon et al., 2019), una de las cuantificaciones se realizó por medio de la obtención de miRNAs mediante vesículas extracelulares liberadas por células de carcinoma primario y metastásico, demostrando con una sensibilidad de 94,9% y especificidad de 100% que pueden ser útiles para predecir tumores de cáncer colorrectal en sus diferentes etapas (Chen et al., 2019). Además de la medición de miRNAs en sangre (suero, plasma o exosomas) como posible método diagnóstico de CCR, se evaluó la posibilidad de su extracción a partir de heces; esto porque su cuantificación en fecas cumple con ciertos criterios de aceptabilidad pues su obtención es fácil, no invasiva y confiable (Ahmed et al., 2013). Así como también

se ha evidenciado que los resultados obtenidos a partir de dicho método son comparables a los obtenidos por la colonoscopia (Ahmed et al., 2013) al reflejarse la liberación continua y abundante hacia la luz intestinal desde colonocitos del tejido colónico sano y/o canceroso a lo largo de la longitud total del colon y recto. Dichas células contienen miRNAs en su interior, los que se mantienen estables e intactos, permitiendo su aislamiento de manera pura para su medición (Ahmed et al., 2013; Ahmed et al., 2018), ya que ha sido posible eliminar interferentes como RNA de la microbiota comensal intestinal (Ahmed et al., 2013), consiguiendo resultados confiables y seguros.

Diversos estudios como el de Feng et al., 2020 y el de Di et al., 2020 han mostrado la participación de ciertos microRNAs como el miR-92a, miR-802, entre otros, en el desarrollo de la patología. Es por esto que actualmente se han realizado estudios en que se ha buscado validar las técnicas de cuantificación de microRNAs para el diagnóstico de CCR, desde muestras como deposiciones (Duran-Sanchon et al., 2019) y plasma (Ng et al., 2009), al contrastar los niveles de miRNAs encontrados en dichas muestras con los que se han encontrado en tejido colónico sano y canceroso; estas investigaciones han entregado resultados favorables frente al diagnóstico de esta patología. Por otra parte, en el estudio realizado por Duran-Sanchon et al., 2019 se evaluó la cuantificación de miRNAs en heces junto con la realización del test de detección de sangre oculta en deposiciones, obteniendo como resultado que las técnicas en conjunto identifican con mayor precisión a pacientes con CCR que el test de detección de sangre oculta en heces por sí solo. Por otro lado, Di et al., 2020 pudieron identificar y validar los nueve miRNAs más comunes presentes en el cáncer colorrectal a través de un algoritmo de eliminación de característica recursivas de máquina de vectores de soporte (SVM-REF) y la operación de selección y contracción menos absoluta (LASSO) (Qiu et al., 2017) como biomarcadores de diagnóstico potencialmente útiles en la clínica. La tasa de precisión general de estos en el modelo de diagnóstico fue de 0,94, 0,89 y 0,978. Demostrando que la medición de estas moléculas es útil como apoyo para un tamizaje y/o diagnóstico más certero de cáncer colorrectal.

Por lo mencionado anteriormente, los microRNAs emergen como una opción viable como biomarcadores diagnósticos para CCR (Hao & Ma, 2018) ya que pueden mantenerse estables en las muestras (Verdier et al., 2019) y es posible extraerlos de forma pura (Ahmed et al., 2013). Por lo demás, se ha visto que están relacionados no sólo con la existencia de tumores en etapa temprana sino también con la dinámica y el estado de los tumores en etapa avanzada, la recurrencia tumoral y la sensibilidad a los medicamentos (Mitchell et al., 2008; Fadaka et al., 2019), pues su desregulación causa pérdida de control de los procesos biológicos críticos (proliferación, diferenciación, apoptosis, EMT, migración) lo que conduce a la oncogénesis y otras patologías (Armand-Labit & Pradines, 2017). Otra razón para investigar sobre el uso de los miRNAs como biomarcadores diagnósticos de CCR surge debido a las dificultades, limitaciones y/o invasividad, además de su elevado costo que presentan los métodos existentes para el diagnóstico de esta patología (Dong et al., 2011).

CAPÍTULO 3: OBJETIVOS.

3.1 Obtejivo general

Analizar y estudiar la cuantificación de determinados miRNAs como posible método diagnóstico de CCR.

3.2 Objetivos específicos

Distinguir factores que inciden sobre la estandarización de la medición de miRNAs.

Analizar el comportamiento de miR-21, miR-200c, miR-92a, miR-135b, miR-802 como oncomiR o supresor tumoral en CCR.

Mencionar y describir los mecanismos de acción de miR-21, miR-200c, miR-92a, miR-135b, miR-802 en CCR.

CAPÍTULO 4: METODOLOGÍA

Esta revisión bibliográfica de tipo narrativa se realizó en el periodo entre Abril y Julio de 2020. Cabe destacar que se optó por no realizar un análisis estadístico, pues se consideró que no era favorable (Moreno et al., 2018) al carecer de datos de este tipo en algunos de los documentos utilizados. Los motores de búsqueda fueron PubMed, Elsevier, base de datos del Ministerio de Salud (MINSAL) de Chile y Scielo. Uno de los criterios de exclusión para los documentos fue el año de publicación, todos los que fueron publicados antes del 2016 se descartaron a excepción de aquellos que entregaban información sobre las bases moleculares del desarrollo del CCR, biogénesis y desregulación de microRNAs, se integraron a su vez aquellos que explican la función de dianas de los miRNAs y todo aquel que contuviera información fundamental para el desarrollo de la investigación. Complementario a esto, no se consideraron aquellos con idiomas distintos al inglés y español. Por último, se excluyeron investigaciones por título o resumen.

La recolección de información comenzó con las palabras cancer, colorectal cancer, CRC y colorectal. Luego se realizó la búsqueda del detalle de los síndromes familiares de cáncer colorrectal con la frase “colorectal cancer hereditary and sporadic” y “cáncer colorrectal hereditario”. Se acudió después a guías publicadas por el MINSAL para extraer los datos epidemiológicos del CCR en Chile y conocer las técnicas actuales que se utilizan para su diagnóstico en el país. Posteriormente se procedió a buscar por el diagnóstico como “colorectal cancer diagnostic” y las técnicas utilizadas para ello con las palabras “colonoscopia”, “colonoscopy” y “faecal occult blood”, por sugerencia también se buscó “colorectal cancer biomarkers” y “biomarkers”. Luego se indagó el origen de la tumorigénesis del CCR utilizando la palabra “Vogelstein” asociada a “colorectal cáncer” y “p53”

(Volgelstein colorectal cancer y Vogelstein p53), ajustando los años de búsqueda hasta el año 2000 para utilizar los archivos originales escritos por Vogelstein, para continuar con el análisis de los ítems tratados en los documentos integrados en este escrito. Los genes *APC* y *ras* fueron buscados como “*APC* gene” y “*ras* gene”. Las vías Wnt y TGF- β se investigaron por “Wnt signaling”, “via Wnt” y “TGF beta signaling colorectal cáncer”. Y los mecanismos mencionados fueron buscados con las palabras “colorectal cancer chromosomal instability and microsatellite instability”. Posteriormente, se investigó sobre los miRNAs, su biogénesis, desregulación, y su participación en el CCR con los términos “microRNA”, “miRNA”, “miRNA biogénesis”, “miRNA dysregulation”, “miRNA alteration biogénesis” y “miRNA colorectal cáncer”. Después de analizar la información recolectada de estas últimas búsquedas, se seleccionaron los 5 miRNAs descritos en los resultados.

Para los resultados obtenidos en este estudio, se buscó por cada uno de los 5 miRNA elegidos por separado (miR-21, miR-200c, miR-92a, miR-135b y miR-802) para obtener información sobre su presencia en distintas enfermedades. Seguidamente se les asoció a la búsqueda la patología abordada integrando el término colorectal cancer a cada uno de ellos, quedando finalmente como (mir-21) AND (colorectal cancer), (mir-200c) AND (colorectal cancer), (mir-92a) AND (colorectal cancer), (mir-135b) AND (colorectal cancer), (mir-802) AND (colorectal cancer). Para obtener más información sobre sus mRNAs diana se procedió a buscar por cada uno de ellos. La recopilación de información sobre la estandarización se fue realizando a medida que se analizaban las publicaciones que fueron surgiendo a lo largo de la investigación según los criterios de inclusión y exclusión ya mencionados.

El total de documentos utilizados en esta investigación fueron 180 (FIGURA 4.1).

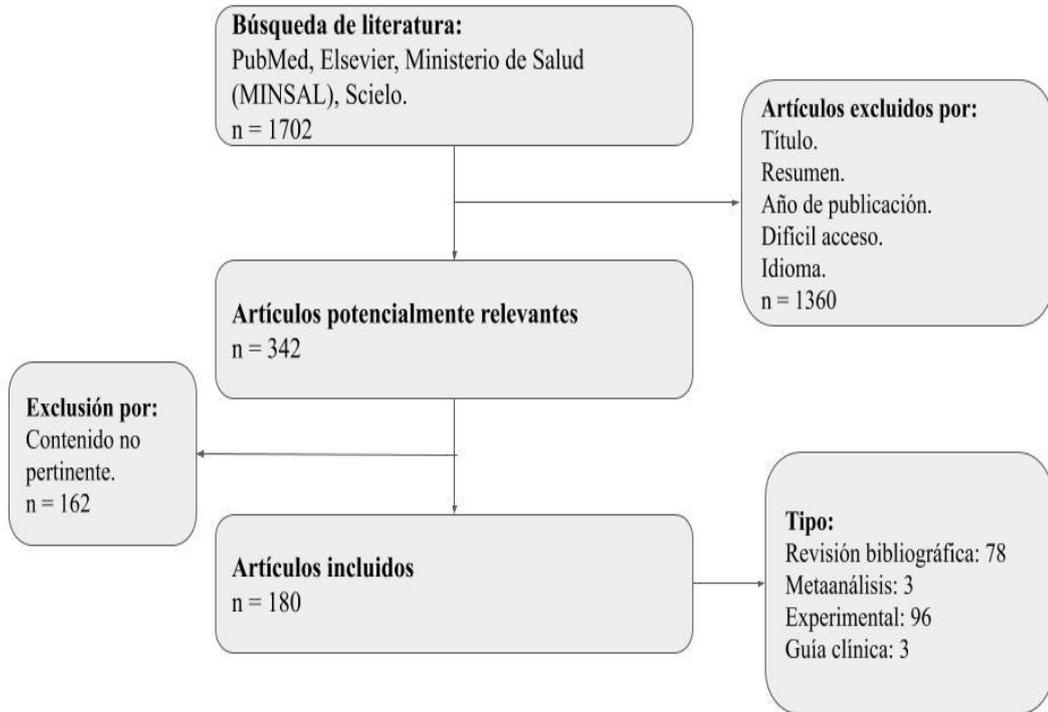


FIGURA 4.1: Diagrama de flujo de selección de estudios.

CAPÍTULO 5: RESULTADOS

En general, se ha objetivado que casi 300 miRNAs se encuentran alterados en las muestras de tejido colónico tumoral respecto a la mucosa normal (Rodríguez-Montes & Menéndez Sánchez, 2014). Sin embargo, los miRNAs más estudiados en CCR han sido principalmente miR-92a, miR-21, miR-135b (Ren et al., 2015) y miR-200c (Xuan et al., 2015). Además, dentro de las investigaciones más recientes ha surgido el miR-802 como posible opción para el cribado de CCR (Feng et al., 2020). Para realizar el cribado de miRNAs con la finalidad de diagnosticar CCR, se necesita un método de estandarización universal para su cuantificación, lo cual no existe actualmente, imposibilitando la comparación de resultados obtenidos entre investigaciones en las que se realiza la medición de estas moléculas (Ruiz-López et al., 2018). Dentro de los factores que influyen sobre esta estandarización (los que se resumen en la FIGURA 5.1) se encuentra primero la variación de los niveles de miRNAs que, si bien mantienen su estabilidad en las muestras, son excesivamente más elevados en suero en comparación al plasma. Esto se debe a que el proceso de coagulación produce una mayor liberación de estas moléculas (Wang et al., 2012); segundo, se debe contar con un control de calidad que sea específicamente dirigido a la técnica que se va a utilizar, pues cualquier variación dentro del procesamiento de la muestra para su posterior manipulación puede provocar un falso aumento en los niveles de miRNAs. Dentro de estos procedimientos se incluyen errores en procesos básicos comunes como exceso de centrifugación y/o variaciones en la filtración. También se deben considerar parámetros propios de la muestra, principalmente el recuento muy elevado de plaquetas (Cheng et al., 2013); y tercero, se debe estandarizar el proceso de extracción de RNA para no tener variaciones en las concentraciones de miRNAs que se relacionen con esta fase, la cual varía según cada

kit comercial (Monleau et al., 2014; Ren et al., 2015). Por otro lado, en cuanto a los exosomas, cabe recalcar que no existe un método universal para su aislamiento, purificación y cuantificación, lo que no permite que los resultados derivados de estudios en que estos se utilizan sean comparables entre sí (Ruiz-López et al., 2018).

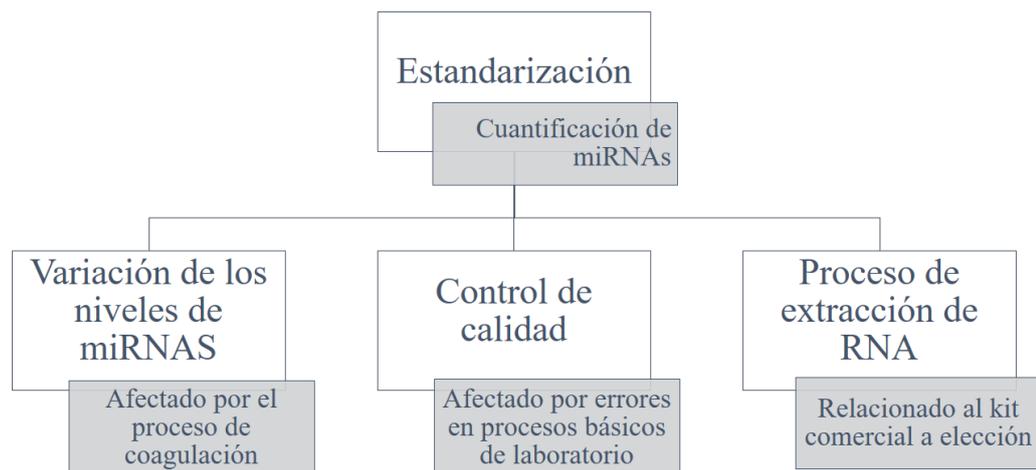


FIGURA 5.1: *Factores influyentes para la estandarización de la cuantificación de microRNAs.*

5.1 MicroRNA-21

Este miRNA se ha encontrado elevado en diversos tumores, dentro de los que se encuentran el cáncer gástrico, CCR, tumor mamario maligno y carcinoma pancreático (Yadav et al., 2016; Wang et al., 2015; Chen & Wang, 2014; Abue et al., 2015; Nagao et al., 2012; Xie et al., 2019). Es uno de los más estudiados dentro del CCR, está regulado de manera positiva y asociado a un mal pronóstico clínico en cuanto al desarrollo de la patología. Este miRNA se ha identificado con precisión en muestras sanguíneas de un 92% de los pacientes con CCR y hasta un 82% de los pacientes con pólipos colónicos avanzados (D'Ottavio et al., 2014). Uno de los estudios realizados para ver si este miRNA es válido para ser utilizado como posible biomarcador de CCR tuvo como objetivo medir las concentraciones de miR-21 exosómico. Se pudo demostrar que los niveles de expresión de miR-21 exosómico eran significativamente más altos en pacientes que padecían de la patología, además de notar un mayor aumento de este miRNA a medida que el cáncer se encontraba más avanzado (Tsukamoto et al., 2017). También se encontró elevado en exosomas provenientes de adenoma colónico, determinando que miR-21 puede diferenciar el adenoma de los controles sanos con una sensibilidad de 73,1% y especificidad del 68,1% (Uratani et al., 2016; Desmond et al., 2019). La medición de los niveles de expresión de este miRNA en suero y heces ha tenido una alta sensibilidad (86,05% para ambas muestras) y especificidad (72,97% en suero y 81,08% en heces), considerándose un potencial biomarcador diagnóstico para el CCR (Bastaminejad et al., 2017).

En un estudio realizado el año 2019, se demostró que la participación de TNF- α junto a TGF- β provocan un aumento en los niveles de expresión de miR-21

en el desarrollo del CCR, causando mayor invasión celular (Møller et al., 2019). Otro estudio enfocado en el mecanismo de acción de este miRNA sugiere que puede modular fenotipos malignos de CCR como la proliferación, evitar la apoptosis, ayudar a la progresión del ciclo celular y la invasión de células cancerosas (Hao & Ma, 2018). La evidencia acumulada señala que las respuestas inflamatorias pueden alterar la expresión de miRNAs de manera general (Yu et al., 2014; Tili et al., 2013), donde además se ha demostrado que miR-21 promueve la tumorigénesis colorrectal asociada a respuestas inflamatorias (Shi et al., 2014; Iliopoulos et al., 2010), lo que indica que podría tener un efecto sinérgico con la prostaglandina-endoperóxido sintasa (PTGS2). El uso de aspirina (inhibidor de la PTGS2) recurrente reduce el riesgo de padecer neoplasias colorrectales, disminuyendo la expresión de miR-21 (Mima et al., 2016). Se ha evidenciado a su vez que este miRNA está involucrado en la activación de las principales vías desreguladas en CCR como la vía Wnt, las vías de señalización MAPK y las vías de señalización TGF- β y p53 (Falzone et al., 2018), además se ha implicado en la iniciación del proceso de EMT (Wang et al., 2017; Desmond et al., 2019).

5.2 MicroRNA-200c

Diversas investigaciones se han realizado para explicar cómo miR-200c actúa en el desarrollo del cáncer colorrectal, los que han llegado a conclusiones contradictorias en las que se propone que este podría actuar como un Oncomir (Chen

et al., 2014; Liu et al., 2012) o como supresor de tumores (Hurteau et al., 2007; Korpál et al., 2008).

miR-200c se ha determinado como OncomiR al obtener resultados en que se ha visto un incremento de sus niveles en estadios avanzados de CCR en comparación a etapas tempranas, aumento que también se relacionó a la invasión linfovascular. Asociándose así con el grado tumoral y la supervivencia reducida en los pacientes (Roh et al., 2018).

La propuesta de que miR-200c actúa como supresor tumoral apareció primero a causa de los resultados de investigaciones que coinciden que este se encuentra disminuido en tejidos de colon canceroso al compararlo con tejido normal. Dicha propuesta se ha confirmado en análisis donde se han utilizado inhibidores de miR-200c en cultivos celulares de CCR, obteniendo como resultado la disminución de los niveles de apoptosis y mejora su capacidad invasiva (Karimi Dermani et al., 2017; Mazraehshah et al., 2018). A través del uso de la misma técnica es que se ha llegado a dilucidar los mecanismos mediante los cuales miR-200c ejercería su función de supresor tumoral. Una de las moléculas diana de este miRNA sería la región 3'UTR del mRNA de BMI1 (Mazraehshah et al., 2018), proteína que participa en la regulación de células madre, la EMT (Zhang et al., 2016) y el ciclo celular (Srinivasan et al., 2017). Otro blanco sería la kinesina KIF14 que es inhibida a nivel post-transcripcional; KIF14 está en altas concentraciones en células de cáncer colorrectal y se demostró que es capaz de promover la proliferación tumoral mediante la regulación de ciclo celular y activación de señalización de Akt (Z. Z. Wang et al., 2018). miR-200c también sería capaz de suprimir o revertir el proceso de EMT a través de marcadores como ZEB-1, vimentina y N-cadherina y la vía de β -catenina (Karimi Dermani et al., 2018), ya que al transfectar el supresor de miR-200c en células de carcinoma colorrectal se obtuvo como resultado una disminución en mRNA de E-cadherina, mejorando el nivel de vimentina y ZEB-1 a nivel de mRNA y proteína (Karimi Dermani et al., 2017) pudiendo mantener el fenotipo epitelial.

5.3 MicroRNA-92a

El microRNA-92a se ha visto desregulado al alza en su expresión en diferentes enfermedades como cáncer de pulmón de células no pequeñas (Lu et al., 2017; Xu et al., 2018), osteosarcoma (Jiang et al., 2017; Xiao et al., 2017), cáncer gástrico (Peng et al., 2018), cánceres de vejiga invasivos no musculares (Ingelmo-Torres et al., 2017), carcinoma nasofaríngeo (H. Zhang et al., 2016), cáncer colorrectal (Ke et al., 2015), entre otros (Y. Peng et al., 2019). Respecto a CCR se ha determinado que miR-92a se comporta como un Oncomir, siendo capaz de promover la proliferación y migración celular (Alcantara & Garcia, 2019; Wei et al., 2019). Esto se explica a través de sus diversos mecanismos de acción, como la regulación negativa del mRNA NF2 (Alcantara & Garcia, 2019), lo que causa la inhibición de la expresión de la proteína supresora de tumores Merlín (Petrilli & Fernández-Valle, 2016) y la proteína NF2, provocando así la resistencia a apoptosis, aumento en la proliferación celular y cambios en el citoesqueleto, otorgando así un fenotipo celular móvil (Alcantara & Garcia, 2019). Otra de las dianas de miR-92a es la región 3'-UTR del mRNA RECK mediante el cual reprime la expresión del gen supresor de metástasis tumoral RECK, promoviendo la invasión y migración celular (Wei et al., 2019). También se ha obtenido como resultado que miR-92a puede inhibir la activación de caspasa 3/7 (Alcantara & Garcia, 2019) y activar la señalización Wnt/ β -catenina, fomentando el desarrollo de CCR (G. J. Zhang et al., 2017).

Sobre la utilidad de miR-92a se ha probado que sirve en la detección temprana no invasiva de CCR, ya que con una sensibilidad de 76% y especificidad de 75% fue capaz de discriminar a personas sanas de pacientes con CCR (Q. Peng et al., 2019), por lo demás se ha planteado que al medirlo en heces y plasma junto al

miR-223 su sensibilidad aumenta a 96,7% pero no su especificidad, por lo que se sugiere que su cuantificación sea complementaria a otras técnicas de diagnóstico de CCR ya validadas, con el fin de evitar la realización de colonoscopias innecesarias (Chang et al., 2016).

5.4 MicroRNA-135b

Se ha observado un aumento significativo en los niveles de miR-135b en suero de pacientes con CCR, lo que sugiere que este microRNA funciona como promotor tumoral en esta patología al sobreexpresarse (Qin et al., 2018) y así provocar la progresión del cáncer, metástasis e invasión, además, se pudo comprobar que este miRNA es capaz de diferenciar etapas del crecimiento tumoral (Wu et al., 2014) como la presencia de adenomas, adenomas avanzados y CCR con una sensibilidad del 62%, 73% y 78% respectivamente (Wu et al., 2014; Ren et al., 2015). Un estudio realizado en tejido de cáncer de colon y en suero de pacientes con CCR pudo demostrar que la presencia de este microRNA en suero de pacientes con CCR se encuentra notoriamente aumentada, al igual que en su medición en tejido de biopsias de colon, mostrando una regulación positiva del miR-135b en ambos tipos de muestras y evidenciando que la medición de este microRNA oncogénico que está presente en las distintas etapas del CCR refleja con precisión su expresión tanto en suero como en tejido (Eslamizadeh et al., 2018).

Este microRNA oncogénico es capaz de inhibir la expresión del receptor sensor de calcio (CaSR), en especial en las primeras etapas de la tumorigénesis del CCR (Fetahu et al., 2015). Este CaSR es un supresor tumoral que media en gran parte las acciones antiproliferativas y pro diferenciadoras del calcio (Fetahu et al., 2014; Aggarwal et al., 2015). Numerosos estudios han demostrado que la expresión del CaSR se reduce o pierde totalmente durante la tumorigénesis colorrectal (Fetahu et al., 2014; Sheinin et al., 2000; Chakrabarty et al., 2003; Hizaki et al., 2011; Fetahu et al., 2015). Además, se comprobó que en tejido con CCR los niveles altos de miR-135b se correlacionan negativamente con la sialiltransferasa ST6GALNAC2, activando a su vez la vía de señalización PI3K / AKT (Liu et al., 2017). Esta sialiltransferasa incide en la metástasis de tumores de varios tipos de cáncer como el de mama (Murugaesu et al., 2014; Ferrer & Reginato, 2014), cerebro (Colangelo et al., 2013) y pulmón (Venkitachalam & Guda, 2016), mientras que la vía de señalización PI3K / AKT está implicada en la proliferación de la tumorigénesis, crecimiento tumoral y angiogénesis (Bellacosa et al., 2005; Engelman et al., 2006; Jia et al., 2017). Otro mecanismo de acción de este miRNA se encontró relacionado a FOXO1, supresor tumoral que se ha reportado en múltiples cánceres (Zhang et al., 2015; Yu et al., 2014) que tiene un sitio de unión putativo emparejado con miR-135b en su región 3'UTR. Los niveles de FOXO1 son regulados negativamente por este microRNA, lo que demuestra que la presencia de miR-135b se correlaciona con la presencia de CCR y un mal pronóstico clínico (Qin et al., 2018).

5.5 MicroRNA-802

Feng et al., 2020 y Wang et al., 2020, han sido los primeros en generar resultados sobre miR-802 y su implicancia en el desarrollo de cáncer colorrectal.

En ambos estudios se demostró que mir-802 se encontraba disminuido en tejidos de cáncer colorrectal a diferencia de tejidos adyacentes, además se evidenció que el nivel de este era mayor en etapas tempranas de CCR en comparación a los estadios más avanzados, sugiriendo que podría utilizarse para discriminar entre las fases de CCR. A su vez comprobaron que este miRNA actuaría como un supresor tumoral al unirse a la región 3'UTR del mRNA de RAN, proteína a la cual se asoció una mayor mortalidad en aquellos pacientes con altas concentraciones de ella, ya que promueve la proliferación y metástasis del cáncer colorrectal (Feng et al., 2020; Wang et al., 2020).

En base a los resultados más relevantes obtenidos se presenta la TABLA 5.1. En el caso excepcional de miR-200c los datos incluídos en la tabla corresponden a resultados originados de estudios realizados en cultivos celulares.

TABLA 5.1: *Resumen de resultados*

microRNA	miR-21	miR-200c	miR-92a	miR-135b	miR-802
----------	--------	----------	---------	----------	---------

Expresión	Aumentada (Xie et al., 2019)	Aumentada (Roh et al., 2018)	Aumentada (Ke et al., 2015)	Aumentada (Qin et al., 2018)	Disminuida (Feng et al., 2020; Wang et al., 2020)
Diana	Vía Wnt (Falzone et al., 2018) Vías MAPK (Falzone et al., 2018) Vía de TGF-β (Falzone et al., 2018) Vía de p53 (Falzone et al., 2018)	mRNA BMI1 (Mazraehshah et al., 2018) KIF14 (Z. Z. Wang et al., 2018) mRNA E-cadherina (Karimi Dermani et al., 2017)	mRNA NF2 (Alcantara & Garcia, 2019) mRNA RECK (Wei et al., 2019) Wnt / β-catenina (G. J. Zhang et al., 2017) Caspasa 3/7 (Alcantara & Garcia, 2019)	CaSR (Fetahu et al., 2015) mRNA FOXO1 (Qin et al., 2018) ST6GALNAC2 (Liu et al., 2017)	mRNA RAN (Feng et al., 2020; Wang et al., 2020)
Sensibilidad	73,1% (Uratani et al., 2016; Desmond et al., 2019)		76% (Q. Peng et al., 2019)	62% adenomas (Wu et al., 2014; Ren et al., 2015) 73% adenomas avanzados (Wu et al., 2014; Ren et al., 2015) 78% CCR (Wu et al., 2014; Ren et al., 2015)	
Especificidad	68,1% (Uratani et al., 2016; Desmond et al., 2019)		75% (Q. Peng et al., 2019)		
Tipo de muestra	Suero (Bastaminejad et al., 2017) Heces (Bastaminejad et al., 2017)	Cultivo celular (Karimi Dermani et al., 2017; Mazraehshah et al., 2018)	Plasma (Chang et al., 2016) Heces (Chang et al., 2016)	Suero (Qin et al., 2018) Tejido de biopsia de colon (Eslamizadeh et al., 2018)	Tejido de CCR (Feng et al., 2020; Wang et al., 2020)
Utilidad clínica en CCR	Detección temprana y tardía (Tsukamoto et al., 2017)	Detección temprana y tardía (Roh et al., 2018)	Detección temprana (Q. Peng et al., 2019)	Diferenciar etapas (Wu et al., 2014)	Diferenciar etapas (Feng et al., 2020; Wang et al., 2020)

CAPÍTULO 6: DISCUSIÓN

En Chile, durante estos últimos años la mortalidad por CCR ha incrementado (Ministerio de Salud, 2019) y la mayor prevalencia de esta enfermedad se ha observado en personas mayores de 65 años, quienes conforman el 60% de los casos (Ministerio de Salud, 2018; Nuñez, 2017), aunque se ha evidenciado a lo largo de todo el mundo el aumento en la incidencia de esta patología en pacientes menores de 45 años, quienes presentan tumores histológicamente más agresivos y avanzados en comparación a pacientes de mayor edad, lo cual se podría explicar debido al retraso en el diagnóstico (Weinberg et al. 2017), a los cambios de hábitos alimenticios y estilo de vida (Qin et al., 2018). Cabe destacar que los pacientes diagnosticados con esta patología tienen una supervivencia general de 5 años (Yang et al., 2019), lo cual es bastante bajo.

Los métodos que existen y se utilizan actualmente para el diagnóstico de CCR cuentan con diversas limitaciones. Una de ellas ocurre en el examen de detección de sangre en heces que puede no entregar resultados lo suficientemente confiables (Kościelniak-Merak et al., 2018). Por otro lado, la colonoscopia a pesar de sus beneficios se suele realizar en etapas avanzadas dado que la sintomatología es inespecífica y además puede no ser completamente aceptada, principalmente por su invasividad y/o su alto costo, lo que limita finalmente su realización (Díaz-Tasende, 2018; Moreno et al., 2016), donde se debe considerar de igual manera la edad del paciente, ya que personas de edad avanzada son quienes cuentan con un mayor riesgo de cursar complicaciones secundarias a la realización de este examen como por ejemplo la perforación intestinal, hemorragia y/o alteración de la frecuencia cardíaca, siendo estos pacientes los que tienen mayor riesgo de padecer cáncer

colorrectal (Kim et al., 2019; Rutherford & Calderwood, 2018). Esto en conjunto repercute de manera negativa sobre la posibilidad de diagnosticar el CCR en etapas tempranas para que el paciente pueda acceder a un tratamiento de manera oportuna y con más posibilidad de éxito. Es por ello que se requiere de nuevas modalidades para la detección temprana de este tipo de cáncer (Arasaradnam et al., 2018; Vuik et al., 2019; Chandrapalan & Arasaradnam, 2020), que sean capaces de identificar la presencia de CCR de manera rápida y precisa sin ser un método demasiado invasivo (Cojocneanu et al., 2020) y que, a su vez, sean accesibles para el paciente en cuanto a costos. Esto ha incrementado el interés por la búsqueda de biomarcadores diagnósticos de CCR en fluidos corporales (Chandrapalan & Arasaradnam, 2020) como por ejemplo en circulación sanguínea, saliva y heces donde se han podido identificar miRNAs (Lu & Rothenberg, 2017), los que han sido foco de investigación por la capacidad que tienen para mantener su estabilidad en los distintos tipos de muestras (Verdier et al., 2019), permitiendo su obtención y análisis de manera simple, rápida y confiable, pues se ha demostrado con una sensibilidad de 94,9% y especificidad de 100% que pueden ser útiles para predecir tumores de cáncer colorrectal en sus diferentes etapas (Chen et al., 2019).

La investigación realizada sobre estos miRNAs nos entregó diversos resultados, los que se pueden observar en la tabla resumen (TABLA 5.1) basada en nuestro estudio.

Uno de los microRNAs analizados fue miR-21, el cual se ha observado como un OncomiR en muestras de CCR con niveles de expresión elevados que permitirían la detección temprana de esta patología, con una sensibilidad de 73,1% y especificidad de 68,1% (Uratani et al., 2016; Desmond et al., 2019); el mecanismo de acción sería la explicación de la posible utilización de este miRNA para el diagnóstico temprano de CCR, debido a su interacción con el gen *APC* (Falzone et al., 2018) actuando así sobre la vía Wnt (TABLA 5.1), la cual es una de las primeras vías de señalización que se desregulan en CCR (Walther et al., 2009). Existen estudios

que ratifican un aumento en las concentraciones de miR-21 previo al desarrollo de CCR, donde existía un incremento de 2,68 veces de dicho miR con respecto a células control sanas (Kundaktepe et al., 2020). La obtención de este miRNA a partir de muestras como suero, heces (Bastaminejad et al., 2017) y vesículas extracelulares como exosomas (Desmond et al., 2019) ha entregado pistas sobre su uso como potente biomarcador diagnóstico de CCR debido a su sensibilidad y especificidad. Sin embargo, en otro estudio (Montagnana et al., 2016) no se pudieron observar diferencias significativas en los niveles plasmáticos de miR-21 entre pacientes con CCR o pólipos benignos, ni entre pacientes en etapas avanzadas y tempranas de esta patología. Los resultados obtenidos no mostraron aumento de miR-21 en plasma en la secuencia de adenoma-carcinoma-carcinoma avanzado. A causa de esto, la medición en plasma de la concentración de miR-21 no parece ser una opción útil para diagnosticar las distintas etapas del CCR ni discriminar entre otras patologías relacionadas (Montagnana et al., 2016).

De la misma manera, el OncomiR miR-92a sería útil en el diagnóstico temprano de CCR, al tener como a una de sus dianas la vía Wnt/ β -catenina, para ello cuenta con una sensibilidad de 76% y especificidad de 75% (TABLA 5.1). Existen estudios en los que se propone complementar la medición en heces de miR-21 con la de miR-92a, adicionando a esto otras pruebas ya establecidas para el diagnóstico de esta patología, para lograr así un diagnóstico más preciso de CCR (Yau et al., 2019). La cuantificación de estos dos miRNAs es útil además para discriminar entre CCR y otras enfermedades como síndrome de intestino irritable y colitis ulcerosa en muestras de plasma de pacientes con estas enfermedades, que tuvieron una sensibilidad de 93,5% para miR-21 y 83,9% para miR-92a y una especificidad del 100% para ambos (Hassan et al., 2020). Por ende, miR-21 y miR-92a podrían emplearse en conjunto para la discriminación entre pacientes con CCR y pacientes con colitis ulcerosa o intestino irritable; así como también podrían ser apropiados para realizar un diagnóstico temprano de CCR junto a técnicas de detección ya estandarizadas.

Por otro lado, a pesar de que miR-135b es un microRNA ampliamente estudiado en CCR, no se pudo encontrar mucha información actualizada que indique su posible uso diagnóstico. Sin embargo, se destaca que en investigaciones anteriores ha surgido como resultado una posible detección de diferentes estadios de CCR mediante su cuantificación, teniendo una mayor sensibilidad en etapas tardías por sobre las tempranas (TABLA 5.1). En un estudio donde se realizó la medición de este miRNA junto a miR-21 y miR-92a en suero, exosomas y tejido de pacientes con adenoma colónico, se llegó a la conclusión que los 3 miRNAs serían biomarcadores de diagnóstico no invasivos para identificar lesiones premalignas, ya que aumentaron su concentración en el tejido de manera gradual a medida que se iba desarrollando la enfermedad, relacionando su expresión al tamaño y número de adenomas. No obstante, dentro de la misma investigación no pudieron medirse los niveles de miR-135b en suero debido a que su concentración no era suficiente, quedando la opción de cuantificar miR-21 y miR-92a en ese tipo de muestra, diferente a lo que ocurrió con el análisis de exosomas provenientes del tejido canceroso en que sólo miR-21 fue capaz de discriminar a pacientes con adenomas de alto riesgo con una sensibilidad del 69,8% y una especificidad del 80,0% (Uratani et al., 2016). En contraste al hallazgo de la escasa concentración de miR-135b en suero, en el estudio de Eslamizadeh et al., 2018 se llega a una conclusión distinta, en donde los niveles de este miRNA se ven aumentados significativamente en suero de pacientes con CCR en distintas etapas (Eslamizadeh et al., 2018).

En cuanto a miR-200c, este es un microRNA del cual pudimos observar un comportamiento dual dentro de su rol en el CCR, ya que en muchos estudios lo categorizan como un supresor de tumores, mientras que en otros como un OncomiR. Es importante enfatizar que en los estudios donde se concluye que esta molécula actúa como supresor tumoral, los experimentos fueron realizados en cultivos celulares y no en células propias de tejido de pacientes con CCR. Resultados que se contrastan con el análisis de la concentración de microRNAs en exosomas

provenientes de cultivos celulares de carcinoma primario y metástasis de cáncer colorrectal, donde se observó un aumento significativo de 4 miRNAs dentro de los cuales se encontraba miR-200c y miR-92a (Chen et al., 2019). Por esto, es crucial tener en consideración las condiciones en las que se realizan los experimentos al momento de analizar los resultados obtenidos en las distintas investigaciones sobre miR-200c. Esto puede ser probablemente una de las razones del por qué no pudimos tener conocimiento sobre su sensibilidad y especificidad como biomarcador de CCR.

Por último, miR-802 si bien ha sido poco estudiado en CCR y sólo se ha cuantificado en tejido, se podría considerar como un prometedor biomarcador temprano e indicador de progresión del mismo, ya que su desregulación se incrementa a medida que progresa la enfermedad, lo cual es posible pesquisar desde etapas tempranas de esta patología, (Feng et al., 2020; Wang et al., 2020).

En base a lo anterior es que podemos decir que estos microRNAs cuentan con ciertas ventajas por sobre ACE, ya que como se citó de manera previa, la desregulación y aumento en la concentración de la mayoría de los miRNAs que investigamos ocurre en etapas tempranas de CCR y a través de ellos ha sido posible discriminar entre las distintas etapas de esta patología. Por lo que la utilización de estos miRNAs como biomarcadores diagnósticos serían una buena opción para complementar los métodos actuales para ello, tal como fue planteado por Yau et al., 2019 a causa de la especificidad que poseen y por la desregulación de miR-21 y miR-92a que cursan en diversas enfermedades además de CCR, de igual forma que ocurre con ACE (Lech et al., 2016). Pero, como se mencionó, no existe un método universal estandarizado para la medición de miRNAs, lo que no permite que los resultados obtenidos en diversos estudios sean comparables y reproducibles entre sí (Ruiz-López et al., 2018). Dentro de las variaciones en los distintos métodos utilizados para estos estudios, se incluyen el tipo de muestra, control de calidad y extracción de material genético (RNA) (Ren et al., 2015) Por esta razón es que, si bien el uso de miRNAs puede ser beneficioso como biomarcador, el proceso de integración como

nuevo método diagnóstico para CCR es un camino largo y debe ser lo más riguroso posible tanto en la manipulación de la muestra como en la fabricación de kits comerciales específicos para su detección, con el fin de evitar cualquier falso positivo y permitir la comparación de resultados entre investigaciones. Siendo estas quizás las causas por las que durante el desarrollo de esta investigación no se generaron resultados sobre miRNAs validados como método diagnóstico de CCR, aun cuando existe otro grupo de microRNAs que han sido validados bioinformáticamente, los que están a la espera de verificar su viabilidad a través de futuros experimentos similares (Yang et al., 2019).

Sobre las restricciones ocurridas durante este estudio de microRNAs, los primeros resultados que fueron incluidos en este documento no figuraban dentro de los años de búsqueda pertinentes, aplicado en los criterios de exclusión debiendo considerarse sólo información publicada en los últimos 5 años, por lo tanto, la evidencia recopilada para todos los miRNAs seleccionados a excepción de miR-802 era bastante antes de considerar dicho criterio, motivo por el cual fueron escogidos para el análisis miR-21, miR-200c, miR-92a, y miR-135b. Una vez ajustados los años de búsqueda, las publicaciones que describían dianas, mecanismos de acción o el rol de miR-135b en cáncer colorrectal eran escasas, lo que redujo considerablemente la evidencia actual para presentar sobre esta molécula, limitando esta investigación. En cuanto a la relación de miR-802 y la patología abordada, las únicas dos publicaciones existentes son del presente año (2020), en ambas investigaciones se obtuvieron resultados similares basandose solo en la medición de dicho miRNA en tejido de cáncer de colon, donde promete ser un potencial biomarcador de CCR, razón por la cual se propuso esta molécula para su estudio en esta investigación a pesar de la carente información que demuestra su actividad en CCR.

CAPÍTULO 7: CONCLUSIÓN

Frente a la evidencia recaudada en esta investigación, es necesaria la búsqueda de nuevas técnicas para el diagnóstico de CCR que sean capaces de entregar resultados confiables y oportunos con la finalidad de aumentar la expectativa de vida de quienes padecen esta enfermedad. A su vez, es imprescindible que la invasividad de estas técnicas sea baja o nula para el paciente. Teniendo en cuenta las condiciones recién mencionadas, los microRNAs son una alternativa viable pues cuentan con características propias de un biomarcador como, por ejemplo, el ser medible en fluidos biológicos y/o tejidos sin que la obtención de la muestra sea demasiado invasiva y sin perder su estabilidad en ella. Además, han sido capaces de detectar CCR tempranamente, discriminar entre sus diferentes etapas y otras patologías intestinales, como colitis ulcerosa, tal como ocurre con miR-21, miR-92a y miR-135b.

De los 5 miRNAs estudiados, sólo miR-21 y miR-92a podrían ser realmente biomarcadores para el diagnóstico de CCR basándonos en los resultados obtenidos en esta investigación, donde se evidenció que estos cuentan con una sensibilidad similar (73.1% - 76% respectivamente) y que pueden ser medidos ambos en muestras de heces y sangre que son menos invasivas que la colonoscopia. Sin embargo, éstos se han visto desregulados igualmente en otras enfermedades, lo que afecta su especificidad pudiendo provocar posibles falsos positivos, por lo que no podrían ser utilizados por sí solos como única técnica para la detección de CCR.

En el caso de miR-135b, a causa de su información poco actualizada que limitó esta investigación, no podemos discernir de forma certera su uso como biomarcador, por consiguiente, se sugiere seguir estudiando este miRNA para tener evidencia sólida sobre su utilidad clínica, ya que, los documentos existentes, si bien son antiguos arrojaron en su mayoría resultados positivos en cuanto a su utilidad para diferenciar las distintas etapas de cáncer colorrectal (sensibilidad de 62% en adenomas, 73% en adenomas avanzados y 78% en CCR), al poder ser cuantificado tanto en tejido como en suero, entregando resultados equiparables por lo que la medición de este miRNA en suero podría ser suficiente para detectar CCR.

En cuanto a los estudios sobre miR-802, estos han generado resultados positivos a pesar de la escasa evidencia existente hasta la fecha sobre esta molécula, por esto es que lo observamos como un promisorio biomarcador para el diagnóstico temprano de CCR. No obstante, se sugiere seguir investigando su actividad dentro del desarrollo de esta enfermedad, considerando su medición en distintos tipos de muestra en que su obtención no sea tan invasiva como, por ejemplo, sangre y heces, puesto que los estudios actuales fueron realizados solo en tejido de cáncer colorrectal.

Opuesto a todo lo mencionado anteriormente, miR-200c a pesar de ser ampliamente estudiado (principalmente en cultivos celulares) no se han presentado datos concluyentes relacionados a su utilización en la detección de CCR que indiquen su sensibilidad ni especificidad. Además, de generar resultados contradictorios sobre su rol en CCR. Es por esto que consideramos que este miRNA no es un buen candidato como posible biomarcador para la detección de esta patología.

En definitiva, se precisa que las futuras investigaciones empíricas sobre este tema contemplen incluir la medición de microRNAs en conjunto a otras técnicas

poco invasivas ya establecidas para el diagnóstico de CCR y así evaluar si existe una posible sinergia entre ambos métodos, con el objetivo de disminuir la realización de colonoscopias innecesarias. Para esto, también es fundamental la búsqueda de una colección de microRNAs que sean específicos para el diagnóstico de CCR y de esta manera evitar resultados alterados por otras enfermedades distintas a esta patología que puedan estar afectando al paciente y, a su vez, cuenten con una especificidad y sensibilidad mayor a las ya reportadas. Para lograr este fin, es necesario que las técnicas sean reproducibles y comparables entre sí mediante la estandarización correspondiente, que proponemos considere los factores y estado fisiológico del paciente que pueden incidir en la concentración de miRNAs en los diferentes tipos de muestra para determinar cual es la más apropiada para realizar la medición de estas moléculas, así como también tener en cuenta la obtención de la muestra, su procesamiento, el método que se utilizará para la extracción de RNA y kit comercial.

CAPÍTULO 8: REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abue, M., Yokoyama, M., Shibuya, R., Tamai, K., Yamaguchi, K., Sato, I., Tanaka, N., Hamada, S., Shimosegawa, T., Sugamura, K., & Satoh, K. (2015). Circulating miR-483-3p and miR-21 is highly expressed in plasma of pancreatic cancer. *International Journal of Oncology*, 46(2), 539–547. <https://doi.org/10.3892/ijo.2014.2743>

Aggarwal, A., Prinz-Wohlgenannt, M., Te, S., Höbaus, J., Boudot, C., Mentaverri, R., Brown, E. M., Baumgartner-Parzer, S., & Kállay, E. (2015). The calcium-sensing receptor: A promising target for prevention of colorectal cancer. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(9), 2158–2167. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.02.011>

Ahmed, F. E., Ahmed, N. C., Gouda, M. M., Vos, P. W., & Bonnerup, C. (2018). RT-qPCR for Fecal Mature MicroRNA Quantification and Validation. *Echocardiography Board Review*, 1765, 203–215. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7765-9_13

Ahmed, F. E., Ahmed, N. C., Vos, P. W., Bonnerup, C., Atkins, J. N., Casey, M., Nuovo, G. J., Naziri, W., Wiley, J. E., Mota, H., & Allison, R. R. (2013). Diagnostic MicroRNA markers to screen for sporadic human colon cancer in stool: I. Proof of principle. *Cancer Genomics and Proteomics*, 10(3), 93–113.

Ahmed, F. E., Vos, P. W., Jeffries, C., Wiley, J. E., Weidner, D. A., Mota, H., Bonnerup, C., Sibata, C., & Allison, R. O. N. R. (2009). Differences in mRNA and microRNA Microarray Expression Profiles in Human Colon Adenocarcinoma HT-29 Cells Treated with either Intensity-modulated Radiation Therapy (IMRT), or Conventional Radiation Therapy (RT). *Cancer Genomics and Proteomics*, 6(2), 109–127.

Alcantara, K. M. M., & Garcia, R. L. (2019). MicroRNA-92a promotes cell proliferation, migration and survival by directly targeting the tumor suppressor gene NF2 in colorectal and lung cancer cells. *Oncology Reports*, 41(4), 2103–2116. <https://doi.org/10.3892/or.2019.7020>

Arasaradnam, R. P., Brown, S., Forbes, A., Fox, M. R., Hungin, P., Kelman, L., Major, G., O'Connor, M., Sanders, D. S., Sinha, R., Smith, S. C., Thomas, P., & Walters, J. R. F. (2018). Guidelines for the investigation of chronic diarrhoea in adults: British Society of Gastroenterology, 3rd edition. *Gut*, 67(8), 1380–1399. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-315909>

Armand-Labit, V., & Pradines, A. (2017). Circulating cell-free microRNAs as clinical cancer biomarkers. *Biomolecular Concepts*, 8(2), 61–81. <https://doi.org/10.1515/bmc-2017-0002>

Bailey, K. L., Agarwal, E., Chowdhury, S., Luo, J., Brattain, M. G., Black, J. D., & Wang, J. (2017). TGF β /Smad3 regulates proliferation and apoptosis through IRS-1 inhibition in colon cancer cells. *PLOS ONE*, 12(4), 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176096>

Baker, S. J., Fearon, E. R., Nigro, J. M., Hamilton, S. R., Preisinger, A. C., Jessup, J. M., VanTuinen, P., Ledbetter, D. H., Barker, D. F., Nakamura, Y., White, R., & Vogelstein, B. (1989). Chromosome 17 Deletions and p53 Gene Mutations in Colorectal Carcinomas. *Science*, 244, 217–221. <https://doi.org/10.1126/science.2649981>

Bartel, D. P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell*, 173(1), 20–51. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.006>

Bastaminejad, S., Taherikalani, M., Ghanbari, R., Akbari, A., Shabab, N., & Saidijam, M. (2017). Investigation of MicroRNA-21 Expression Levels in Serum and Stool as a Potential Non-Invasive Biomarker for Diagnosis of Colorectal Cancer. *Iranian Biomedical Journal*, 21(2), 106–113. <https://doi.org/10.18869/acadpub.ibj.21.2.106>

Bellacosa, A., Kumar, C. C., Cristofano, A. Di, & Testa, J. R. (2005). Activation of AKT kinases in cancer: Implications for therapeutic targeting. *Advances in Cancer Research*, 94, 29–86. [https://doi.org/10.1016/S0065-230X\(05\)94002-5](https://doi.org/10.1016/S0065-230X(05)94002-5)

Bohnsack, M. T., Czaplinski, K., & Görlich, D. (2004). Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10(2), 185–191. <https://doi.org/10.1261/rna.5167604>

Boland, C. R., Thibodeau, S. N., Hamilton, S. R., Sidransky, D., Eshleman, J. R., Burt, R. W., Meltzer, S. J., Rodriguez-Bigas, M. A., Fodde, R., Ranzani, G. N., & Srivastava, S. (1998). A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for Cancer Detection and Familial Predisposition: Development of

International Criteria for the Determination of Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Cancer Research*, 59(1), 5248–5257

Boland, P. M., Yurgelun, M. B., & Boland, C. R. (2018). Recent Progress in Lynch Syndrome and Other Familial Colorectal Cancer Syndromes. *Physiology & Behavior*, 68(3), 217–231. <https://doi.org/10.3322/caac.21448>

Brenner, A. T., Ko, L. K., Janz, N., Gupta, S., & Inadomi, J. (2015). Race/Ethnicity and Primary Language: Health Beliefs about Colorectal Cancer Screening in a Diverse, Low-Income Population. *J Health Care Poor Underserved*, 26(3), 824–838. <https://doi.org/10.1353/hpu.2015.0075>

Cai, H., Yuan, Y., Hao, Y. F., Guo, T. K., Wei, X., & Zhang, Y. M. (2013). Plasma microRNAs serve as novel potential biomarkers for early detection of gastric cancer. *Medical Oncology*, 30(1), 452. <https://doi.org/10.1007/s12032-012-0452-0>

Cai, X., Hagedorn, C. H., & Cullen, B. R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *Rna*, 10(12), 1957–1966. <https://doi.org/10.1261/rna.7135204>

Califf, R. M. (2018). Biomarker definitions and their applications. *Experimental Biology and Medicine*, 243(3), 213–221. <https://doi.org/10.1177/1535370217750088>

Cancer, C., & Disparities, H. (2016). Colorectal Cancer Health Disparities and the Role of US Law and Health Policy. *Gastroenterology*, 150(5), 1052–1055. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.03.012>.

Chakrabarty, S., Radjendirane, V., Appelman, H., & Varani, J. (2003). Extracellular calcium and calcium sensing receptor function in human colon carcinomas: Promotion of E-cadherin expression and suppression of β -catenin/TCF activation. *Cancer Research*, 63(1), 67–71.

Chandrapalan, S., & Arasaradnam, R. P. (2020). Urine as a biological modality for colorectal cancer detection. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 20(5), 489–496. <https://doi.org/10.1080/14737159.2020.1738928>

Chang, P. Y., Chen, C. C., Chang, Y. S., Tsai, W. S., You, J. F., Lin, G. P., Chen, T. W., Chen, J. S., & Chan, E. C. (2016). MicroRNA-223 and microRNA-92a in stool and plasma samples act as complementary biomarkers to increase colorectal cancer detection. *Oncotarget*, 7(9), 10663–10675. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7119>

Chen, J., & Wang, X. (2014). MicroRNA-21 in breast cancer: Diagnostic and prognostic potential. *Clinical and Translational Oncology*, 16(3), 225–233. <https://doi.org/10.1007/s12094-013-1132-z>

Chen, M., Xu, R., Rai, A., Suwakulsiri, W., Izumikawa, K., Ishikawa, H., Greening, D. W., Takahashi, N., & Simpson, R. J. (2019). Distinct shed microvesicle and exosome microRNA signatures reveal diagnostic markers for colorectal cancer. *PLoS ONE*, 14(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210003>

Cheng, H. H., Yi, H. S., Kim, Y., Kroh, E. M., Chien, J. W., Eaton, K. D., Goodman, M. T., Tait, J. F., Tewari, M., & Pritchard, C. C. (2013). Plasma

Processing Conditions Substantially Influence Circulating microRNA Biomarker Levels. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064795>

Cho, E. S., Kang, H. E., Kim, N. H., & Yook, J. I. (2019). Therapeutic implications of cancer epithelial-mesenchymal transition (EMT). *Archives of Pharmacal Research*, 42(1), 14–24. <https://doi.org/10.1007/s12272-018-01108-7>

Cojocneanu, R., Braicu, C., Raduly, L., Jurj, A., Zanoaga, O., Magdo, L., Irimie, A., Muresan, M. S., Ionescu, C., Grigorescu, M., & Berindan-Neagoe, I. (2020). Plasma and tissue specific miRNA expression pattern and functional analysis associated to colorectal cancer patients. *Cancers*, 12(4), 843. <https://doi.org/10.3390/cancers12040843>

Colangelo, T., Fucci, A., Votino, C., Sabatino, L., Pancione, M., Laudanna, C., Binaschi, M., Bigioni, M., Alberto Maggi, C., Parente, D., Forte, N., & Colantuoni, V. (2013). MicroRNA-130b promotes tumor development and is associated with poor prognosis in colorectal Cancer. *Neoplasia (United States)*, 15(9), 1086–1099. <https://doi.org/10.1593/neo.13998>

Courchoud, I. T., & Calvo, J. I. P. (2016). Biomarcadores y práctica clínica. *An. Sist. Sanit. Navar*, 39(1), 10–13. <https://doi.org/10.4321/S1137-6627/2016000100001>

Das, V., Kalita, J., & Pal, M. (2016). Predictive and prognostic biomarkers in colorectal cancer: A systematic review of recent advances and challenges. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 87, 8–19. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.064>

Desmond, B. J., Dennett, E. R., & Danielson, K. M. (2019). Circulating extracellular vesicle microRNA as diagnostic biomarkers in early colorectal cancer—A review. *Cancers*, 12(1), 52. <https://doi.org/10.3390/cancers12010052>

Díaz-Tasende, J. (2018). Cribado del cáncer colorrectal y supervivencia. *The Spanish Journal of Gastroenterology*, 10(11), 681–683. <https://doi.org/10.17235/reed.2018.5870/2018>

Di, Z., Di, M., Fu, W., Tang, Q., Liu, Y., Lei, P., Gu, X., Liu, T., & Sun, M. (2020). Integrated Analysis Identifies a Nine-microRNA Signature Biomarker for Diagnosis and Prognosis in Colorectal Cancer. *Frontiers in Genetics*, 11, 192. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00192>

Domingo, J. L., & Nadal, M. (2017). Carcinogenicity of consumption of red meat and processed meat: A review of scientific news since the IARC decision. *Food and Chemical Toxicology*, 105, 256–261. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.04.028>

Dong, Y., Wu, W. K. K., Wu, C. W., Sung, J. J. Y., Yu, J., & Ng, S. S. M. (2011). MicroRNA dysregulation in colorectal cancer: A clinical perspective. *British Journal of Cancer*, 104(6), 893–898. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.57>

D'Ottavio, G. E., Wulfson, A. M., & Rojman, J. A. (2014). Carcinogénesis Colorrectal Nuevas Perspectivas E Implicancias Clínicas Para Su Detección. *Revista Medica de Rosario*, 80(2), 63–74.

Downward, J. (2003). Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature Reviews Cancer*, 3(1), 11–22. <https://doi.org/10.1038/nrc969>

Duran-Sanchon, S., Moreno, L., Augé, J. M., Serra-Burriel, M., Cuatrecasas, M., Moreira, L., Martín, A., Serradesanferm, A., Pozo, À., Costa, R., Lacy, A., Pellisé, M., Lozano, J. J., Gironella, M., & Castells, A. (2019). Identification and Validation of MicroRNA Profiles in Fecal Samples for Detection of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 158(4), 947–957. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.10.005>

Edelman, G. M. (1988). Morphoregulatory Molecules. *Biochemistry*, 27(10), 3533–3543. <https://doi.org/10.1021/bi00410a001>

Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, 7(8), 606–619. <https://doi.org/10.1038/nrg1879>

Eslamizadeh, S., Heidari, M., Agah, S., Faghihloo, E., Ghazi, H., Mirzaei, A., & Akbari, A. (2018). The Role of MicroRNA Signature as Diagnostic Biomarkers in Different Clinical Stages of Colorectal Cancer. *Cell Journal*, 20(2), 220–230. <https://doi.org/10.22074/cellj.2018.5366>

Fadaka, A. O., Pretorius, A., & Klein, A. (2019). Biomarkers for Stratification in Colorectal Cancer: MicroRNAs. *Cancer Control*, 26(1). <https://doi.org/10.1177/1073274819862784>

Falzone, L., Scola, L., Zanghì, A., Biondi, A., Di Cataldo, A., Libra, M., & Candido, S. (2018). Integrated analysis of colorectal cancer microRNA datasets: Identification of microRNAs associated with tumor development. *Aging*, 10(5), 1000–1014. <https://doi.org/10.18632/aging.101444>

Fearon, E., & Vogelstein, B. (1990). A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. *Cell* Press, 61, 759–767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)

Feng, H., Liu, L., Xu, L., Wang, H., Hua, Q., & He, P. (2020). MiR-802 Suppresses Colorectal Cancer Cell Viability, Migration and Invasion by Targeting RAN. *Cancer Management and Research*, 12, 2291–2300. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S231709>

Ferrer, C. M., & Reginato, M. J. (2014). Sticking to Sugars at the Metastatic Site: Sialyltransferase ST6GalNAc2 acts as Breast Cancer Metastasis Suppressor. *Cancer Discovery*, 4(3), 275–277. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-14-0075>

Fetahu, I. S., Höbaus, J., Aggarwal, A., Hummel, D. M., Tennakoon, S., Mesteri, I., Baumgartner-Parzer, S., & Kállay, E. (2014). Calcium-sensing receptor silencing in colorectal cancer is associated with promoter hypermethylation and loss of acetylation on histone 3. *International Journal of Cancer*, 135(9), 2014–2023. <https://doi.org/10.1002/ijc.28856>

Fetahu, I. S., Tennakoon, S., Lines, K. E., Gröschel, C., Aggarwal, A., Mesteri, I., Baumgartner-Parzer, S., Mader, R. M., Thakker, R. V., & Kállay, E. (2015). MiR-135b- and miR-146b-dependent silencing of calcium-sensing receptor

expression in colorectal tumors. *International Journal of Cancer*, 138(1), 137–145. <https://doi.org/10.1002/ijc.29681>

Grady, W. M., & Carethers, J. M. (2008). Genomic and Epigenetic Instability in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology*, 135(4), 1079–1099. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076>

Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., & Mello, C. C. (2001). Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell*, 106(1), 23–34. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(01\)00431-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(01)00431-7)

Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*, 144(5), 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>

Hao, J.-P., & Ma, A. (2018). The ratio of miR-21/miR-24 as a promising diagnostic and poor prognosis biomarker in colorectal cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(24), 8649–8656. https://doi.org/10.26355/eurrev_201812_16629

Hao, Y., Baker, D., & Dijke, P. Ten. (2019). TGF- β -mediated epithelial-mesenchymal transition and cancer metastasis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(11), 1–34. <https://doi.org/10.3390/ijms20112767>

Hassan, E. A., El-Din Abd El-Rehim, A. S., Mohammed Kholef, E. F., & Elsewify, W. A. E. (2020). Potential role of plasma miR-21 and miR-92a in

distinguishing between irritable bowel syndrome, ulcerative colitis, and colorectal cancer. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, 13(2), 147–154.

Hizaki, K., Yamamoto, H., Taniguchi, H., Adachi, Y., Nakazawa, M., Tanuma, T., Kato, N., Sukawa, Y., Sanchez, J. V., Suzuki, H., Sasaki, S., Imai, K., & Shinomura, Y. (2011). Epigenetic inactivation of calcium-sensing receptor in colorectal carcinogenesis. *Modern Pathology*, 24(6), 876–884. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.10>

Hollis, M., Nair, K., Vyas, A., Chaturvedi, L. S., Gambhir, S., & Vyas, D. (2015). MicroRNAs potential utility in colon cancer: Early detection, prognosis, and chemosensitivity. *World Journal of Gastroenterology*, 21(27), 8284–8292. <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i27.8284>

Hurteau, G. J., Carlson, J. A., Spivack, S. D., & Brock, G. J. (2007). Overexpression of the MicroRNA hsa-miR-200c leads to reduced expression of transcription factor 8 and increased expression of E-cadherin. *Cancer Research*, 67(17), 7972–7976. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1058>

Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A. E., Bálint, E., Tuschl, T., & 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(5531), 834–838. <https://doi.org/10.1126/science.1062961>

Iliopoulos, D., Jaeger, S. A., Hirsch, H. A., Bulyk, M. L., & Struhl, K. (2010). STAT3 activation of miR-21 and miR-181b-1 via PTEN and CYLD are part of the epigenetic switch linking inflammation to cancer. *Cell*, 39(4), 493–506. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.07.023>

Imperiale, T. F., Wagner, D. R., Lin, C. Y., Larkin, G. N., Rogge, J. D., & Ransohoff, D. F. (2000). Risk of advanced proximal neoplasms in asymptomatic adults according to the distal colorectal findings. *The New England Journal of Medicine*, 343(3), 169–174. <https://doi.org/10.1056/NEJM200007203430302>

Ingelmo-Torres, M., Lozano, J. J., Izquierdo, L., Carrion, A., Costa, M., Gómez, L., Ribal, M. J., Alcaraz, A., & Mengual, L. (2017). Urinary cell microRNA-based prognostic classifier for nonmuscle invasive bladder cancer. *Oncotarget*, 8(11), 18238–18247. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.15315>

Issa, I. A., & NouredDine, M. (2017). Colorectal cancer screening: An updated review of the available options. *World Journal of Gastroenterology*, 23(28), 5086–5096. <https://doi.org/10.3748/wjg.v23.i28.5086>

Issa, J. P. (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 988–993. <https://doi.org/10.1038/nrc1507>

Iwasaki, S., Kobayashi, M., Yoda, M., Sakaguchi, Y., Katsuma, S., Suzuki, T., & Tomari, Y. (2010). Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes. *Molecular Cell*, 39(2), 292–299. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.015>

Jia, L., Luo, S., Ren, X., Li, Y., Hu, J., Liu, B., Zhao, L., Shan, Y., & Zhou, H. (2017). miR-182 and miR-135b Mediate the Tumorigenesis and Invasiveness of Colorectal Cancer Cells via Targeting ST6GALNAC2 and PI3K/AKT Pathway.

Digestive Diseases and Sciences, 62(12), 3447–3459.
<https://doi.org/10.1007/s10620-017-4755-z>

Jiang, X., Li, X., Wu, F., Gao, H., Wang, G., Zheng, H., Wang, H., Li, J., & Chen, C. (2017). Overexpression of miR-92a promotes the tumor growth of osteosarcoma by suppressing F-box and WD repeat-containing protein 7. *Gene*, 606, 10–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2017.01.002>

Jung, B., Staudacher, J. J., & Beauchamp, D. (2017). Transforming Growth Factor β Superfamily Signaling in Development of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 152(1), 36–52. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2016.10.015>

Kanth, P., Grimmer, J., Champine, M., Burt, R., & Samadder, N. J. (2017). Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. *American Journal of Gastroenterology*, 112(10), 1509–1525. <https://doi.org/10.1038/ajg.2017.212>

Karimi Dermani, F., Amini, R., Saidijam, M., & Najafi, R. (2018). miR-200c, a tumor suppressor that modulate the expression of cancer stem cells markers and epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(7), 6288–6295. <https://doi.org/10.1002/jcb.26880>

Karimi Dermani, F., Saidijam, M., Amini, R., Mahdavinezhad, A., Heydari, K., & Najafi, R. (2017). Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial–Mesenchymal Transition by Increasing miR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(6), 1547–1555. <https://doi.org/10.1002/jcb.25816>

Kawamata, T., & Tomari, Y. (2010). Making RISC. *Trends in Biochemical Sciences*, 35(7), 368–376. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2010.03.009>

Ke, T. W., Wei, P. L., Yeh, K. T., Chen, W. T. L., & Cheng, Y. W. (2015). MiR-92a Promotes Cell Metastasis of Colorectal Cancer Through PTEN-Mediated PI3K/AKT Pathway. *Annals of Surgical Oncology*, 22(8), 2649–2655. <https://doi.org/10.1245/s10434-014-4305-2>

Kim, S. Y., Kim, H.-S., & Park, H. J. (2019). Adverse events related to colonoscopy: Global trends and future challenges. *World Journal of Gastroenterology*, 25(2), 190–204. <https://doi.org/10.3748/wjg.v25.i2.190>

Kohn, A. D., & Moon, R. T. (2005). Wnt and calcium signaling: β -Catenin-independent pathways. *Cell Calcium*, 38, 439–446. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2005.06.022>

Komarova, N. L., Lengauer, C., Vogelstein, B., & Nowak, M. A. (2002). Dynamics of genetic instability in sporadic and familial colorectal cancer. *Cancer Biology and Therapy*, 1(6), 685–692. <https://doi.org/10.4161/cbt.321>

Korpal, M., Lee, E. S., Hu, G., & Kang, Y. (2008). The miR-200 family inhibits epithelial-mesenchymal transition and cancer cell migration by direct targeting of E-cadherin transcriptional repressors ZEB1 and ZEB2. *Journal of Biological Chemistry*, 283(22), 14910–14914. <https://doi.org/10.1074/jbc.C800074200>

Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. (2010). Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Science*, 101(10), 2087–2092. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x>

Kościelniak-Merak, B., Radosavljević, B., Zając, A., & Tomasik, P. J. (2018). Faecal Occult Blood Point-of-Care Tests. *Journal of Gastrointestinal Cancer*, 49(4), 402–405. <https://doi.org/10.1007/s12029-018-0169-1>

Koveitypour, Z., Panahi, F., Vakilian, M., Peymani, M., Seyed Forootan, F., Nasr Esfahani, M. H., & Ghaedi, K. (2019). Signaling pathways involved in colorectal cancer progression. *Cell and Bioscience*, 9(97), 1–14. <https://doi.org/10.1186/s13578-019-0361-4>

Krishnamurthy, N., & Kurzrock, R. (2018). Targeting the Wnt/beta-catenin pathway in cancer: Update on effectors and inhibitors. *Cancer Treatment Reviews*, 62, 50–60. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2017.11.002>

Kumar, M. S., Lu, J., Mercer, K. L., Golub, T. R., & Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nature Genetics*, 39(5), 673–677. <https://doi.org/10.1038/ng2003>

Kumar, M. S., Pester, R. E., Chen, C. Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D. G., Golub, T. R., & Jacks, T. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes and Development*, 23(23), 2700–2704. <https://doi.org/10.1101/gad.1848209>

Kundaktepe, B. P., Sozer, V., Papila, C., Durmus, S., Kocael, P. C., Simsek, G., Gelisgen, R., Zengin, K., Ulualp, K., & Uzun, H. (2020). Associations between mirnas and two different cancers: Breast and colon. *Cancer Management and Research*, 12, 871–879. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S227628>

Lech, G., Słotwiński, R., Słodkowski, M., & Krasnodębski, I. W. (2016). Colorectal cancer tumour markers and biomarkers: Recent therapeutic advances. *World Journal of Gastroenterology*, 22(5), 1745–1755. <https://doi.org/10.3748/wjg.v22.i5.1745>

Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Rådmark, O., Kim, S., & Kim, V. N. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425(6956), 415–419. <https://doi.org/10.1038/nature01957>

Lee, Y., Jeon, K., Lee, J. T., Kim, S., & Kim, V. N. (2002). MicroRNA maturation: Stepwise processing and subcellular localization. *EMBO Journal*, 21(17), 4663–4670. <https://doi.org/10.1093/emboj/cdf476>

Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., & Kim, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO Journal*, 23(20), 4051–4060. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600385>

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

Liu, B., Liu, Y., Zhao, L., Pan, Y., Shan, Y., Li, Y., & Jia, L. (2017). Upregulation of microRNA-135b and microRNA-182 promotes chemoresistance of colorectal cancer by targeting ST6GALNAC2 via PI3K/AKT pathway. *Molecular Carcinogenesis*, 56(12), 2669–2680. <https://doi.org/10.1002/mc.22710>

Liu, X. G., Zhu, W. Y., Huang, Y. Y., Ma, L. N., Zhou, S. Q., Wang, Y. K., Zeng, F., Zhou, J. H., & Zhang, Y. K. (2012). High expression of serum miR-21 and tumor miR-200c associated with poor prognosis in patients with lung cancer. *Medical Oncology*, 29(2), 618–626. <https://doi.org/10.1007/s12032-011-9923-y>

Lu, C., Shan, Z., Hong, J., & Yang, L. (2017). MicroRNA-92a promotes epithelial-mesenchymal transition through activation of PTEN/PI3K/AKT signaling pathway in non-small cell lung cancer metastasis. *International Journal of Oncology*, 51(1), 235–244. <https://doi.org/10.3892/ijo.2017.3999>

Lu, T. X., & Rothenberg, M. E. (2017). MicroRNA. *Fundamentals of Allergy and Immunology*, 141(4), 1202–1207. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.08.034>

Lui, C., Mok, M. T. S., & Henderson, B. R. (2016). Characterization of adenomatous polyposis coli protein dynamics and localization at the centrosome. *Cancers*, 8(47), 1–15. <https://doi.org/10.3390/cancers8050047>

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., & Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science*, 303(5654), 95–98. <https://doi.org/10.1126/science.1090599>

Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular Basis of Colorectal Cancer. *The New England Journal of Medicine* new england journal of medicine review, 361, 2449–2460. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0804588>

Mazraehshah, M. K., Tavangar, S. M., Saidijam, M., Amini, R., Bahreini, F., Dermani, F. K., & Najafi, R. (2018). Anticancer effects of miR - 200c in colorectal cancer through BMI1. *Journal of Cellular Biochemistry*, 119(12), 10005–10012. <https://doi.org/10.1002/jcb.27330>

McCullough, A. (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487, 330–337. <https://doi.org/10.1038/nature11252>

Mima, K., Nishihara, R., Yang, J., Dou, R., Masugi, Y., Shi, Y., Silva, A. Da, Cao, Y., Song, M., Nowak, J., Gu, M., Li, W., Morikawa, T., Zhang, X., Wu, K., Baba, H., Giovannucci, E. L., Meyerhardt, J. A., Chan, A. T., ... Ogino, S. (2016). MicroRNA MIR21 (miR-21) and PTGS2 expression in colorectal cancer and patient survival. *Clinical Cancer Research*, 22(15), 3841–3848. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2173>

Ministerio de Salud. (2013). Guía cáncer colorrectal en personas de 15 años y más (pp. 15-17).

Ministerio de Salud. (2018). Plan nacional de cáncer 2018-2028 (pp. 27-28, 48-49, 54). Departamento de Manejo Integral del Cáncer y otros Tumores.

Ministerio de Salud. (2019). Resumen ejecutivo. Guía de Práctica Clínica Cáncer Colorectal en Personas de 15 años y más 2018 (pp. 6-8). Santiago.

Mirzaei, H., Khataminfar, S., Mohammadparast, S., Sales, S., Maftouh, M., & Mohammadi, M. et al. (2016). Circulating microRNAs as Potential Diagnostic Biomarkers and Therapeutic Targets in Gastric Cancer: Current Status and Future Perspectives. *Current Medicinal Chemistry*, 23(36), 4135-4150. doi: 10.2174/0929867323666160818093854

Mirzaei, H., Naseri, G., Rezaee, R., Mohammadi, M., Banikazemi, Z., Mirzaei, H. R., Salehi, H., Peyvandi, M., Pawelek, J. M., & Sahebkar, A. (2016). Curcumin: A new candidate for melanoma therapy? *International Journal of Cancer*, 139(8), 1683–1695. <https://doi.org/10.1002/ijc.30224>

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

Miyazaki, M., Furuya, T., Shiraki, A., Sato, T., Oga, A., & Sasaki, K. (1999). The relationship of DNA ploidy to chromosomal instability in primary human colorectal cancers. *Cancer Research*, 59(20), 5283–5285.

Mohammadi, A., Mansoori, B., & Baradaran, B. (2016). The role of microRNAs in colorectal cancer. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 84, 705–713. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.09.099>

Mohammadi, M., Goodarzi, M., Jaafari, M. R., Mirzaei, H. R., & Mirzaei, H. (2016). Circulating microRNA: A new candidate for diagnostic biomarker in neuroblastoma. *Cancer Gene Therapy*, 23(11), 371–372. <https://doi.org/10.1038/cgt.2016.45>

Monleau, M., Bonnel, S., Gostan, T., Blanchard, D., Courgnaud, V., & Lecellier, C. H. (2014). Comparison of different extraction techniques to profile microRNAs from human sera and peripheral blood mononuclear cells. *BMC Genomics*, 15(1), 395. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-395>

Montagnana, M., Benati, M., Danese, E., Minicozzi, A., Paviati, E., & Gusella, M. et al. (2016). Plasma Expression Levels of Circulating miR-21 are not Useful for Diagnosing and Monitoring Colorectal Cancer. *Clinical Laboratory*, 62(5), 967-970. doi: 10.7754/clin.lab.2015.151015

Moreno, B., Muñoz, M., Cuellar, J., Domancic, S., & Villanueva, J. (2018). Revisiones Sistemáticas: definición y nociones básicas. *Revista Clínica de Periodoncia, Implantología y Rehabilitación Oral*, 11(3), 184–186. <https://doi.org/10.4067/S0719-01072018000300184>

Moreno, C. C., Mittal, P. K., Sullivan, P. S., Rutherford, R., Staley, C. A., Cardona, K., Hawk, N. N., Dixon, W. T., Kitajima, H. D., Kang, J., Small, W. C., Oshinski, J., & Votaw, J. R. (2016). Colorectal Cancer Initial Diagnosis: Screening Colonoscopy, Diagnostic Colonoscopy, or Emergent Surgery, and Tumor Stage and Size at Initial Presentation. *Clinical Colorectal Cancer*, 15(1), 67–73. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2015.07.004>

Moridikia, A., Mirzaei, H., Sahebkar, A., & Salimian, J. (2018). MicroRNAs: Potential candidates for diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 901–913. <https://doi.org/10.1002/jcp.25801>

Møller, T., James, J. P., Holmstrøm, K., Sørensen, F. B., Lindebjerg, J., & Nielsen, B. S. (2019). Co-detection of miR-21 and TNF- α mRNA in budding cancer cells in colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1907. <https://doi.org/10.3390/ijms20081907>

Muralidhar, B., Winder, D., Murray, M., Palmer, R., Barbosa-Morais, N., Saini, H., Roberts, I., Pett, M., & Coleman, N. (2011). Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *Journal of Pathology*, 224(4), 496–507. <https://doi.org/10.1002/path.2898>

Murugaesu, N., Irvani, M., Van Weverwijk, A., Ivetic, A., Johnson, D. A., Antonopoulos, A., Fearn, A., Jamal-Hanjani, M., Sims, D., Fenwick, K., Mitsopoulos, C., Gao, Q., Orr, N., Zvelebil, M., Haslam, S. M., Dell, A., Yarwood, H., Lord, C. J., Ashworth, A., & Isacke, C. M. (2014). An in vivo functional screen identifies ST6GalNAc2 sialyltransferase as a breast cancer metastasis suppressor. *Cancer Discovery*, 4(3), 304–317. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0287>

Nagao, Y., Hisaoka, M., Matsuyama, A., Kanemitsu, S., Hamada, T., Fukuyama, T., Nakano, R., Uchiyama, A., Kawamoto, M., Yamaguchi, K., & Hashimoto, H. (2012). Association of microRNA-21 expression with its targets, PDCD4 and TIMP3, in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Modern Pathology*, 25(1), 112–121. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2011.142>

Nagase, H., & Nakamura, Y. (1993). Mutations of the APC (Adenomatous polyposis coli) Gene. *Human Mutation*, 2(6), 425–434. <https://doi.org/10.1002/humu.1380020602>

Ng, E. K. O., Chong, W. W. S., Jin, H., Lam, E. K. Y., Shin, V. Y., Yu, J., Poon, T. C. W., Ng, S. S. M., & Sung, J. J. Y. (2009). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: A potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58(10), 1375–1381. <https://doi.org/10.1136/gut.2008.167817>

Ni, H., Han, Y., & Jin, X. (2019). Celastrol inhibits colon cancer cell proliferation by downregulating miR-21 and PI3K/AKT/GSK-3 β pathway. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(3), 808–816.

Novellademunt, L., Antas, P., & Li, V. S. W. (2015). Targeting Wnt signaling in colorectal cancer. A review in the theme: Cell signaling: Proteins, pathways and mechanisms. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 309(8), C511–C521. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00117.2015>

Nuñez, D. F. (2017). Envejecimiento y cáncer. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina*, 7(3), 11–16.

Ortiz-Quintero, B. (2016). Cell-free microRNAs in blood and other body fluids, as cancer biomarkers. *Cell Proliferation*, 49(3), 281–303. <https://doi.org/10.1111/cpr.12262>

Pastushenko, I., & Blanpain, C. (2019). EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis. *Trends in Cell Biology*, 29(3), 212–226. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2018.12.001>

Peng, Q., Shen, Y., Lin, K., Zou, L., Shen, Y., & Zhu, Y. (2019). Identification of microRNA-92a and the related combination biomarkers as promising substrates in predicting risk, recurrence and poor survival of colorectal cancer. *Journal of Cancer*, 10(14), 3154–3171. <https://doi.org/10.7150/jca.30306>

Peng, W., Liu, Y. N., Zhu, S. Q., Li, W. Q., & Guo, F. C. (2018). The correlation of circulating pro-angiogenic miRNAs' expressions with disease risk, clinicopathological features, and survival profiles in gastric cancer. *Cancer Medicine*, 7(8), 3773–3791. <https://doi.org/10.1002/cam4.1618>

Peng, Y., Huang, D., Qing, X., Tang, L., & Shao, Z. (2019). Investigation of MiR-92a as a prognostic indicator in cancer patients: A meta-analysis. *Journal of Cancer*, 10(18), 4430–4441. <https://doi.org/10.7150/jca.30313>

Petrilli, A. M., & Fernández-Valle, C. (2016). Role of Merlin/NF2 Inactivation in Tumor Biology. *Oncogene*, 35(5), 537–548. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.125>

Qin, Y., Li, L., Wang, F., Zhou, X., Liu, Y., Yin, Y., & Qi, X. (2018). Knockdown of miR-135b sensitizes colorectal cancer cells to oxaliplatin-induced apoptosis through increase of FOXO1. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 48, 1627–1637. <https://doi.org/10.1159/000492284>

Qiu, J., Peng, B., Tang, Y., Qian, Y., Guo, P., Li, M., Luo, J., Chen, B., Tang, H., Lu, C., Cai, M., Ke, Z., He, W., Zheng, Y., Xie, D., Li, B., & Yuan, Y. (2017). CpG Methylation Signature Predicts Recurrence in Early-Stage Hepatocellular Carcinoma: Results From a Multicenter Study. *Journal of Clinical Oncology*, 35(7), 734–742. <https://doi.org/10.1200/JCO.2016.68.2153>

Ramón, T., & Asensio, C. (2008). Cáncer de colon hereditario. *Cirugia Espanola*, 83(2), 51–52. [https://doi.org/10.1016/S0009-739X\(08\)70505-0](https://doi.org/10.1016/S0009-739X(08)70505-0)

Ren, A., Dong, Y., Tsoi, H., & Yu, J. (2015). Detection of miRNA as non-invasive biomarkers of colorectal cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(2), 2810–2823. <https://doi.org/10.3390/ijms16022810>

Rodríguez-Montes, J. A., & Menéndez Sánchez, P. (2014). Papel de los micro-RNA en el cribado del cáncer colorrectal. *Cirugia Espanola*, 92(10), 654–658. <https://doi.org/10.1016/j.ciresp.2014.05.012>

Rockey, D. C., Paulson, E., Niedzwiecki, D., Davis, W., Bosworth, H. B., Sanders, L., Yee, J., Henderson, J., Hatten, P., Burdick, S., Sanyal, A., Rubin, D. T., Sterling, M., Akerkar, G., Bhutani, M. S., Binmoeller, K., Garvie, J., Bini, E. J., Mcquaid, K., ... Halvorsen, R. (2005). Analysis of air contrast barium enema , computed tomographic colonography , and colonoscopy : prospective comparison. *Lancet*, 365(9456), 305–311. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)17784-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)17784-8)

Roh, M. S., Lee, H. W., Jung, S. B., Kim, K., Lee, E. H., Park, M. il, Lee, J. S., & Kim, M. S. (2018). Expression of miR-200c and its clinicopathological significance in patients with colorectal cancer. *Pathology Research and Practice*, 214(3), 350–355. <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.01.005>

Ruiz-López, L., Blancas, I., Garrido, J. M., Mut-Salud, N., Moya-Jódar, M., Osuna, A., & Rodríguez-Serrano, F. (2018). The role of exosomes on colorectal cancer: A review. *Journal of Gastroenterology and Hepatology (Australia)*, 33(4), 792–799. <https://doi.org/10.1111/jgh.14049>

Rutherford, C. C., & Calderwood, A. H. (2018). Update on Bowel Preparation for Colonoscopy. *Current Treatment Options Gastroenterology*, 16, 165–181. <https://doi.org/10.1007/s11938-018-0165-3>

Saliminejad, K., Khorram Khorshid, H. R., Soleymani Fard, S., & Ghaffari, S. H. (2019). An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *Journal of Cellular Physiology*, 234(5), 5451–5465. <https://doi.org/10.1002/jcp.27486>

Sheinin, Y., Kállay, E., Wrba, F., Kriwanek, S., Peterlik, M., & Cross, H. S. (2000). Immunocytochemical localization of the extracellular calcium-sensing receptor in normal and malignant human large intestinal mucosa. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 48(5), 595–602. <https://doi.org/10.1177/002215540004800503>

Shi, C., Yang, Y., Xia, Y., Okugawa, Y., Yang, J., Liang, Y., Chen, H., Zhang, P., Wang, F., Han, H., Wu, W., Gao, R., Gasche, C., Qin, H., Ma, Y., & Goel, A. (2014). Novel evidence for an oncogenic role of microRNA-21 in colitis-associated colorectal cancer. *Gut*, 65(9), 1470–1481. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-308455>

Shirafkan, N., Mansoori, B., Mohammadi, A., Shomali, N., Ghasbi, M., & Baradaran, B. (2018). MicroRNAs as novel biomarkers for colorectal cancer: New outlooks. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 97, 1319–1330. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.11.046>

Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging*, 11, 967–976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>

Sparks, A. B., Morin, P. J., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1998). Mutational analysis of the APC/ β -catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Research*, 58(6), 1130–1134.

Srinivasan, M., Bharali, D. J., Sudha, T., Khedr, M., Guest, I., Sell, S., Glinsky, G. V., & Mousa, S. A. (2017). Downregulation of Bmi1 in breast cancer stem cells suppresses tumor growth and proliferation. *Oncotarget*, 8(24), 38731–38742. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.16317>

Staudacher, J. J., Bauer, J., Jana, A., Tian, J., Carroll, T., Mancinelli, G., Özden, Ö., Krett, N., Guzman, G., Kerr, D., Grippo, P., & Jung, B. (2017). Activin signaling is an essential component of the TGF- β induced pro-metastatic phenotype in colorectal cancer. *Scientific Reports*, 7(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05907-8>

Szelenberger, R., Kacprzak, M., Saluk-bijak, J., Zielinska, M., & Bijak, M. (2019). Plasma MicroRNA as a novel diagnostic. *Clinica Chimica Acta*, 499, 98–107. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2019.09.005>

Thanikachalam, K., & Khan, G. (2019). Colorectal cancer and nutrition. *Nutrients*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/nu11010164>

Tili, E., Michaille, J. J., & Croce, C. M. (2013). MicroRNAs play a central role in molecular dysfunctions linking inflammation with cancer. *Immunological Reviews*, 253(1), 167–184. <https://doi.org/10.1111/imr.12050>

Topol, L., Jiang, X., Choi, H., Garrett-Beal, L., Carolan, P. J., & Yang, Y. (2003). Wnt-5a inhibits the canonical Wnt pathway by promoting GSK-3-independent β -catenin degradation. *Journal of Cell Biology*, 162(5), 899–908. <https://doi.org/10.1083/jcb.200303158>

Tsukamoto, M., Iinuma, H., Yagi, T., Matsuda, K., & Hashiguchi, Y. (2017). Circulating Exosomal MicroRNA-21 as a Biomarker in Each Tumor Stage of Colorectal Cancer. *Oncology (Switzerland)*, 92(6), 360–370. <https://doi.org/10.1159/000463387>

Tume, L., Cisneros, C., Sevillano, J., Pacheco-Tapia, R., Matos, D., Acevedo-Espínola, R., Ubidia-Incio, R., & Rodríguez, W. (2016). Desregulación de microARN en el cáncer: un enfoque terapéutico y diagnóstico. *Gaceta Mexicana de Oncología*, 15(5), 298–304. <https://doi.org/10.1016/j.gamo.2016.08.004>

Uratani, R., Toiyama, Y., Kitajima, T., Kawamura, M., Hiro, J., Kobayashi, M., Tanaka, K., Inoue, Y., Mohri, Y., Mori, T., Kato, T., Goel, A., & Kusunoki, M. (2016). Diagnostic potential of cell-free and exosomal MicroRNAs in the identification of patients with high-risk colorectal adenomas. *PLoS ONE*, 11(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160722>

Venkitachalam, S., & Guda, K. (2016). Altered glycosyltransferases in colorectal cancer. *Expert Review of Gastroenterology & Hepatology*, 11(1), 5–7. <https://doi.org/10.1080/17474124.2017.1253474>

Verdier, J., Breunig, I. R., Ohse, M. C., Roubrocks, S., Kleinfeld, S., Roy, S., Streetz, K., Trautwein, C., Roderburg, C., & Sellge, G. (2019). Faecal Micro-RNAs in inflammatory bowel diseases. *Journal of Crohn's and Colitis*, 14(1), 110–117. <https://doi.org/10.1093/ecco-jcc/jjz120>

Vogelstein, B., Fearon, E. R., Hamilton, S. R., Kern, S. E., Preisinger, A. C., Leppert, M., Smits, A. M. M., & Bos, J. L. (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. *New England Journal of Medicine*, 319(9), 525–532. <https://doi.org/10.1056/NEJM198809013190901>

Vogelstein, B., Lane, D., & Levine, A. J. (2000). Surfing the p53 network : Article : *Nature*. *Nature*, 408(6810), 307–310. <https://doi.org/10.1038/35042675>

Vuik, F. E. R., Nieuwenburg, S. A. V., Bardou, M., Lansdorp-Vogelaar, I., Dinis-Ribeiro, M., Bento, M. J., Zadnik, V., Pellisé, M., Esteban, L., Kaminski, M. F., Suchanek, S., Ngo, O., Májek, O., Leja, M., Kuipers, E. J., & Spaander, M. C. W. (2019). Increasing incidence of colorectal cancer in young adults in Europe over the last 25 years. *Gut*, 68(10), 1820–1826. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2018-317592>

Walther, A., Johnstone, E., Swanton, C., Midgley, R., Tomlinson, I., & Kerr, D. (2009). Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 9(7), 489–499. <https://doi.org/10.1038/nrc2645>

Wang, D., Fan, Z., Liu, F., & Zuo, J. (2015). Hsa-miR-21 and Hsa-miR-29 in tissue as potential diagnostic and prognostic biomarkers for gastric cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 37(4), 1454–1462. <https://doi.org/10.1159/000438514>

Wang, H., Peng, R., Wang, J., Qin, Z., & Xue, L. (2018). Circulating microRNAs as potential cancer biomarkers: the advantage and disadvantage. *Clinical Epigenetics*, 10(59), 1–10. <https://doi.org/10.1186/s13148-018-0492-1>

Wang, K., Yuan, Y., Cho, J. H., McClarty, S., Baxter, D., & Galas, D. J. (2012). Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS ONE*, 7(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041561>

Wang, X., Li, D., Sun, L., Shen, G., Liu, H., Guo, H., Ge, M., Liang, J., Chen, P., Zhou, J., Cao, T., Wang, Q., Gao, X., Tong, M., Hu, S., Nie, Y., Fan, D., Wang, X., Zhao, X., & Lu, Y. (2020). Regulation of the small GTPase Ran by miR-802 modulates proliferation and metastasis in colorectal cancer cells. *British Journal of Cancer*, March. <https://doi.org/10.1038/s41416-020-0809-7>

Wang, Z. Z., Yang, J., Jiang, B. H., Di, J. B., Gao, P., Peng, L., & Su, X. Q. (2018). KIF14 promotes cell proliferation via activation of Akt and is directly targeted by miR-200c in colorectal cancer. *International Journal of Oncology*, 53(5), 1939–1952. <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4546>

Wei, Q. D., Zheng, W. B., Sun, K., Xue, Q., Yang, C. Z., & Li, G. X. (2019). MiR-92a promotes the invasion and migration of colorectal cancer by targeting

RECK. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 12(5), 1565–1577.

Weinberg, B. A., Marshall, J. L., & Salem, M. E. (2017). The Growing Challenge of Young Adults With Colorectal Cancer. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, 31(5), 381–389.

Wu, C. W., Ng, S. C., Dong, Y., Tian, L., Ng, S. S. M., Leung, W. W., Law, W. T., Yau, T. O., Chan, F. K. L., Sung, J. J. Y., & Yu, J. (2014). Identification of microrna-135b in stool as a potential noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenoma. *Clinical Cancer Research*, 20(11), 2994–3002. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-13-1750>

Xiao, J., Yu, W., Hu, K., Li, M., Chen, J., & Li, Z. (2017). MiR-92a promotes tumor growth of osteosarcoma by targeting PTEN/AKT signaling pathway. *Oncology Reports*, 37(4), 2513–2521. <https://doi.org/10.3892/or.2017.5484>

Xie, L., Li, S., Jin, J., He, L., Xu, K., Zhu, L., Du, M., Liu, Y., Chu, H., Zhang, Z., Wang, M., Shi, D., Gu, D., & Ni, M. (2019). Genetic variant in miR-21 binding sites is associated with colorectal cancer risk. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 23(3), 2012–2019. <https://doi.org/10.1111/jcmm.14104>

Xu, X., Zhu, S., Tao, Z., & Ye, S. (2018). High circulating miR-18a, miR-20a, and miR-92a expression correlates with poor prognosis in patients with non-small cell lung cancer. *Cancer Medicine*, 7(1), 21–31. <https://doi.org/10.1002/cam4.1238>

Xuan, Y., Yang, H., Zhao, L., Lau, W. B., Lau, B., Ren, N., Hu, Y., Yi, T., Zhao, X., Zhou, S., & Wei, Y. (2015). MicroRNAs in colorectal cancer: Small molecules with big functions. *Cancer Letters*, 360(2), 89–105. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.11.051>

Yadav, P., Mirza, M., Nandi, K., Jain, S. K., Kaza, R. C. M., Khurana, N., Ray, P. C., & Saxena, A. (2016). Serum microRNA-21 expression as a prognostic and therapeutic biomarker for breast cancer patients. *Tumor Biology*, 37(11), 15275–15282. <https://doi.org/10.1007/s13277-016-5361-y>.

Yang, G., Zhang, Y., & Yang, J. (2019). A Five-microRNA Signature as Prognostic Biomarker in Colorectal Cancer by Bioinformatics Analysis. *Frontiers in Oncology*, 9 (November), 1–14. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.01207>

Yau, T. O., Tang, C. M., Harriss, E. K., Dickins, B., & Polytarchou, C. (2019). Faecal microRNAs as a non-invasive tool in the diagnosis of colonic adenomas and colorectal cancer: A meta-analysis. *Scientific Reports*, 9(1), 9491. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45570-9>

Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., & Cullen, B. R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes and Development*, 17(24), 3011–3016. <https://doi.org/10.1101/gad.1158803>

Yu, H., Lee, H., Herrmann, A., Buettner, R., & Jove, R. (2014). Revisiting STAT3 signalling in cancer: New and unexpected biological functions. *Nature Reviews Cancer*, 14(11), 736–746. <https://doi.org/10.1038/nrc3818>

Yu, J. J., Wu, Y. X., Zhao, F. J., & Xia, S. J. (2014). miR-96 promotes cell proliferation and clonogenicity by down-regulating of FOXO1 in prostate cancer cells. *Medical Oncology*, 31(4), 910. <https://doi.org/10.1007/s12032-014-0910-y>

Zhang, B., Gui, L. S., Zhao, X. L., Zhu, L. L., & Li, Q. W. (2015). FOXO1 is a tumor suppressor in cervical cancer. *Genetics and Molecular Research*, 14(2), 6605–6616. <https://doi.org/10.4238/2015.June.18.3>.

Zhang, G. J., Li, L. F., Yang, G. D., Xia, S. Sen, Wang, R., Leng, Z. W., Liu, Z. L., Tian, H. P., He, Y., Meng, C. Y., Liu, D. Z., Hou, S. L., Tang, X. G., & Zhou, T. (2017). MiR-92a promotes stem cell-like properties by activating Wnt/ β -catenin signaling in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(60), 101760–101770. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21667>

Zhang, H., Cao, H., Xu, D., & Zhu, K. (2016). MicroRNA-92a promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting the PTEN/AKT pathway. *OncoTargets and Therapy*, 9, 3579–3588. <https://doi.org/10.2147/OTT.S105470>

Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M. S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T. L., Barchetti, A., Ward, M. R., Yao, G., Medina, A., Brienenjenkins, A. O., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P. A., Weber, B. L., & Coukos, G. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *PNAS*, 103(24), 9136–9141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508889103>

Zhang, Z., Bu, X., Chen, H., Wang, Q., & Sha, W. (2016). Bmi-1 promotes the invasion and migration of colon cancer stem cells through the downregulation of E-cadherin. *International Journal of Molecular Medicine*, 38(4), 1199–1207. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2016.2730>