

MICRORNAs CIRCULANTES: ¿NUEVOS BIOMARCADORES EN CÁNCER?

Ana Belén Arroyo-Rodríguez y Salam Salloum-Asfar

Departamento de Medicina Interna, Centro Regional de Hemodonación. Universidad de Murcia.

E-mail: anabelen.arroyo@um.es y salam.salloum@um.es

Introducción

El cáncer se produce por una proliferación celular descontrolada y autónoma que destruye los tejidos, siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. Esto se debe, en parte, a la falta de herramientas para una detección precoz. Determinar con precisión etapas tempranas de un tumor podría ayudar a reducir la alta mortalidad que esta enfermedad produce. En los últimos años, una gran cantidad de trabajos han estudiado el papel de los microRNAs (miRNAs) en enfermedades humanas, y casi la mitad se centran en el área del cáncer (Trends in the microRNA Marketplace, 2008) (Figura 1). En este contexto, algunos miRNAs pueden actuar como oncogenes y/o como supresores de tumores. Se ha observado que la expresión aberrante de un gran número de miRNAs puede contribuir al desarrollo de esta enfermedad. La identificación de estas alteraciones y los perfiles de expresión de miRNAs proporcionan una

gran cantidad de información que cada vez cobra más importancia como herramienta diagnóstica y podría dar lugar al establecimiento de nuevos biomarcadores (Kosaka, Iguchi et al. 2010).

Los miRNAs son pequeños RNAs no codificantes implicados en la regulación génica. Fueron identificados por primera vez en *Caenorhabditis elegans* a principios de la década de 1990 (Lee, Feinbaum et al. 1993), y fue once años más tarde cuando Calin y colaboradores correlacionaron por primera vez abundancia de miRNA y enfermedad humana, en particular en leucemia de células B (Calin, Dumitru et al. 2002). Desde entonces, varios avances han puesto de manifiesto el papel de los miRNAs como moléculas importantes en el control de la regulación post-transcripcional en procesos fisiológicos y patológicos (Figura 2).

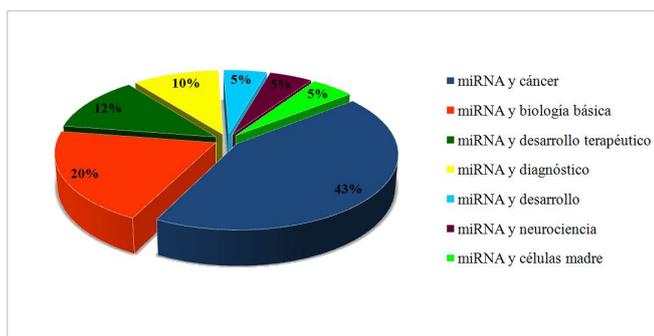


Figura 1. Estudios de miRNAs realizados, por áreas de conocimiento, desde su descubrimiento hasta la actualidad (adaptado de Trends in the microRNA Marketplace, 2008).

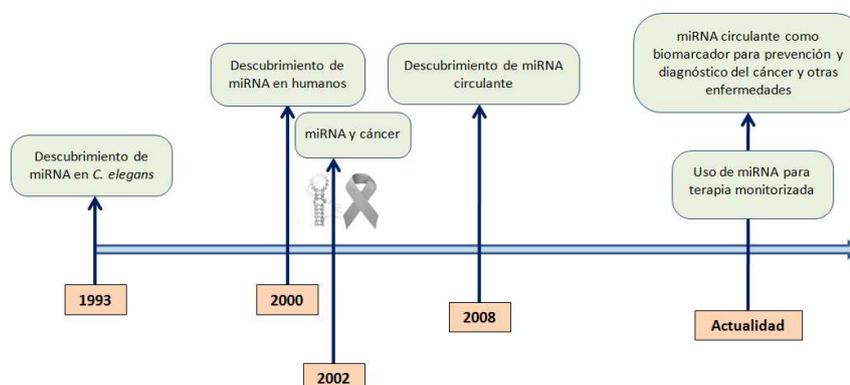


Figura 2. Cronología de algunos de los grandes acontecimientos en el campo de los miRNAs desde su descubrimiento hasta la actualidad.

Hasta la fecha se ha demostrado la implicación de miRNAs en el desarrollo de tejidos, diferenciación celular (Stefani y Slack 2008), apoptosis (Spizzo, Nicoloso et al. 2010), metabolismo de grasas y lípidos (Poy, Eliasson et al. 2004), exocitosis, división y diferenciación de células madre (Shcherbata, Hatfield et al. 2006), y en el desarrollo de diferentes enfermedades, entre ellas el cáncer (Spizzo, Rushworth et al. 2009). En definitiva, en todos aquellos procesos que requieren una buena regulación de la expresión génica en espacio y tiempo para su correcto funcionamiento.

Biogénesis y función de miRNA

La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo, con la transcripción de los genes de miRNAs por la RNA polimerasa II. Los transcritos primarios de miRNA que se generan se denominan pri-miRNA, contienen un capuchón 7-metil guanosina en el extremo 5' y una cola poli A en el extremo 3'. Estas

modificaciones son marcas o señales de la transcripción mediada por la polII (Bartel 2004).

Los largos transcritos primarios (pri-miRNA) son, en un primer lugar, procesados por la enzima Drosha en el núcleo, dando lugar a intermediarios con forma de horquilla (pre-miRNA). Estos pre-miRNA son reconocidos y exportados desde el núcleo al citoplasma mediante la proteína transmembrana nuclear Exportina 5, dependiente de Ran-GTP (Yi, Qin et al. 2003). Una vez en el citoplasma, los pre-miRNA son sometidos a un segundo paso de división mediado principalmente por la enzima Dicer, dando lugar a los miRNAs maduros, un dúplex de RNA de doble cadena y pequeño tamaño (19-25 nucleótidos por cadena) que contiene dos miRNAs. Los miRNAs maduros son incorporados en el complejo RISC (RNA-induced silencing complex). El complejo RISC-miRNA se dirige a sus dianas específicas para modular negativamente la expresión génica (Bartel 2004).

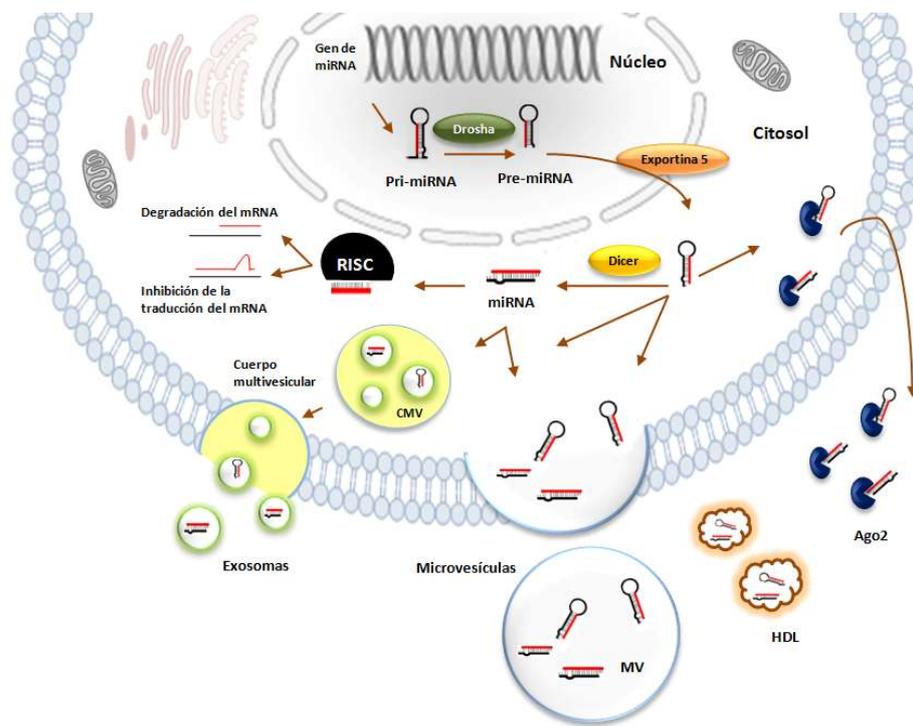


Figura 3. Biogénesis, función y transporte de miRNAs.

Sin embargo, los últimos estudios parecen indicar que la regulación negativa por miRNAs ocurre mediante represión, deadenilación y degradación del mRNA (Djuranovic, Nahvi et al. 2012), aunque la contribución y el orden de cada uno de estos mecanismos siguen sin estar claros. Djuranovic y colaboradores encontraron que los miRNAs median el silenciamiento de sus dianas, en células S2 de *Drosophila melanogaster*, en primer lugar inhibiendo la

traducción del mensajero y, posteriormente, esto se consolida por deadenilación del mRNA y en último lugar por su degradación, lo que pone de manifiesto que los tres mecanismos ocurren en un único proceso, siguiendo un orden, al parecer, predeterminado (Djuranovic, Nahvi et al. 2012). A pesar de estos estudios, los mecanismos por los cuales los miRNAs regulan de forma negativa sus mensajeros diana siguen sin conocerse con claridad y pueden diferir dependiendo

de la situación, el organismo o el tipo celular. Por lo tanto, son necesarios más estudios para consolidar el conocimiento de cómo llevan a cabo su función los miRNAs (Bazzini, Lee et al. 2012).

A menudo, en los mRNA diana de un animal hay múltiples sitios complementarios que corresponden al mismo miRNA; en esos casos, la acción cooperativa hace que la inhibición sea más eficiente (Doench y Sharp 2004). Por otro lado, un miRNA por lo general inhibe múltiples mRNA diana. Esta propiedad permite a los miRNAs regular muchos genes en una ruta o proceso fisiológico al mismo tiempo.

Origen y función de los miRNAs circulantes

En 2008 se descubrió que los miRNAs no solo se encuentran en el interior celular sino que también están presentes en diversos fluidos corporales, como la sangre (Figura 2) (Mitchell, Parkin et al. 2008). Es bien conocido que estos miRNAs extracelulares son muy estables a la acción de las ribonucleasas presentes en suero o plasma (Li, Zhu et al. 2012). Esta sorprendente estabilidad se debe a que los miRNAs circulantes van envasados en micropartículas como exosomas, microvesículas o cuerpos apoptóticos. También se pueden transportar formando complejos con lipoproteínas (en su mayoría HDL) o asociados a proteínas de unión como Argonauta 2 (Ago2) o nucleoplasmina 1 (NMP1), protegiéndose así de la degradación (Figura 3) (Creemers, Tijssen et al. 2012).

La presencia de miRNAs en micropartículas ha llevado a la idea de que los miRNAs circulantes podrían tener una función en la comunicación entre células. Si este es el caso, los miRNAs deben de ser selectivamente envasados en los transportadores apropiados y activamente secretados. En segundo lugar, los miRNAs deben ser transferidos a las células receptoras específicas y en tercer lugar y lo más importante, estos miRNAs deben conservar la capacidad de reconocer y reprimir los mRNA diana dentro de las células receptoras. Aunque en la actualidad se sabe poco acerca de cómo los miRNAs se empaquetan y se exportan de forma selectiva hay estudios que parecen demostrar una secreción selectiva y específica de cada tipo de órgano o tipo celular (Boon y Vickers 2013).

En este sentido, un tumor puede comportarse como un órgano y liberar miRNAs de forma selectiva al torrente sanguíneo. Muchos de estos miRNAs circulantes cáncer-específicos se han encontrado en diferentes etapas de la enfermedad. Además, las células tumorales, de la misma manera que muchos otros tipos celulares, secretan microvesículas que contienen

miRNAs específicos, que pueden tener funciones importantes en el transporte de la información génica de las células tumorales a las células circundantes y apoyar el crecimiento y la progresión del tumor (Turchinovich, Weiz et al. 2012). Estas observaciones han establecido la base molecular para el diagnóstico precoz de distintos tipos de cánceres humanos mediante la utilización de miRNAs circulantes.

Potencial de los miRNAs circulantes como biomarcadores

Los marcadores tumorales que se utilizan actualmente están basados en niveles de proteínas específicas en sangre, como son el antígeno específico de próstata (PSA), o el antígeno carcinoembrionario (CAE), entre otros muchos (Goldstein y Mitchell 2005; Loeb y Catalona 2007). Sin embargo, la mayoría de estos marcadores carecen de sensibilidad y especificidad, detectándose ocasionalmente en situaciones benignas y en distintos tipos de cáncer. Además, los enfoques actuales de detección del cáncer son invasivos y es difícil identificar la enfermedad en sus primeras etapas. De ahí el gran interés en la búsqueda de nuevos biomarcadores sensibles y específicos de cada tipo de tumor, que permitan detectar cambios neoplásicos tempranos y dar un diagnóstico inicial del cáncer (Healy, Heneghan et al. 2012).

Los miRNAs circulantes son buenos candidatos para ser una nueva clase de biomarcadores no invasivos para diagnóstico, pronóstico e incluso evaluación terapéutica del cáncer (Figura 4) por varias razones: la recogida de sangre es reproducible y no invasiva, además los miRNAs presentes en plasma y suero tienen una gran estabilidad. Por otro lado la desregulación de la expresión de miRNAs se ha asociado con cáncer y perfiles de expresión de miRNAs en sangre parecen ser específicos de tejido, por ejemplo miR-122 se expresa preferentemente en hígado y miR-133 en músculo (Etheridge, Lee et al. 2011; Weiland, Gao et al. 2012). También hay que resaltar que distintos laboratorios que estudian una misma enfermedad encuentran los mismos miRNAs circulantes como potenciales biomarcadores, lo que fortalece la idea de que los miRNAs pueden ser válidos para diagnóstico de cáncer y otras enfermedades. Además, muchos estudios individuales confirman que los niveles circulantes de miRNAs recuperan los niveles basales tras la eliminación quirúrgica del tumor, y otros tratamientos médicos, lo que pone de manifiesto la posible utilidad de miRNAs circulantes como biomarcadores de eficacia de un tratamiento (Weiland, Gao et al. 2012).

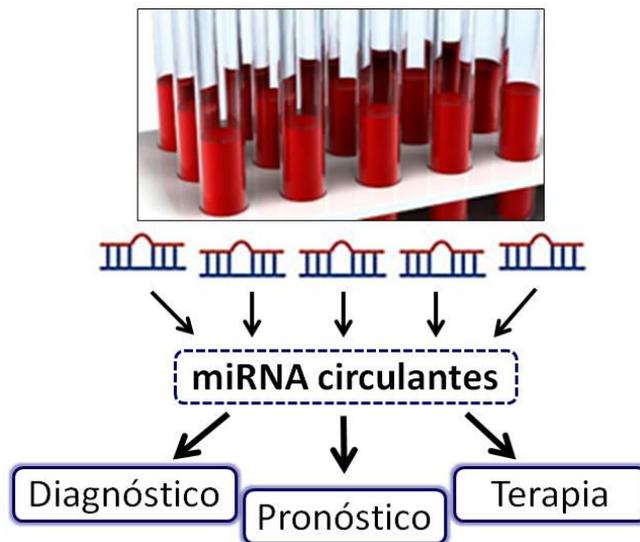


Figura 4. MiRNAs circulantes y cáncer: nuevas fronteras del diagnóstico, pronóstico y terapia.

A pesar de todos los avances y resultados alentadores sobre el uso de miRNAs circulantes como futuros biomarcadores, todavía es necesario resolver algunas cuestiones. La extracción de miRNAs extracelulares no es una tarea fácil, ya que se encuentra en cantidades bajas en la sangre y la falta de normalizadores endógenos fiables dificulta la cuantificación específica de miRNAs circulantes. De momento, no existe un consenso en cuanto a la metodología a seguir, la obtención y preparación de las muestras y el método de cuantificación y normalización de los resultados. Por tanto, es necesaria la estandarización de protocolos para el desarrollo de miRNAs circulantes como nuevos biomarcadores (Etheridge, Lee et al. 2011; Ajit 2012; Weiland, Gao et al. 2012).

MiRNAs circulantes en distintos tipos de cáncer

La investigación en éste área sobre el uso de miRNAs extracelulares como prometedores biomarcadores ha generado gran interés y es un campo de rápido crecimiento.

El grupo de Lawrie y colaboradores fue el primero en describir la existencia de miRNAs en suero, mediante su detección en la circulación de pacientes con linfoma difuso de células B grandes. En su estudio identificaron tres miRNAs: miR-21, miR-155 y miR-210, que estaban sobreexpresados de forma considerable en pacientes con dicha enfermedad (Lawrie, Gal et al. 2008) (Tabla 1). Estudios posteriores de Healy y colaboradores (Healy, Heneghan et al. 2012) revelaron que los niveles elevados de miR-21 se asociaban además con un aumento del periodo de supervivencia libre de recaída. También se han descrito miRNAs circulantes en otros tipos de cáncer; en un estudio que incluía pacientes con cáncer de mama se observó que

los niveles de miR-195 y let-7a estaban muy elevados (Tabla 1) y que tras 2 semanas de cirugía, los niveles de estos dos miRNAs se reducían de forma significativa, equiparándose con los niveles de miRNAs presentes en controles sanos. De forma paralela, se estudiaron los perfiles de expresión de estos miRNAs en muestras de sangre de pacientes con otros tipos de tumores, entre ellos carcinoma de células renales, melanoma y tumores colorrectales, encontrándose que miR-195 sólo aparecía sobreexpresado en los pacientes con cáncer de mama, lo que ponía de manifiesto la existencia de miRNA-cáncer específicos (Heneghan, Miller et al. 2010). Por otro lado, Roth y colaboradores identificaron 3 nuevos miRNAs circulantes: miR-155, miR-10b y miR-34a que también estaban sobreexpresados en pacientes con cáncer de mama respecto a controles sanos. (Roth, Rack et al. 2010) No obstante la sobreexpresión de miR-10b y miR34a se detectó en todas las fases del cáncer, incluso en fases avanzadas con metástasis. Sin embargo, parece ser que miR-155 es el único capaz de discriminar un cáncer de mama no metastásico.

Cabe destacar que recientes microarrays han identificado la expresión anormal de 26 miRNAs en plasma de pacientes con cáncer de mama frente a controles (Zhao, Shen et al. 2010). El análisis in silico predijo que estos miRNAs podrían regular vías esenciales de la formación y progresión de cáncer de mama. En otro estudio, los perfiles de miRNAs en muestras de suero de pacientes con cáncer de mama mostraron que miR-21, miR-106a y miR-155 estaban sobreexpresados, tanto en la masa del tumor como en el suero, mientras que otros miRNAs, como miR-126, miR-199a y miR-335 estaban infraexpresados en comparación con controles sanos (Wang, Zheng et al. 2010).

Los miRNAs circulantes también se han descrito en el hepatocarcinoma celular (HCC), este tipo de cáncer representa el 80-90% de los malignos primarios y supone la quinta enfermedad neoplásica de mayor incidencia y la tercera causa de muerte por cáncer. A pesar de conocer los principales factores de riesgo como hepatitis B o C, consumo abusivo de alcohol o la esteatosis, la supervivencia global de los pacientes (alrededor de 6 meses) no se ha conseguido mejorar sustancialmente en las últimas dos décadas. La principal razón es el avanzado estado de la patología en el momento del diagnóstico, lo que pone de manifiesto la urgente necesidad de desarrollar nuevos métodos de detección precoz en la población de riesgo y de desarrollar métodos terapéuticos innovadores. Murakami y colaboradores (Murakami, Yasuda et al. 2006) estudiaron la expresión de miRNAs en 25 pares de muestras de HCC y tejidos no cancerosos adyacentes y 9 muestras de hepatitis crónica adicionales. Como resultado, dos miRNAs (miR-18 y miR-224) se encontraron sobreexpresados en los tejidos con HCC, mientras que cinco (miR-199, miR-200a, miR-125a y miR-195) aparecían infraexpresados en comparación con los tejidos normales. Además otro grupo de investigadores describió más tarde que altos niveles de miR-224 y bajos niveles de miR-122a y miR-422b eran frecuentes en HCC (Ladeiro, Couchy et al. 2008).

Con el fin de desarrollar biomarcadores no invasivos para HCC, Li y colaboradores (Li, Hu et al. 2010) investigaron la expresión de miRNAs en el suero de 513 sujetos, que incluían 135 pacientes con infección por virus de la hepatitis B (VHB), 48 sujetos con infección por virus de la hepatitis C (VHC), 120 pacientes con HCC y 210 controles sanos. Los hallazgos sugirieron que los miRNAs: mir-25, mir-375, let-7f podrían separar claramente los casos de HCC de los controles sanos. Por otra parte, el miR-375 presentaba un 96% de especificidad y un 100% de sensibilidad en el diagnóstico de HCC. En resumen, los miRNAs circulantes podrían servir como novedosos biomarcadores en la detección precoz de HCC.

En cuanto al cáncer gástrico, en un estudio de un total de 69 pacientes y 30 controles se detectaron diferencias significativas en los niveles plasmáticos de expresión de 4 miRNAs; miR-17-5p, miR-21, miR-106a y let-7a (Tsujiura, Ichikawa et al. 2010) (Tabla 1). Sin embargo dichas diferencias se redujeron considerablemente tras un mes después de la cirugía. Zhou et al. y colaboradores demostraron también que pacientes con cáncer gástrico no operados mostraban niveles elevados de miR-106a y miR-17 en comparación con pacientes con cirugía y controles sanos. (Zhou, Guo et al. 2010).

Tipo de cáncer	miRNAs	Referencias
Cáncer de pulmón	mir-17-3p, mir-21, mir-106a, mir-146, mir-155, mir-191, mir-192, mir-203, mir-205, mir-210, mir-212 y mir-214	(Yanaihara, Caplen et al. 2006)
Linfoma de células B	miR-21, miR-155 y miR-210	(Lawrie, Gal et al. 2008)
Cáncer de mama	miR-195, let-7a, miR-155, miR-10b y miR-34a	(Heneghan, Miller et al. 2010; Roth, Rack et al. 2010)
Cáncer gástrico	miR-21, miR-106b, let-7a y miR-17-5p	(Tsujiura, Ichikawa et al. 2010)
Cáncer pancreático	miR-200a y miR-200b	(Li, Omura et al. 2010)
Hepatocarcinoma celular	miR-16, miR-199a y miR-195	(Qu, Zhang et al. 2011)
Cáncer de próstata	miR-375 y miR-141	(Tsujiura, Ichikawa et al. 2010; Brase, Johannes et al. 2011)
Cáncer colorrectal	mir-92, mir-17-3p, miR-29a y miR-92a	(Ng, Chong et al. 2009)

Tabla 1: Ejemplos de miRNAs circulantes en diferentes tumores malignos.

El papel de los miRNAs circulantes en el cáncer pancreático es también novedoso, dado que se ha descrito que tanto miR-200a como miR-200b muestran papeles conocidos en el proceso de transición epitelial a mesenquimal. Además se ha demostrado la presencia de niveles elevados significativos de estos dos miRNAs en el suero de estos pacientes en comparación con el de controles sanos (Li, Hu et al. 2010) (Tabla 1). Estos dos miRNAs también resultaron estar sobreexpresados en los casos de pancreatitis crónica,

lo que indicaría que a pesar de su posible utilidad en la detección de una patología pancreática carecen de especificidad para discriminar el estado de cáncer pancreático.

En cuanto al cáncer de pulmón, es uno de los más comunes en el mundo y además el CPCP (cáncer pulmonar de células pequeñas) es de muy rápido crecimiento. A pesar de la inmensa investigación para hallar nuevos métodos de detección y tratamiento, el

pronóstico de este tipo de cáncer sigue siendo pobre.

Hu y colaboradores (Hu, Chen et al. 2010) realizaron un estudio de asociación del genoma sobre expresión de miRNAs en suero, con el fin de desarrollar marcadores tumorales serológicos que ayudasen a predecir la supervivencia del cáncer de pulmón. Estos miRNAs fueron posteriormente validados por qRT-PCR en 243 muestras de suero de pacientes con CACP. Se detectó que una baja supervivencia se asocia con la sobreexpresión de miR-30d y miR-286 junto con una infraexpresión de miR-1 y miR-499. En esta línea, un estudio de microarrays de expresión génica de 11 muestras de suero de pacientes con CACP y 11 controles sanos, identificó la sobreexpresión significativa de miR-30d y miR-286 en pacientes en un estadio temprano del cáncer en comparación con los controles (Foss, Sima et al. 2011). Tras la validación por qRT-PCR se observó que estos miRNAs tenían un 73 % y 71 % de sensibilidad y especificidad respectivamente para la identificación de cáncer de pulmón.

Conclusiones

Todos los estudios mostrados ponen de manifiesto que el análisis de miRNAs circulantes en pacientes con distintos tipos de cáncer constituye una herramienta útil para la identificación de marcadores de detección precoz de un tumor, que además presentan un gran potencial para diagnóstico, pronóstico y terapia del cáncer y posiblemente de otras muchas enfermedades (Figura 4). Sin embargo, hay que tener en cuenta los problemas metodológicos que rodean al mundo miRNA extracelular y no olvidar que la estandarización de protocolos es necesaria para el desarrollo de estas pequeñas moléculas como biomarcadores importantes en cáncer.

Bibliografía

- Ajit, S. K. (2012). Circulating microRNAs as biomarkers, therapeutic targets, and signaling molecules."Sensors (Basel) 12(3).
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function."Cell 116(2).
- Bazzini, A. A., M. T. Lee, et al. (2012). Ribosome profiling shows that miR-430 reduces translation before causing mRNA decay in zebrafish."Science 336(6078).
- Boon, R. A. y K. C. Vickers (2013). Intercellular transport of microRNAs."Arterioscler Thromb Vasc Biol 33(2).
- Brase, J. C., M. Johannes, et al. (2011). Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer."Int.J.Cancer 128(3): 608-616.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro-

RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia."Proc Natl Acad Sci U S A 99(24): -.

- Creemers, E. E., A. J. Tijssen, et al. (2012). Circulating microRNAs: novel biomarkers and extracellular communicators in cardiovascular disease?"Circ Res 110(3).
- Djuranovic, S., A. Nahvi, et al. (2012). "miRNA-mediated gene silencing by translational repression followed by mRNA deadenylation and decay."Science 336(6078).
- Doench, J. G. y P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression."Genes Dev 18(5).
- Etheridge, A., I. Lee, et al. (2011). Extracellular microRNA: a new source of biomarkers."Mutat Res 717(1-2).
- Foss, K. M., C. Sima, et al. (2011). "miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer."J.Thorac.Oncol. 6(3): 482-488.
- Goldstein, M. J. y E. P. Mitchell (2005). Carcinoembryonic antigen in the staging and follow-up of patients with colorectal cancer."Cancer Invest 23(4).
- Healy, N. A., H. M. Heneghan, et al. (2012). "Systemic mirnas as potential biomarkers for malignancy."Int.J.Cancer 131(10): 2215-2222.
- Heneghan, H. M., N. Miller, et al. (2010). "Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease."Oncologist. 15(7): 673-682.
- Hu, Z., X. Chen, et al. (2010). "Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer."J.Clin.Oncol. 28(10): 1721-1726.
- Kosaka, N., H. Iguchi, et al. (2010). Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis."Cancer Sci 101(10).
- Ladeiro, Y., G. Couchy, et al. (2008). "MicroRNA profiling in hepatocellular tumors is associated with clinical features and oncogene/tumor suppressor gene mutations."Hepatology 47(6): 1955-1963.
- Lawrie, C. H., S. Gal, et al. (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma."Br.J.Haematol. 141(5): 672-675.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum, et al. (1993). "The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14."Cell 75(5).

- Li, A., N. Omura, et al. (2010). "Pancreatic cancers epigenetically silence SIP1 and hypomethylate and overexpress miR-200a/200b in association with elevated circulating miR-200a and miR-200b levels." *Cancer Res.* 70(13): 5226-5237.
- Li, L., D. Zhu, et al. (2012). "Argonaute 2 complexes selectively protect the circulating microRNAs in cell-secreted microvesicles." *PLoS One* 7(10).
- Li, L. M., Z. B. Hu, et al. (2010). "Serum microRNA profiles serve as novel biomarkers for HBV infection and diagnosis of HBV-positive hepatocarcinoma." *Cancer Res.* 70(23): 9798-9807.
- Loeb, S. y W. J. Catalona (2007). "Prostate-specific antigen in clinical practice." *Cancer Lett* 249(1). Meister, G., M. Landthaler, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." *Mol Cell* 15(2).
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, et al. (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30).
- Murakami, Y., T. Yasuda, et al. (2006). "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues." *Oncogene* 25(17): 2537-2545.
- Ng, E. K., W. W. Chong, et al. (2009). "Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening." *Gut* 58(10): 1375-1381.
- Okamura, K., A. Ishizuka, et al. (2004). "Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways." *Genes Dev* 18(14).
- Poy, M. N., L. Eliasson, et al. (2004). "A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion." *Nature* 432(7014).
- Qu, K. Z., K. Zhang, et al. (2011). "Circulating microRNAs as biomarkers for hepatocellular carcinoma." *J.Clin.Gastroenterol.* 45(4): 355-360.
- Roth, C., B. Rack, et al. (2010). "Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer." *Breast Cancer Res.* 12(6): R90.
- Shcherbata, H. R., S. Hatfield, et al. (2006). "The MicroRNA pathway plays a regulatory role in stem cell division." *Cell Cycle* 5(2).
- Spizzo, R., M. S. Nicoloso, et al. (2010). "miR-145 participates with TP53 in a death-promoting regulatory loop and targets estrogen receptor-alpha in human breast cancer cells." *Cell Death Differ* 17(2).
- Spizzo, R., D. Rushworth, et al. (2009). "RNA inhibition, microRNAs, and new therapeutic agents for cancer treatment." *Clin Lymphoma Myeloma* 9 Suppl 3.
- Stefani, G. y F. J. Slack (2008). "Small non-coding RNAs in animal development." *Nat Rev Mol Cell Biol* 9(3)
- Tsujiura, M., D. Ichikawa, et al. (2010). "Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers." *Br.J.Cancer* 102(7): 1174-1179.
- Turchinovich, A., L. Weiz, et al. (2012). "Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function." *Trends Biochem.Sci.* 37(11): 460-465.
- Wang, F., Z. Zheng, et al. (2010). "Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor." *Gynecol.Oncol.* 119(3): 586-593.
- Weiland, M., X. H. Gao, et al. (2012). "Small RNAs have a large impact: circulating microRNAs as biomarkers for human diseases." *RNA Biol* 9(6): -.
- Wienholds, E. y R. H. Plasterk (2005). "MicroRNA function in animal development." *FEBS Lett* 579(26).
- Yanaihara, N., N. Caplen, et al. (2006). "Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis." *Cancer Cell* 9(3): 189-198.
- Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev* 17(24).
- Zhao, H., J. Shen, et al. (2010). "A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer." *PLoS.One.* 5(10): e13735-.
- Zhou, H., J. M. Guo, et al. (2010). "Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker." *J.Mol.Med.(Berl)* 88(7): 709-717.