

MicroRNAs en el diagnóstico y pronóstico del cáncer pulmonar

Federico Ávila-Moreno,^{*,**} Francisco Urrea,^{*} Blanca Ortiz-Quintero^{*}

^{*} Unidad de Investigación, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.

^{**} Unidad de Investigación en Biomedicina (UBIMED), Facultad de Estudios Superiores Iztacala, UNAM.

MicroRNAs in diagnosis and prognosis in lung cancer

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNAs) are endogenous small non-coding RNA molecules that regulate gene expression at the posttranscriptional level by blocking translation or inducing degradation of messenger RNA targets. It has been shown that miRNAs participate in a wide spectrum of essential biologic processes including cell cycle, differentiation, development, apoptosis and hematopoiesis, revealing one of the major regulators of human gene expression. Recent studies have shown evidences of abnormal expression of miRNAs in solid and hematological tumors, as well as the association of altered miRNAs with oncogenic or tumor suppressor functions, suggesting a key role of miRNAs in carcinogenesis. Moreover, unique profiles of altered miRNAs expression seem to allow distinction from normal tissue, prediction of disease outcomes, and evaluation of tumor aggressiveness in several types of cancer, including lung cancer. These unique and highly stable miRNAs patterns seems not to depend of age and race, and these characteristics highlight their potential diagnostic and prognosis utility. These findings are particularly promising for lung cancer, a worldwide leading cause of cancer-related deaths with a poor survival rate, despite the discovery of novel therapies. This review describes the potential of miRNAs as biomarkers for diagnosis, cancer classification and estimation of prognosis in lung cancer; and the approaches used to detect and quantify these miRNAs; including the current information about circulating miRNAs as potential biomarkers in lung cancer. This review also provides a description of miRNAs biogenesis, nomenclature and available database for miRNA sequences.

Key words. MicroRNAs (miRNAs). Lung cancer. Biomarkers. Diagnosis. Prognosis.

RESUMEN

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes de origen endógeno que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional mediante el bloqueo de la traducción o la inducción de la degradación de RNA mensajeros blanco. Los miRNAs regulan diversos procesos celulares esenciales incluyendo ciclo celular, diferenciación, apoptosis y hematopoyesis, revelando uno de los mecanismos principales de regulación de la expresión genética en la naturaleza. Estudios recientes han demostrado alteraciones en la expresión de miRNAs en tumores sólidos y hematológicos, además de la asociación de ciertos miRNAs con funciones oncogénicas y de supresión tumoral, sugiriendo un papel clave de los miRNAs en la carcinogénesis. Aunado a lo anterior, alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs permiten distinguir el tejido tumoral del tejido sano, además de evaluar la agresividad tumoral y evolución clínica en diversos tipos de cáncer, incluyendo el cáncer pulmonar. Estos perfiles únicos de expresión parecen no depender de la edad, género o raza, señalando su uso potencial en el diagnóstico y pronóstico del cáncer. Estos hallazgos son particularmente prometedores para el cáncer pulmonar, enfermedad que permanece como una de las causas principales de muerte por neoplasias a nivel mundial, atribuible a un diagnóstico tardío de la enfermedad. Esta revisión describe el potencial de los miRNAs como biomarcadores para el diagnóstico, clasificación histológica y estimación de la prognosis del cáncer pulmonar, así como los métodos actuales para la detección cuantitativa de dichos miRNAs. Además, se incluye la información reciente de los miRNAs circulantes como biomarcadores potenciales en el cáncer pulmonar. El escrito contiene además la descripción de la biogénesis de los miRNAs, la nomenclatura oficial y la información de la base de datos de secuencias de miRNAs disponible actualmente en la red.

Palabras clave. MicroRNAs (miRNAs). Cáncer pulmonar. Biomarcadores. Diagnóstico. Prognosis.

INTRODUCCIÓN

El cáncer pulmonar es una de las principales causas de muerte por neoplasias malignas a nivel mundial con 1.6 millones de casos diagnosticados y 1.3 millones de casos fatales en ambos sexos (2008) de acuerdo con la Agencia Internacional de Investigación en Cáncer de la Organización Mundial de la Salud.¹ Lo anterior coloca al cáncer pulmonar como la neoplasia maligna con mayor mortalidad a nivel mundial y con un índice de sobrevivida a cinco años de 15%.² En México, el cáncer pulmonar representa también la primera causa de muerte por neoplasias malignas de acuerdo con un estudio retrospectivo que abarcó de 1998 a 2004.³

La alta mortalidad del cáncer pulmonar podría atribuirse principalmente al diagnóstico en etapas tardías de la enfermedad, ya que se ha observado una menor sobrevivida asociada al diagnóstico en etapas más avanzadas de la misma.⁴ En México, en particular en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, se reportó que 85% de los casos de cáncer pulmonar fueron diagnosticados en las etapas III-IV,⁵ aunque debe señalarse que este instituto brinda atención médica de tercer nivel. Lo anterior podría también contribuir a la ineffectividad de las terapias aplicadas al momento del diagnóstico a pesar del desarrollo de nuevas combinaciones de fármacos y tratamientos multidisciplinarios que incluyen cirugía, quimioterapia y radioterapia.^{6,7} Esto muestra claramente la necesidad de identificar marcadores nuevos para un diagnóstico alternativo, además de blancos terapéuticos efectivos.

De acuerdo con la OMS el cáncer pulmonar se clasifica en dos principales grupos histológicos: carcinoma de células pequeñas (SCLC, por sus siglas en inglés) y carcinoma de células no pequeñas (NSCLC). Este último comprende los carcinomas de células escamosas (SCC), adenocarcinomas (AD), carcinoma de células grandes (LCC) y sus variantes.⁸ El 80% de los carcinomas pulmonares lo constituye el grupo histológico NSCLC, cifra que se mantiene en México.⁹

El cáncer pulmonar es el resultado de la acumulación gradual de anormalidades genéticas y epigenéticas que ocurren en paralelo a los cambios histológicos que sufre el epitelio respiratorio normal.¹⁰ Al respecto, la búsqueda de métodos de diagnóstico, clasificación, pronóstico y terapias del cáncer han conducido a extensos estudios en genética molecular, indicando que la transformación maligna es acompañada por deleciones o adiciones cromosómicas, alteraciones en las secuencias del

DNA, variación en el número de copias, metilaciones aberrantes de secuencias promotoras, así como alteraciones en los mecanismos de remodelación de la cromatina. Estas alteraciones promueven la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumores, alterando la proliferación celular, resistencia a la apoptosis, migración celular y angiogénesis.^{11,12}

Precisamente, en la búsqueda de métodos diagnósticos alternativos y de tratamientos contra el cáncer, los estudios en genética molecular y proteómica han identificado biomarcadores potenciales para la detección y progresión de varios tipos de cáncer,¹³⁻¹⁷ así como posibles blancos terapéuticos. No obstante, aun con la valiosa información disponible, el cáncer pulmonar permanece como una de las primeras causas de muerte por neoplasias malignas. Lo anterior señala nuevamente la necesidad de estrategias alternativas que puedan sumarse a los estudios en genética molecular y proteómica, que involucren el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión genética que ha sido alterada en la carcinogénesis y que conlleven a la identificación de biomarcadores potenciales para el diagnóstico, pronóstico e incluso posibles tratamientos del cáncer pulmonar.

MicroRNAs COMO BIOMARCADORES

Recientemente se describió a los miRNAs como una nueva vía de regulación postranscripcional de la expresión genética. Los microRNAs (miRNAs) son pequeños RNAs no codificantes de origen endógeno que regulan la expresión genética a nivel postranscripcional mediante el bloqueo de la traducción o la inducción de la degradación de RNA mensajeros blanco.¹⁸ Los miRNAs regulan múltiples procesos celulares: ciclo celular, diferenciación, proliferación, apoptosis y hematopoyesis, entre otros,¹⁸⁻²¹ constituyen un mecanismo conservado de regulación de la expresión genética.

Importantemente, se han reportado evidencias de alteraciones en los patrones de expresión a nivel celular/tisular de miRNAs asociados a procesos patológicos tales como inflamación, desórdenes cardiovasculares, desórdenes neuronales, diabetes y cáncer.^{18,22-26} Estas alteraciones presentan perfiles únicos de expresión que no dependen de la edad, sexo o raza,²⁷⁻²⁹ características que convierten a los miRNAs tisulares en excelentes candidatos a biomarcadores de diagnóstico (ver más adelante Características de un biomarcador). Existen evidencias de

que los miRNAs, cuya expresión tisular se encuentra alterada, podrían usarse potencialmente como biomarcadores tisulares para la clasificación, pronosis y diagnóstico de diversos tipos de cáncer, incluyendo el pulmonar.²⁹⁻³³ Más aún, la manipulación experimental de ciertos miRNAs asociados al cáncer (de mama, colorrectal, hepático y pulmonar) modula las propiedades de malignidad de líneas celulares tumorales, así como el desarrollo de tumores en modelos *in vivo* de ratón,³⁴⁻³⁷ indicando claramente la participación de ciertos miRNAs alterados en la carcinogénesis. Lo anterior ha llevado a un estudio intensivo de los miRNAs, su biogénesis, asociación con el cáncer y uso potencial como biomarcadores.

Características de un biomarcador

De acuerdo con el Grupo de Trabajo para la definición de Biomarcadores (*Biomarker Definitions Working Group*), organizados por *The National Institutes of Health* y la *Food and Drug Administration* (NIH y FDA), un biomarcador es una característica que es medida y evaluada objetivamente como un indicador de procesos biológicos, procesos patogénicos o respuesta farmacológica a una intervención terapéutica.³⁸ En cáncer un biomarcador puede ser algún elemento celular, genético o molecular que pueda ser medible y que se asocie a la presencia de cáncer o del proceso patológico canceroso y por tanto pueda ser usado para detectar tales procesos.

En general, los biomarcadores en el área de la salud pueden servir como herramienta para el diagnóstico (detectar a aquellos pacientes con alguna enfermedad), como indicadores de la pronosis (pronóstico de la evolución de la enfermedad) o el estadio de la enfermedad (detectar en cuál etapa de la evolución de la enfermedad se encuentra el paciente) e incluso para predecir o monitorear la respuesta ante un tratamiento. Para cumplir tal fin, un biomarcador ideal en el estudio del cáncer deberá contar con las siguientes características (basado en referencia 39):

- Presentar alta especificidad y sensibilidad para detectar la presencia de un tipo de cáncer en particular.
- Debe ser útil para la detección del cáncer sin importar el género, edad o raza.
- Los niveles de síntesis, expresión y/o secreción deben correlacionar con la presencia del tumor.
- Presentar estabilidad en la muestra biológica para que pueda ser medido con precisión después

de que la muestra se haya extraído, manipulado o conservado.

- Favorecer el desarrollo de un método de detección relativamente barato, simple y preciso que pueda reproducirse en cualquier laboratorio.
- De preferencia, debe provenir de una fuente biológica accesible (sangre, orina, esputo, etc.).

La utilidad de un biomarcador es su uso a nivel clínico, para lo cual se requiere de una búsqueda y evaluación científica sistemática de los posibles candidatos. En 2001, Pepe, *et al.*⁴⁰ propusieron una guía de cinco pasos para el desarrollo, evaluación y validación de biomarcadores, desde su descubrimiento en el laboratorio de investigación hasta su aplicación en la clínica:

- **Fase 1 o fase exploratoria pre-clínica.** Su objetivo es encontrar una característica medible que se sobre-exprese o exprese por debajo de los niveles considerados como normales. Este primer paso puede consistir en la comparación de tejido canceroso vs. tejido sano. El tejido canceroso debe obtenerse al momento del diagnóstico y sin previo tratamiento, ya que éste alteraría los niveles del posible biomarcador.
- **Fase 2 o de ensayo clínico y de evaluación.** Consiste en la demostración de que el ensayo basado en la medición del biomarcador es capaz de distinguir a los individuos con cáncer de aquéllos que no lo presenten. Aquí es necesario la medición de la sensibilidad y especificidad, cuyos parámetros son medibles estadísticamente mediante la determinación del TPR (relación de los verdaderos positivos, por sus siglas en inglés), el FPR (relación de los falsos negativos) y el uso de las curvas de ROC (*Receiver Operating Characteristic curves*).⁴¹
- **Fase 3 o estudio retrospectivo.** La finalidad es evaluar la capacidad del biomarcador para detectar el cáncer en la fase preclínica de la enfermedad y se realiza un seguimiento para conocer si la enfermedad se desarrolla, por lo que correspondería a la evaluación de un biomarcador de diagnóstico temprano.
- **Fase 4 o estudio prospectivo.** El objetivo principal es comparar los resultados de la prueba de detección con los resultados de las pruebas diagnósticas definitivas (que se realizan simultáneamente) y determinar el número de casos reales positivos, así como describir las características del tumor detectado, en una población relevante.

- **Fase 5 o estudio control del cáncer.** La meta es evaluar el impacto del uso de la prueba de detección en la morbilidad y mortalidad del cáncer en una población abierta.

Es necesario mencionar que el cáncer, incluyendo el pulmonar, es una patología multifactorial que involucra tanto las alteraciones genéticas/epigenéticas como factores ambientales de riesgo, por lo que es poco probable que un solo biomarcador sea suficiente para desarrollar un método de detección con la sensibilidad y especificidad requerida. Se recomienda entonces la evaluación de varios biomarcadores potenciales desde la fase de descubrimiento inicial en el laboratorio de investigación.

Para continuar con la revisión del potencial de los miRNAs como biomarcadores en el cáncer pulmonar es necesario conocer sus características biológicas, dónde encontrarlos, cómo identificarlos/cuantificarlos y, finalmente, la información disponible sobre su asociación con el cáncer pulmonar.

A continuación se describe la biogénesis de los miRNAs en animales, los lineamientos para su nomenclatura, los métodos disponibles para identificarlos y cuantificarlos y la información disponible de su asociación con el cáncer pulmonar.

BIOGÉNESIS DE miRNAs Y SUS MECANISMOS DE REGULACIÓN DEL RNA MENSAJERO

Los miRNAs son RNA pequeños de ~22 nucleótidos producidos a partir de precursores de RNA no codificante de doble cadena y sintetizados bajo el control de un promotor propio o compartido con genes que codifican para proteínas.⁴²⁻⁴⁴ En mamíferos, la mayoría de los genes que codifican para miRNAs son transcritos por una sola unidad policistónica de transcripción; aunque algunos son transcritos de forma individual.⁴⁵ La transcripción de los genes de miRNAs es mediada por la RNA polimerasa II (RNA Pol II);⁴²⁻⁴⁴ sin embargo, existen evidencias de un pequeño grupo de miRNAs en humanos que pueden ser transcritos por la RNA Pol III.⁴⁶ En el núcleo celular, la RNA Pol II transcribe los precursores primarios conocidos como pri-miRNAs que poseen ~60 a 100 nucleótidos de tamaño y estructuras de hairpin⁴²⁻⁴⁴ (Figura 1).

Hairpin (por su descripción en inglés) se refiere a la estructura formada por una hebra de nucleótidos con secuencias repetidas e inversas, que al plegarse sobre sí misma forma una doble hebra con las secuencias inversas ahora complementarias y un doblez en forma de rizo en un extremo. Posteriormente, el com-

plejo enzimático Drosha-DGCR8 escinde los pri-miRNAs y produce los precursores pre-miRNAs que poseen un tamaño de ~70 nucleótidos con estructura de hairpin, un grupo fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos no apareados en el extremo 3'.^{47,48} A continuación, los pre-miRNAs son transportados al citoplasma por el complejo transportador nuclear llamado exportin-5-RanGTP,⁴⁹ donde son procesados por la RNasa III conocida como Dicer para producir finalmente los miRNAs maduros de ~22 nucleótidos.⁵⁰ En humanos, Dicer está asociada a TRBP (*TAR RNA-binding protein*, también conocida como TARBP2)^{51,52} y PACT (también conocida como PRKRA).⁵³ Estas moléculas no son requeridas para el procesamiento de los miRNAs por Dicer, pero parecen contribuir al ensamblaje del complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC, por sus siglas en inglés) (Ver más adelante).⁵¹⁻⁵³ Una vía alternativa de producción de pre-miRNAs es mediante corte y empalme (*splicing* por su nombre en inglés) de pri-miRNAs que se transcriben de regiones intrónicas pequeñas conocidas como mirtrones^{54,55} (Figura 1). Posterior a su procesamiento por Dicer, los miRNAs maduros son reclutados por la proteína AGO, que es un componente del complejo efector conocido como miRISC. En el humano, el ensamblaje del complejo miRISC es promovido por Dicer, TRBP y las proteínas AGO;^{51,53,56} siendo cuatro proteínas AGO las que forman parte del miRISC (AGO1-AGO4).⁵⁷ A su vez, AGO2 se asocia con la proteína GW182, la cual es necesaria para la función de silenciamiento del complejo miRISC.^{58,59}

Una vez incorporado al complejo miRISC, la doble hebra del miRNA maduro se disocia y una hebra es retenida (hebra guía) mientras que la otra es degradada.⁶⁰ La hebra guía se une específicamente al extremo 3' del RNA mensajero (mRNA) blanco y regula su traducción mediante tres posibles mecanismos generales:

- Represión de la traducción.
- Desestabilización del mRNA.
- Degradación del mRNA.

Este último involucra la destrucción de los mRNAs blancos mediante una degradación catalizada por AGO y constituye el mecanismo predominante en plantas.

Por su parte, la mayoría de los miRNAs en el reino animal se unen al extremo 3' de su correspondiente mRNA blanco reconociendo secuencias parcialmente complementarias o imperfectas.⁶¹ Sin embargo, este reconocimiento requiere una comple-

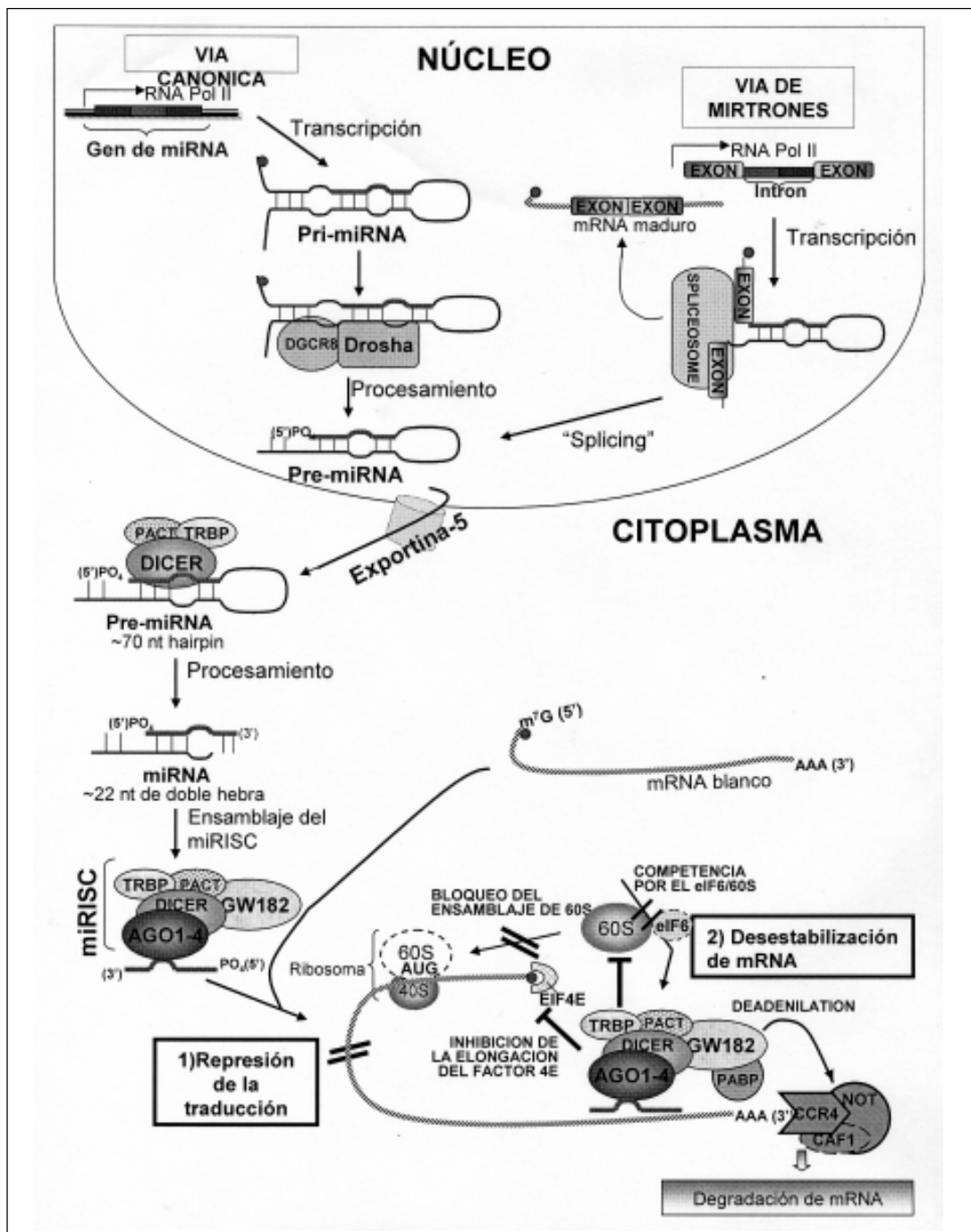


Figura 1. Biogénesis de miRNAs. En el núcleo celular, el gen que codifica para el microRNA (miRNA) es transcrito por una RNA polimerasa II para producir el precursor miRNA primario o pri-miRNA (60-100 nucleótidos) con una estructura de hairpin. El pri-RNA es procesado por el complejo Drosha-DGCR8 para formar el precursor miRNA o pre-miRNA (~70 nucleótidos) con estructura de hairpin, un grupo fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos no pareados en el extremo 3'. El pre-miRNA es transportado al citoplasma a través de la exportina-5-RanGTP. En el citoplasma, la Rnasa III Dicer escinde el pre-miRNA para producir el miRNA maduro de ~22 nucleótidos el cual es reclutado por el complejo enzimático miRISC. Dicer, TRBP, PACT y AGO1-4 participan en el reclutamiento del miRNA en el humano. La hebra guía del miRNA permanece en el complejo miRISC, mientras que la otra es eliminada. La hebra guía del miRNA se une al extremo 3' del mRNA blanco reconociendo secuencias parcialmente complementarias e inhibe la traducción del mRNA blanco o induce la degradación del mismo mediante los mecanismos de represión de la traducción, desestabilización del mRNA y degradación del mRNA. Una vía alternativa de producción de pre-miRNAs es mediante corte y empalme (splicing) de pri-miRNAs que se transcriben de regiones intrónicas pequeñas conocidas como mirtrones.

mentariedad perfecta en una región de 2-7 nucleótidos del miRNA conocida como seed (secuencia semilla), ubicada en el extremo 5' del miRNA.^{62,63} En contraste, la mayoría de los miRNAs en plantas se unen con una complementariedad casi perfecta a sus mRNAs blanco.^{58,61} Esta complementariedad casi perfecta es requerida para inducir el mecanismo de degradación del mRNA, por lo que se asumía que los miRNAs en el reino animal regulaban primordialmente a los mRNAs blanco mediante el mecanismo de represión de la traducción sin afectar directamente los niveles de mRNAs previamente existentes.^{64,65} Sin embargo, Guo, *et al.*⁶⁶ demostraron recientemente que los miRNAs provenientes de humano y ratón inducen también un decremento en los niveles de los mRNAs blanco previamente existentes, lo que sugiere un modelo de desestabilización del mRNA. Estos autores usaron un nuevo método de secuenciación del perfil ribosomal que permite determinar la posición de los ribosomas sobre los mRNAs celulares con una resolución de subcodones.

En animales se conoce que el modelo de represión de la traducción involucra la inhibición del inicio de la traducción^{67,68} o la pérdida del ribosoma o subunidades del ribosoma durante la fase de elongación de la traducción.^{69,70} Por otro lado, el modelo de desestabilización del mRNA involucra la deadenilación (eliminación de la cola de poli-A) para su posterior degradación.⁷¹⁻⁷³ lo cual requiere de la participación de AGO, GW182 y la maquinaria celular para la deadenilación del mRNA.⁷¹ Por último, existen evidencias que indican que el silenciamiento mediado por miRISC podría asociarse con el almacenamiento y procesamiento de mRNAs blancos dentro de los compartimentos celulares conocidos como cuerpos-P, ya que se han encontrado componentes del complejo miRISC y los mRNAs blanco en dichos compartimentos en mamíferos.⁷⁴⁻⁷⁶

NOMENCLATURA Y BASE DE DATOS DE SECUENCIAS DE miRNAs

El sistema de registro de secuencias de miRNAs miRBase Registry asigna el nombre oficial de nuevas secuencias de miRNAs de acuerdo con lineamientos establecidos.^{77,78} Dichos lineamientos señalan que en primer lugar se asigna un prefijo de tres o cuatro letras para indicar la especie donde fue descrito el miRNA, por ejemplo hsa para *Homo sapiens* (humano) y mmu para *Mus musculus* (ratón); sin embargo, este prefijo es frecuentemente eliminado en la literatura. Lo siguiente es asignar el término miR que indica una secuencia de miRNA maduro, segui-

do de un número de identificación único que se asigna de manera secuencial de acuerdo con el orden de la identificación de cada nueva secuencia (por ejemplo hsa-miR-21). En el caso particular de los miRNAs que difieren por sólo uno o dos pares de bases, se agrega un sufijo con letra al nombre original (por ejemplo hsa-miR-15a). Cuando se reportan miRNAs que provienen de diferentes transcritos primarios, pero poseen la misma secuencia, se agrega un sufijo numerado al nombre original (por ejemplo hsa-miR-16-1). El sufijo -5p o -3p se agrega al nombre original cuando dos miRNAs maduros derivan de los brazos opuestos del precursor (por ejemplo hsa-miR-17-5p). La solicitud de registro de nuevas secuencias de miRNAs en el miRBase Registry debe realizarse después de la aceptación de la publicación del artículo que describa su identificación y el nombre oficial debe incluirse en la versión final de dicho documento. Asimismo, el reporte de una nueva secuencia de miRNA requiere de la comprobación experimental de su existencia mediante clonación o expresión del miRNA en cuestión.

La base de datos miRBase es el depósito central de información de secuencias de miRNAs, además de una fuente de recursos para su análisis, puede ser consultada libremente en el sitio <http://microrna.sanger.ac.uk/>. Éste proporciona un servicio confidencial para la asignación independiente del nombre oficial de nuevos miRNAs, además de una base de datos de las secuencias de miRNAs existentes y herramientas para la predicción de blancos moleculares de todos los miRNAs publicados que provienen de animales. Las secuencias de miRNAs registradas en el miRBase se encuentran disponibles directamente en el sitio <ftp://ftp.sanger.ac.uk/pub/mirbase/>, en diferentes formatos que incluyen FASTA y aplicaciones del sistema de manejo de base de datos relacional MYSQL.

MÉTODOS DE DESCUBRIMIENTO, DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE microRNAs

Descubrimiento

Los primeros miRNAs en el reino animal fueron descubiertos mediante la clonación de secuencias de DNA copias (cDNA) procedentes de muestras de RNA total fraccionadas por tamaño (fracción de los RNA pequeños) provenientes de *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*.⁷⁹⁻⁸¹ Anteriormente, los únicos miRNAs identificados como tales eran lin-4 y let-7 (*C. elegans*), aunque eran conocidos como RNA temporales pequeños o stRNAs.⁸²⁻⁸⁴

De hecho, los autores de estos tres trabajos⁷⁹⁻⁸¹ fueron los primeros en acuñar el término microRNAs para describir a este grupo nuevo RNA de ~22 nt, cuyas características son:

- No codifican para un producto proteico.
- Proviene de precursores endógenos con estructura de hairpin.
- Son conservados filogenéticamente.
- Sus secuencias son encontradas en el genoma del organismo correspondiente o alguna especie relacionada (comparadas con una base de datos),
- Su expresión es detectada por hibridización (*Northern blot*).

Precisamente, estos criterios homogenizados de expresión y biogénesis de los miRNAs fueron utilizados para distinguir a los miRNAs de los productos de la fragmentación de otro tipo de RNAs, tales como RNA de transferencia, ribosomales e incluso mensajeros (tRNA, rRNA o mRNA, respectivamente) que pudieran ser también clonados mediante este método.^{79,85,86}

En resumen, esta técnica de descubrimiento consiste en la purificación de RNA de 19-25 nt separados en geles de poliacrilamida a partir de RNA total, seguido por la ligación de oligonucleótidos adaptadores en los extremos 3' y 5'. Posteriormente, se obtiene el cDNA mediante una reacción de transcripción inversa (RT), se lleva a cabo una amplificación mediante una reacción de PCR y se prosigue con la clonación en un vector bacteriano. Le sigue la purificación de los productos de las clonas obtenidas y, por último, la secuenciación de dichos productos mediante métodos de secuenciación de DNA basados en el método de Sanger.^{70-81,87-91}

A partir del 2005, métodos nuevos de secuenciación de DNA conocidos como secuenciación masiva en paralelo o de segunda generación fueron desarrollados y posteriormente aplicados para el descubrimiento de secuencias nuevas de miRNAs en diversos organismos y células tales como *C. elegans*, *Drosophila* y células madre humanas,⁹²⁻⁹⁶ siendo también aplicados a los estudios en cáncer.⁹⁷⁻⁹⁹ Estos métodos superan ampliamente la capacidad y el costo de las tecnologías de secuenciación basadas en el método de Sanger, por lo que han producido una era de descubrimiento de secuencias nuevas de miRNAs sin precedente.^{100,101}

Los métodos disponibles de secuenciación masiva tienen en común que la tecnología en la que se basan permite el procesamiento de millones de lecturas de secuencias a la vez, en contraste con las 96 lectu-

ras ocurridas en las metodologías basadas en el método de Sanger. Esto último se logra mediante el uso de un microrreactor o la unión de las moléculas de DNA blanco individuales a superficies sólidas o perlas separadas físicamente en celdas individuales, para que un mayor número de reacciones de secuenciación puedan realizarse a la vez o en paralelo. Aunado a lo anterior, las reacciones de secuenciación se llevan a cabo directamente sobre moléculas de DNA amplificadas a partir de una biblioteca de DNA (o cDNA) que no ha sido sometida a la clonación en vectores bacterianos ni amplificación de los fragmentos genómicos en bacterias. Lo anterior no es necesario debido a que las moléculas de DNA blanco individuales son ligadas a nucleótidos adaptadores en ambos extremos de cada fragmento de DNA previo a la secuenciación, lo cual permite realizar una amplificación selectiva mediante PCR. Este proceso requiere de tiempos mayores de procesamiento, desde 7 hrs a seis días en contraste con las 3 hrs requeridas en el método de Sanger, pero con un número mayor de pares de bases leídas por corrida que van desde 500,000 a 5,000,000 bp (método de Sanger = 800 bp). Otra diferencia fundamental con la secuenciación basada en el método de Sanger es que la secuenciación masiva en paralelo produce lecturas de secuencias más cortas, que van desde 21 a 400 bp mientras que el primero produce lecturas de secuencias de hasta 800 bp (Cuadro 1).

Los métodos de secuenciación masiva en paralelo disponibles difieren entre sí con respecto al tipo de plataforma (placas o perlas) y adaptadores usados, además del método específico de amplificación y de secuenciación (Cuadro 1); con excepción de las características comunes mencionadas previamente.

Actualmente existen cuatro métodos de secuenciación masiva en paralelo comercialmente disponibles (Cuadro 1):

- Secuenciación por síntesis de terminaciones reversibles o SOLEXA (*Illumina*).
- Sistema de secuenciación masiva paralela por ligación o sistema SOLID (*Applied Biosystem*).
- Pirosecuenciación o secuenciación 454 (Roche).
- Sistema *Helicos Heliscope* (*Helicos bioscience*).

Los tres primeros han sido usados ampliamente para descubrir secuencias nuevas de miRNAs,^{96,97,99} mientras que no hay trabajos publicados todavía donde se utilice el sistema Helicos, aunque en principio puede ser usado para tal fin. Para obtener mayores detalles técnicos con respecto a estos métodos el lector puede acudir a las siguientes revisiones.¹⁰²⁻¹⁰⁴

Cuadro 1. Comparativa de los métodos de secuenciación masiva en paralelo disponibles comercialmente y la secuenciación basada en el método de Sanger.

	454 pirosecuenciación (Roche)	SOLEXA (Illumina)	SOLID (Applied Biosystems)	Helicos Heliscope	Sanger
Método de secuenciación	Pirosecuenciación	Colorantes de terminación reversibles	Secuenciación por ligación	Secuenciación de una sola molécula mediante síntesis	Colorantes de terminación
Método de amplificación	PCR en emulsión	Amplificación por formación de puentes	PCR en emulsión	Ninguna	Clonación y PCR
Tamaño de las secuencias leídas (pares de bases)	400	36-175	35-50	30-35	800
Tiempo de procesamiento o corrida	10 hrs	Seis días	Seis días	Ocho días	3 hrs
Número total de bases leídas por procesamiento o corrida	1,000,000	40,000,000	85,000,000	800,000,000	800
Sitio web	www.454.com	www.illumina.com	www.appliedbiosystems.com solid.appliedbiosystems.com	www.helicosbio.com	
Referencias			102-104		91, 104

La secuenciación masiva en paralelo, en el caso particular de su aplicación para la identificación de miRNAs, va precedida por el enriquecimiento de los RNAs de tamaño pequeño (19-25 nt) mediante columnas de purificación (sistema de purificación de RNA mirVana, de Applied Biosystems) o bien electroforesis, seguido de la creación de una biblioteca de secuencias de cDNA. Esta última involucra la ligación de oligonucleótidos adaptadores en ambos extremos (5' y 3') del RNA mediante una RNA ligasa, seguida de la transformación de RNA a cDNA mediante una reacción de transcripción inversa y frecuentemente una amplificación mediante reacción de PCR.^{94,105} Posterior a la secuenciación, el análisis bioinformático incluye el alineamiento de las lecturas obtenidas con secuencias de genomas de referencia (comparación con secuencias conocidas), o bien las secuencias obtenidas son ensambladas para construir un mapa de transcripción no descrito previamente. Este proceso incluye la eliminación de aquellas secuencias correspondientes a tRNAs, rRNAs y oligonucleótidos adaptadores.

Siguiendo los criterios establecidos en 2003,⁷⁸ el descubrimiento de secuencias nuevas de miRNAs re-

quiere de evidencias de la existencia de un precursor con estructura de hairspin (análisis predictivo) y evidencias de la expresión del miRNA maduro (clonación o *Northern blot*). Sin embargo, debido a que en la secuenciación masiva se identifican millones de secuencias cortas y con alta sensibilidad, se requieren de criterios adicionales aplicados a este tipo de lecturas masivas para establecer un consenso acerca de cómo distinguir los verdaderos miRNAs de los fragmentos derivados de otro tipo de transcritos o bien de otros RNAs de tamaño pequeño.¹⁰⁶⁻¹⁰⁸ Estos criterios se han compilado por el miRBase en un esfuerzo por estandarizar la recolección de datos derivados de la secuenciación masiva¹⁰¹ e incluyen:

- Múltiples lecturas (preferentemente derivadas de experimentos independientes) corresponderán a las secuencias de miRNAs maduros.
- Las lecturas servirán para realizar un mapeo que abarque una región extensa en el genoma (por ensamblamiento de las secuencias cortas que han sido leídas), aunado a que la secuencia adyacente a la correspondiente al miRNA maduro pueda formar una estructura de hairspin (precursores

miRNAs), que al formarse pueda además aparearse con la propia secuencia del miRNA maduro (hebra) y el brazo opuesto de la misma.

- Las lecturas no deben corresponder a otros transcritos correspondientes a otros RNA no-codificantes (rRNAs, tRNAs, snRNAs/snoRNAs o nucleares pequeños, y scRNAs o citoplásmicos pequeños).
- Las lecturas múltiples que han sido localizadas en el genoma (mapeo) deberán corresponder a un mismo extremo 5' de la secuencia del miRNA maduro.
- De manera ideal, las lecturas corresponderán a secuencias maduras de miRNAs en ambos brazos de la estructura predictiva de hairspin, siendo que la secuencia putativa puede ser pareada correctamente con una secuencia de miRNA candidata con un extremo 3' con ~2 nt no-pareados (3'-overhangs).

Detección y cuantificación

Existen varios métodos disponibles para detectar la expresión de miRNAs, entre los que destacan el *Northern blot*, los microarreglos, la hibridización *in situ*, el ensayo Invader miRNA assay y el RT-PCR cuantitativo en tiempo real (qRT-PCR).

El método de *Northern blot* es considerado el más aceptado debido a su amplia estandarización y uso rutinario en el laboratorio. El procedimiento general consiste en separar el RNA total mediante geles de poliacrilamida desnaturalizantes, transferir el RNA del gel a una membrana (nitrocelulosa o nylon), fijar el RNA a la membrana por entrecruzamiento mediante luz ultravioleta e hibridar el contenido de la membrana con oligonucleótidos (sondas) marcados radiactivamente para su posterior detección en placas sensibles a la radiactividad. En el caso especial de la detección de miRNAs, la técnica original de rutina presenta una sensibilidad muy reducida debido a que los miRNAs se encuentran en cantidad baja con respecto al RNA total, aunado a que su tamaño es muy pequeño para hibridar eficientemente con las sondas usadas.

Para incrementar la sensibilidad y eficiencia de esta técnica se desarrollaron dos modificaciones principales: uso de sondas modificadas conocidas como oligonucleótidos sellados o LNA (*Locked Nucleic Acid*)¹⁰⁹ y el uso de carbodiimida soluble para fijar el RNA a la membrana.¹¹⁰ Los LNA son oligonucleótidos, cuyo anillo de furanosa es químicamente modificado para favorecer la conformación 3'-endo (o 'tipo-N' que presentan predominantemente los dú-

plex de DNA tipo A), mediante la introducción de un enlace 2'-O, 4'-C metileno en el 1,2:5,6-di-O-isopropiliden- α -D-alofuranosa, lo que resulta en mayor termoestabilidad y mejor capacidad de reconocimiento de sus blancos.¹¹¹ Así, Valoczi, *et al.*¹⁰⁹ lograron incrementar la sensibilidad del *Northern blot* diez veces usando LNAs, comparado con las sondas tradicionales; mientras que Pall, *et al.*¹¹⁰ lograron incrementar de 20-25 veces la sensibilidad del *Northern blot* usando carbodiimida soluble comparada con el uso de luz ultravioleta. Con ello, las ventajas del *Northern blot* son su alta confiabilidad y que no requiere de reactivos o aparatos sofisticados, por lo que puede ser usado en cualquier laboratorio. Sin embargo, la desventaja radica en que requiere una cantidad relativamente grande de RNA total (20-50 μ g) usando LNAs,¹⁰⁹ que requiere del uso de radiactividad, de la inversión de una cantidad relativamente grande de tiempo y que no pueden analizarse muchos miRNAs diferentes ni muchas muestras a la vez.

Esto último fue mejorado con el desarrollo de los microarreglos. Esta técnica permite analizar simultáneamente cientos de miRNAs diferentes en una muestra y varias muestras a la vez, además requiere de una cantidad relativamente baja de RNA, a nivel de nanogramos.¹¹² Esta técnica también se basa en la detección de sondas marcadas que hibridan con una secuencia complementaria de nucleótidos procedentes de la muestra, esta vez DNA o cDNA. En esta técnica las sondas son inmovilizadas en placas de vidrio mediante enlaces covalentes, de manera que forman una monocapa ordenada sistemáticamente llamada microarreglo. Estos microarreglos pueden contener cientos de sondas diferentes complementarias a secuencias conocidas de miRNAs. El cDNA obtenido a partir del RNA (total o de tamaño pequeño, dependiendo de la plataforma) se marca con un fluorocromo y se agrega a la placa para que hibriden con la sonda complementaria. Finalmente, se analiza la intensidad de la fluorescencia ubicada en las diferentes posiciones de la placa a través de un lector de fluorescencia. Al igual que en el *Northern blot*, esta técnica fue adaptada a la detección de los miRNAs mediante el uso de LNAs. En la técnica original era difícil alcanzar una temperatura de disociación homogénea para todas las sondas diferentes de captura sin comprometer la sensibilidad y especificidad, debido al tamaño pequeño de los miRNAs y a que difieren entre sí por un número reducido de nucleótidos. Se ha demostrado que esta técnica es altamente reproducible y presenta una alta correlación con el qRT-PCR y la secuenciación

masiva, que en general son consideradas más confiables a nivel cuantitativo.¹¹³⁻¹¹⁵ Sin embargo, existen evidencias de una falta de concordancia entre las diferentes plataformas de microarreglos disponibles comercialmente,¹¹⁴⁻¹¹⁵ constituyendo una desventaja con respecto a la comparabilidad de resultados entre los diferentes estudios.

Otro método de detección utilizado ampliamente es el qRT-PCR. Este método permite la cuantificación de miRNAs, tanto de los precursores como de los miRNAs maduros, con alta sensibilidad y especificidad. Al igual que las técnicas anteriores, el qRT-PCR se ha adaptado para la cuantificación de los miRNAs. Estas adaptaciones incluyen:

- Uso de sondas con estructura de rizo en la fase de transcripción inversa (RT) en combinación con el uso de sondas TaqMan en la fase de PCR (*Applied Biosystems*, referencia 116).
- Adición de colas de poli-adenina al RNA en combinación con la transcripción inversa mediante adaptadores de poli-timinas (Qiagen, referencias 117 y 118).
- Uso de sondas LNA (Exigon, referencia 119).

El qRT-PCR presenta la ventaja de cuantificar miRNAs a partir de cantidades muy pequeñas de RNA total, tales como 25 pg (*Applied Biosystems*), 100 pg (Qiagen) y 10 pg (Exigon); además de su alta especificidad. Incluso ya están disponibles placas con cientos de sondas para la cuantificación de 300-800 miRNAs a la vez (*Multiplex, Applied Biosystems*). La desventaja es el precio costoso en comparación con las técnicas alternativas.

Por otro lado, para identificar y localizar a los miRNAs en el propio tejido o en la célula se requiere de la técnica de hibridación *in situ* (ISH). Esta técnica ya fue adaptada para la determinación de miRNAs en vertebrados y plantas mediante el uso de LNAs.^{120,121} Los autores demostraron la efectividad de la detección de miRNAs en cortes de tejido conservados en parafina y fijados con paraformaldehído mediante ISH. La ventaja particular de la ISH es que proporciona la localización del miRNA dentro del tejido; sin embargo, no es posible probar varios miRNAs a la vez como en el caso del microarreglo.

Existe otro método alternativo para la detección de miRNAs llamado *Invader miRNA assay* desarrollado por Allawi, *et al.*¹²² en 2004. Dicho ensayo se basa en el uso de dos oligonucleótidos específicos, uno llamado sonda y el otro, invasor; ambos diseñados para hibridar con aproximadamente la mitad de la secuencia del miRNA blanco (cada uno), pero el

extremo 5' de la sonda no es complementario y queda libre de unirse al miRNA. Al unirse al miRNA, el oligonucleótido invasor se une totalmente a su secuencia complementaria, pero el extremo 5' de la sonda queda sin unirse al miRNA, produciendo en conjunto una estructura que es reconocida por una enzima denominada *Clavase* (nombre en inglés). Esta enzima escinde dicha estructura en la porción no-pareada y el fragmento entonces es liberado. Este fragmento sirve de oligonucleótido complementario para otro oligonucleótido unido a un colorante fluorescente que es adicionado en una segunda fase de la reacción. Se mide entonces la fluorescencia producida. Los autores reportan que este ensayo puede detectar miRNAs directamente de un lisado celular, evitando la necesidad de purificar el RNA, lo cual constituye una ventaja metodológica.

microRNAs COMO BIOMARCADORES EN CÁNCER PULMONAR

En cáncer pulmonar se han reportado alteraciones en los perfiles de expresión de miRNAs en el tejido tumoral comparado con tejido sano adyacente; así como evidencias de que dichos miRNAs tisulares alterados podrían utilizarse en el diagnóstico, clasificación histológica y estimación de la prognosis de este tipo de cáncer.

Yanaihara, *et al.*²⁷ identificaron 43 miRNAs expresados diferencialmente en el tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de NSCLC, al comparar el patrón de expresión de 352 miRNAs conocidos en el tejido tumoral vs. tejido sano adyacente de 104 muestras de pacientes (65 casos del tipo AD y 39 casos del tipo SCC) en diferentes estadios clínicos, usando un método de análisis de microarreglos (ver Métodos de detección). Estos mismos autores analizaron además los miRNAs identificados anteriormente en muestras independientes de 32 pacientes diagnosticados con el tipo AD mediante qRT-PCR, encontrando que la expresión incrementada de hsa-miR-155 y disminuida de hsa-let-7a-2 estaban asociadas a una mala prognosis. Adicionalmente, no se encontraron diferencias en la expresión de miRNAs asociadas a la edad, género o raza en este estudio.

Takamizawa, *et al.*¹²³ reportaron que la expresión disminuida del hsa-miR-let-7 estaba asociada significativamente con una peor prognosis, concordando con el trabajo anterior. En este estudio se analizaron 143 casos de pacientes con diagnóstico de NSCLC (105 casos del tipo AD, 25 del tipo SCC, nueve del tipo LCC y cuatro del tipo carcinomas de células adenoescamosas) mediante qRT-PCR y se comparó la so-

brevida de dos grupos de pacientes clasificados con base en la alta y baja expresión del hsa-miR-let-7.

Por otro lado, Volinia, *et al.*¹²⁴ reportaron 35 miRNAs expresados diferencialmente en tejido tumoral de 123 pacientes con cáncer pulmonar (sin especificar su clasificación histológica) al ser comparado con tejido histológicamente sano adyacente, mediante un análisis de microarreglos de 190 miRNAs conocidos. Entre ellos, los miRNAs hsa-miR-21, -17-5p, -191, -128b, -199a-1 y -155 se encontraron alterados, tanto en cáncer pulmonar como en otros tipos de tumores sólidos como cáncer de colon y de mama, indicando que existen miRNAs comunes en condiciones histopatológicas tumorales.

A su vez, Yu, *et al.*¹²⁵ analizaron la expresión de 157 miRNAs conocidos en tejido congelado de 101 pacientes con diagnóstico de NSCLC mediante qRT-PCR y encontraron que la expresión en conjunto de 5 miRNAs puede ser predictivo de la sobrevida del paciente. El conjunto o huella de 5 miRNAs comprende la expresión de hsa-miR-221 y hsa-let-7a asociada con mayor sobrevida; mientras que la expresión de hsa-miR-137, hsa-miR-372 y hsa-miR-182* está asociada con menor sobrevivencia. La expresión de hsa-let-7a, asociada a una mejor prognosis, coincide con los datos reportados por Yanaihara y Takamizawa.^{27,123}

Raponi, *et al.*¹²⁶ realizaron un estudio para identificar miRNAs expresados diferencialmente en SCC y aquéllos que pudieran usarse como marcadores de prognosis. Estos autores analizaron la expresión de 328 miRNAs conocidos (mediante qRT-PCR) en muestras congeladas de tejido tumoral de 61 pacientes con SCC comparados con diez muestras de tejido pulmonar normal adyacente; encontraron 15 miRNAs expresados diferencialmente en SCC. Entre ellos resalta el hsa-miR-203, que también fue reportado por Yanahaira, *et al.* como uno de los miRNA expresado diferencialmente en SCC (pero no en AD) comparado con tejido pulmonar normal adyacente.²⁷ Estos autores además encontraron (en un estudio a tres años de 54 pacientes con diagnóstico de SCC) que los pacientes con una mayor expresión del hsa-miR-146b presentaron una peor prognosis que los pacientes con una menor expresión de dicho miRNA.

En otro estudio diseñado para identificar marcadores que pudieran predecir la reincidencia de NSCLC después de un tratamiento quirúrgico, Patnaik, *et al.*¹²⁷ analizaron la expresión de 752 miRNAs conocidos en tejido tumoral conservado en parafina de 37 pacientes con recurrencia tumoral (17 AD; 11 SCC y nueve carcinoma bronquioalveolar) y 40 pacientes sin recurrencia tumoral (18 AD; siete SCC y

15 carcinoma bronquioalveolar), en un seguimiento de 32 meses y mediante análisis de microarreglos. Los pacientes seleccionados presentaron NSCLC en estadio I y fueron tratados con resección quirúrgica. Los resultados mostraron que los grupos de comparación presentaron diferentes patrones de expresión de 56 miRNAs, sugiriendo que dichos miRNAs podrían utilizarse como marcadores de predicción de recurrencia tumoral en casos de NSCLC. Este trabajo, además, demostró la factibilidad del análisis de miRNAs extraídos de tejido preservado en parafina, abriendo la posibilidad de estudios retrospectivos de muestras conservadas en los bancos de patología.

Respecto al uso de miRNAs como marcadores para la clasificación histológica, Landi, *et al.*¹²⁸ reportaron 34 miRNAs expresados diferencialmente en AD en relación con SCC en muestras preservadas en parafina de 205 pacientes masculinos fumadores y usando análisis de microarreglos. Cuatro de ellos (hsa-miR26a, hsa-let7g, hsa-let7f y hsa-miR-98) presentaron una diferencia > 2.0 veces en la expresión, convirtiéndolos en candidatos potenciales como biomarcadores de diferenciación de estos subtipos histológicos de NSCLC. Adicionalmente, estos autores identificaron cinco miRNAs (hsa-miR-25, hsa-miR-34c-5p, hsa-miR-191, hsa-let-7e y hsa-miR-34a), cuya expresión en conjunto puede usarse para predecir la sobrevida de pacientes con diagnóstico de SCC en un análisis que incluyó 107 pacientes fumadores del género masculino en etapas tempranas del SSC.

Por su parte, Lebanony *et al.*,¹²⁹ también realizaron un estudio para identificar miRNAs que sirvieran como biomarcadores para diferenciar el SCC del AD, usando un análisis de microarreglos de muestras conservadas en parafina de 62 casos de SCC y 60 casos de AD. Utilizando el qRT-PCR para verificar los hallazgos iniciales y 36 muestras independientes (21 SCC y 15 AD), aunado a un ensayo ciego de validación con 73 muestras extras independientes (24 SCC y 49 AD); se encontró que el hsa-miR-205 es un marcador altamente específico para el subtipo histológico SCC, con 96% de sensibilidad y 90% de especificidad. Este miRNA no fue reportado como posible candidato para distinguir el SCC en el estudio de Landi, *et al.*¹²⁸ Sin embargo, otro trabajo reportado por Bishop, *et al.*¹³⁰ parece confirmar el hallazgo reportado por Lebanony, *et al.* En este trabajo se analizó la expresión del hsa-miR-205 (qRT-PCR) en muestras de tejidos de 52 pacientes con SCC y 50 con AD diagnosticados histológicamente; se encontró que había una correlación de 100% entre el diagnóstico histológico y la alta expresión del hsa-miR-205 en el SCC.

Con la información actualmente disponible existen candidatos potenciales para el diagnóstico, pronóstico (Cuadro 2) y clasificación histológica de tipo AD y SCC (Cuadro 3), los subtipos histológicos más frecuentes de NSCLC. El uso de miRNAs tisulares como biomarcadores ofrece la ventaja de que su expresión no depende de la raza, edad y género, por lo que las alteraciones en su expresión dependerán de la condición patológica que sufra el individuo. Adicionalmente, los miRNAs tisulares pueden ser extraídos con éxito de muestras conservadas en parafina, permitiendo la factibilidad de los estudios retrospectivos. A pesar de las ventajas del uso de miRNAs tisulares como posibles biomarcadores y de las prometedoras evidencias que diferentes estudios han demostrado (como la clasificación correcta de 100% de los casos de SCC con el uso del hsa-miR-205), aún se requiere de la validación independiente de muchos de los miRNAs identificados, así como la homogenización de criterios para su uso futuro en análisis clínicos de rutina. Más aún, es necesario notar que los estudios en cáncer pulmonar no coinciden en el tipo de miRNAs detectados. Existen algunas explicaciones posibles a esta falta de homogeneidad en los resultados y una de ellas es la diferencia en el método de detección utilizado. En

muchos de los casos la técnica de elección para la detección de miRNAs fue la de microarreglos, seguida por la confirmación de los resultados por qRT-PCR. De hecho, los microarreglos son una técnica excelente y confiable para la detección de cientos de miRNAs a la vez, ya que es altamente reproducible y además presenta una alta correlación con el qRT-PCR,¹³¹ el cual se considera un método cuantitativo más confiable por presentar una mayor sensibilidad y especificidad que los microarreglos.¹³² El problema podría radicar en la falta de concordancia entre las diferentes plataformas de microarreglos disponibles comercialmente, ya que se ha demostrado una variación significativa en el número y tipo de miRNAs identificados incluso en el nivel de expresión.^{115,131} Lo anterior podría provocar que ciertas diferencias en los niveles de expresión de miRNAs entre individuos enfermos y sanos no sean detectadas, lo cual constituye una pérdida de información muy valiosa, ya que incluso alteraciones sutiles en la expresión de miRNAs podrían inducir efectos biológicos significativos. Se ha sugerido que estas divergencias entre plataformas se deben a una falta de normalización o bien a una normalización inadecuada de los datos obtenidos en cada estudio en particular, aunada a los criterios diferentes del nivel de astringencia usa-

Cuadro 2. Expresión de miRNAs tisulares asociados a mala prognosis en el cáncer pulmonar.

miRNA	Núm. de muestras analizadas y su clasificación histológica	Núm. de miRNAs analizados	Ensayo	Conservación de la muestra	Referencia
hsa-miR-155 ↑ hsa-let7a-2 ↓	104 (65 AD & 39 SCC) 32 AD	352 73	Microarreglos qRT-PCR	No reportado	Yanaihara, <i>et al.</i> ²⁷
hsa-let7 ↓	105 AD 25 SCC 9 LCC	1	qRT-PCR	No reportado	Takamizawa, <i>et al.</i> ¹²³
hsa-miR-221 ↓ hsa-let-7a ↓ hsa-miR-137 ↑ hsa-miR-372 ↑ has-miR-182* ↑	101 NSCLC	157	qRT-PCR	Tejido congelado	Yu, <i>et al.</i> ¹²⁵
hsa-miR-146b ↑	54 SCC	328	qRT-PCR	Tejido congelado	Raponi, <i>et al.</i> ¹²⁶
hsa-miR-25 ↓ hsa-miR-34c-5p ↓ hsa-miR-191 ↓ hsa-let-7e ↓ hsa-miR-34a ↓	107 SCC (todos fumadores varones)	440	Microarreglos	128	Landi, <i>et al.</i> ¹²⁸

Cuadro 3. Expresión de miRNAs titulares asociados a un tipo histológico de cáncer pulmonar.

miRNA	Expresión asociada	Núm. de muestras analizadas y su clasificación histológica	Núm. de miRNAs analizados	Ensayo	Conservación de la muestra	Referencia
hsa-miR-26 ^a	AD	205 AD	440	Microarreglos	Tejido en parafina	Lendi, <i>et al.</i> ¹²⁸
hsa-let-7g		SCC				
hsa-let-7f		Fumadores masculinos				
hsa-miR-98						
hsa-miR-205	SCC	60 AD 62 SCC	600	Microarreglos	Tejido en parafina	Lebanony, <i>et al.</i> ¹²⁹
		21 SCC 15 AD		qRT-PCR		
		24 SCC 49 AD		qRT-pcr Ensayo ciego		
hsa-miR-205	SCC	52 SCC 50 AD	1	qRT-PCR	Tejido en parafina	Bishop, <i>et al.</i> ¹³⁰

dos en cada una de las diferentes plataformas disponibles.¹³¹ Lo anterior señala la importancia de homogenizar criterios con respecto al método de normalización y astringencia usados en los diferentes estudios donde se utilicen microarreglos para detectar miRNAs.

Asimismo, el uso del propio qRT-PCR en la detección de miRNAs carece de un consenso respecto al tipo de gen de referencia usado para la normalización. Actualmente, existen varios trabajos publicados que presentan como objetivo la validación del gen o genes de referencia para su uso en el qRT-PCR,¹³³⁻¹³⁶ y lo que destaca de estos trabajos son las evidencias de que el uso de genes de referencias menos estables resulta en una diferencia en la capacidad de detección de los miRNAs que sufren variaciones en la expresión al comparar tejido neoplásico vs. sano.¹³⁴ A partir de estos trabajos se sugiere que la validación de los genes de referencia debería realizarse para cada tejido en particular; además, se recomienda el uso de más de un gen para la normalización, lo cual incrementa la precisión de la cuantificación.

En el caso particular de los estudios de miRNAs tisulares en cáncer pulmonar se observa que existe una variedad de plataformas diferentes de miRNAs, el uso común de un solo gen de normalización para qRT-PCR y una variedad de diferentes genes de nor-

malización usadas en los estudios reportados a la fecha. En la actualidad, existe una serie de trabajos publicados, cuyo objetivo es proporcionar una guía homogénea para el reporte resultados de los métodos de identificación/detección más utilizados. Los autores de estos trabajos forman parte de un conjunto de científicos dedicados a un proyecto de estandarización de reporte de resultados conformado por varios grupos de trabajo especializados en diferentes áreas que se reúnen para homogeneizar acuerdos (<http://www.mged.org/Workgroups/>). Así, se tienen:^{137,138}

- Guía MIQE. Información mínima para la publicación de experimentos de qRT-PCR.
- Guía MIAME. Información mínima para la publicación de experimentos de microarreglos.

Precisamente, estas guías para el reporte de datos científicos no sólo serían de gran utilidad en el reporte homogéneo de datos en el caso particular de los miRNAs en cáncer, sino que permitiría a los lectores analizar en cuáles puntos metodológicos radicarían las diferencias en los datos reportados hasta el momento.

Con respecto a si los métodos de extracción de miRNAs pudieran afectar los resultados finales, hasta el momento no se han reportado estudios de com-

paración sistemática entre los diferentes métodos de purificación de miRNAs; sin embargo, en general, se recomienda extraer primero el RNA total para verificar la calidad de los RNAs contenidos en la muestra y después proceder a la purificación de la fracción de RNAs pequeños (sólo si la técnica lo requiere) y proceder a los métodos de detección elegidos. Importan-temente, se han reportado trabajos que indican que el tipo y expresión de miRNAs extraídos de muestras de tejido fijadas en parafina son relativamente estables y consistentes al compararlos con el tipo y expresión de miRNAs extraídos de sus equivalentes conservados en congelación.^{134,139,140}

Por otro lado, cabe señalar que en algunos de los estudios previamente mencionados no se estratificaron en forma rigurosa las muestras de acuerdo con los subtipos histológicos del cáncer pulmonar, por ejemplo en un análisis de muestras de NSCLC sin especificar si éstas corresponden al tipo AD o SCC.¹²⁵ Respecto a los datos reportados por otros autores se sabe que existe una diferencia entre los miRNAs expresados de acuerdo con el subtipo histológico,¹²⁸ lo cual podría causar disparidades en los datos obtenidos. Además, la mayoría de los estudios no mencionan si hubo tratamiento oncológico y el tipo, lo cual podría afectar a éste y a los niveles de los miRNAs detectados al momento de la toma de la muestra. Uno más es que la mayoría de los estudios no menciona una estratificación por estadio clínico de la enfermedad que, aunque no existen evidencias actuales de que los miRNAs pudieran variar a lo largo de los diferentes estadios, si es un factor muy importante que debe considerarse en el análisis, precisamente porque no se conoce el patrón de expresión de los miRNAs durante el progreso de la enfermedad.

La falta de un consenso en los criterios de detección y normalización requiere de ser resuelta, además que sería recomendable establecer criterios de análisis más estrictos con respecto al tipo histológico, estadios clínicos y tratamiento del cáncer pulmonar; sin embargo, los estudios reportados al momento demuestran –sin lugar a duda– el potencial de los miRNAs como biomarcadores aunado a su estabilidad y falta de dependencia del género, edad y raza de los individuos. Más aún, no se debe de perder de vista la posibilidad de usar a los miRNAs como blancos terapéuticos potenciales, ya que la capacidad de un miRNA de regular múltiples mRNAs blancos los convierte en una poderosa herramienta de regulación de la expresión genética sin producir una alteración directa en el DNA. Para ello, se requieren estudios funcionales adicionales que permitan definir las rutas

metabólicas o vías de señalización intracelular reguladas por los miRNAs de interés.

Mientras que estos estudios continúan, debido al innegable potencial de los miRNAs en tejido, el difícil acceso al material biológico en el caso particular del cáncer pulmonar permanece como un problema por resolver. Una alternativa muy atractiva es el análisis de miRNAs en circulación sanguínea.

microRNAs EN CIRCULACIÓN SANGUÍNEA

En 2008, se reportó el hallazgo de miRNAs en el suero y plasma de muestras clínicas, en forma estable y protegidos de la actividad de RNAsas endógenas en circulación sanguínea; además, fueron resistentes a múltiples ciclos de congelamiento-descongelamiento y condiciones de pH extremas.^{141,142} Estas características son deseables en biomarcadores potenciales para el uso clínico de rutina (ver Características de biomarcadores). Rápidamente se encontraron evidencias de que los miRNAs séricos podrían ser biomarcadores potenciales para el diagnóstico de neoplasias malignas, tales como cáncer de próstata, colorrectal y ovárico.¹⁴¹⁻¹⁴⁵ En estos estudios se encontró que los niveles de miRNAs en el suero de pacientes con dichas enfermedades presentan un patrón alterado distinguible de los individuos sanos. Importan-temente, Mitchell, *et al.*¹⁴¹ usaron un modelo de xenotrasplante, donde células humanas de cáncer de próstata son implantadas en ratones NOD/SCID y encontraron a miRNAs de origen humano presentes en el suero de los ratones, lo que indicaba que miRNAs viables en circulación fueron producidos por las células tumorales implantadas.

A la fecha, cuatro estudios han reportado la detección de miRNAs en circulación como biomarcadores potenciales del cáncer pulmonar. Un estudio realizado en una población de origen asiático (China), identificó a los hsa-miR-25 y hsa-miR-223 séricos como candidatos a biomarcadores que permiten distinguir a los individuos con diagnóstico de NSCLC de aquellos clínicamente sanos del grupo control. Lo anterior usando 152 muestras de pacientes con NSCLC comparado con 75 muestras de individuos sanos (de 20-25 años de edad) mediante qRT-PCR.¹⁴² Otro estudio realizado en 2010¹⁴⁶ reportó que en conjunto los miRNAs del suero de pacientes con cáncer de próstata, ovárico y pulmonar podrían ser empleados para discriminar entre los pacientes con cáncer y los individuos sanos, usando un ensayo basado en microarreglos construido con base en 547 secuencias conocidas de miRNAs proveniente de tejido. Sin em-

bargo, este estudio usó únicamente dos muestras de NSCLC y una muestra del grupo SCLC, las cuales presentan diferente comportamiento clínico, además del origen histopatológico distinto.¹⁴⁷ Otro estudio realizado por Séller, *et al.*¹⁴⁸ reportó que los niveles de 24 miRNAs provenientes de la fracción celular de sangre periférica de pacientes diagnosticados con NSCLC estaban alterados significativamente respecto a los individuos sanos, basándose en un análisis de microarreglos de 866 miRNAs tisulares conocidos y qRT-PCR. Este estudio analizó 17 pacientes (siete casos de AD, siete casos de SCC, un caso de carcinoma bronquioalveolar, un caso de carcinoma adenoescamoso y un caso de carcinoide típico) en estadios I a III y 19 individuos sanos. Dicho estudio presentó la desventaja de usar células de sangre periférica, por lo que no es posible descartar la posibilidad de que los miRNAs alterados sean resultado de la respuesta inmunológica de los pacientes. Sin embargo, si los miRNAs cumplen con los criterios necesarios para ser utilizados para diagnóstico (ver Características de un biomarcador), no es un requisito que sea secretado por las células de cáncer. La desventaja principal de este estudio consiste en el número limitado de muestras, y sin datos respecto a tratamientos previos o presencia de comorbilidades (que pudieran afectar el perfil de miRNAs). Incrementar el número de la muestra, así como la estratificación de los casos con tratamiento y sin tratamiento, ayudaría a identificar con mayor certeza a los miRNAs candidatos como biomarcadores en una prueba diagnóstica, independientemente de su origen.

Por último, Hu, *et al.*¹⁴⁹ realizaron un estudio de secuenciación de los miRNAs contenidos en el suero de 60 pacientes con NSCLC (un grupo de 30 pacientes con mayor sobrevida respecto a otro grupo de 30 pacientes con menor sobrevida, en estadios clínicos I-IIIa) en una población de origen asiático (China); usando un método de secuenciación genómica masiva llamado SOLEXA seguido por ensayos de validación cuantitativa mediante qRT-PCR. Este estudio reportó que niveles séricos elevados de hsa-miR-486 y hsa-miR-30d, así como niveles bajos de hsa-miR-1 y hsa-miR-499 estaban asociados a menor sobrevida de pacientes diagnosticados con NSCLC.

Cabe mencionar que en mayo 2011 se publicó en línea un estudio realizado por Chen, *et al.*,¹⁵⁰ donde reportaron el hallazgo de diez miRNAs séricos expresados diferencialmente en pacientes con NSCLC respecto a individuos sanos. Los datos indican que este grupo de miRNAs, en conjunto, es capaz de distinguir a los pacientes con NSCLC de los individuos sanos con alta sensibilidad y especificidad. Los datos

también indican que el uso del conjunto de los diez miRNAs era más confiable que el uso de los miRNAs individuales para una prueba diagnóstica.

Este estudio es la continuación de aquel publicado en 2008 por Chen, *et al.*,¹⁴² los autores reportaron que previamente se identificaron 100 miRNAs expresados diferencialmente en pacientes diagnosticados con NSCLC mediante secuenciación masiva en paralelo; esos 100 miRNAs fueron los que se analizaron en el estudio de 2011 usando 400 muestras de pacientes con NSCLC vs. 220 controles sanos y la técnica de qRT-PCR.

Lo que llama la atención es que de los 100 miRNAs identificados previamente en el estudio de 2008, 21 de ellos no pudieron ser detectados en el estudio de 2011, mientras que 63 fueron detectados de manera confiable. De los 63 miRNAs detectados, sólo diez de ellos fueron expresados diferencialmente en los pacientes con NSCLC vs. controles sanos, lo cual indica una inconsistencia con los datos previos. Si descartamos la posibilidad de una falta de correlación entre los resultados de la secuenciación masiva y el qRT-PCR,¹¹⁵ queda la posibilidad de que la diferencia en el número de muestras usadas en el primero y segundo estudio (25 y 400 muestras, respectivamente) sea lo que marque la diferencia en los datos encontrados. Esto podría reflejar una disparidad en la capacidad de detección del primero y segundo estudio con respecto a diferencias en los niveles de miRNAs entre pacientes y controles. Otros factores que pueden influir son la existencia de tratamiento o no, presencia de metástasis, presencia de otro tipo de cáncer o comorbilidades importantes, etc. Sin embargo, lo anterior no puede ser discutido, ya que el primer estudio no proporciona detalles en su análisis de las muestras, a diferencia de la excelente descripción proporcionada en el trabajo de 2011. A pesar de lo anterior, el estudio de 2011 representa un gran avance en la búsqueda de biomarcadores de diagnóstico del cáncer pulmonar, ya que muestra evidencias de no sólo uno, sino de diez miRNAs potenciales para una prueba diagnóstica no-invasiva. El temor de que se perdiera información valiosa durante la primera etapa del estudio (otro tipo de miRNAs expresados diferencialmente) podría sobrellevarse si estos diez miRNAs resultaran aplicables en la clínica. Recordemos que las pruebas de diagnóstico disponibles son invasivas y dolorosas para el paciente.

Cabe señalar que este primer estudio requiere de verificación por otros grupos de trabajo y con grupos de muestras independientes (ver recomendaciones en Guía de cinco pasos para el desarrollo,

evaluación y validación de biomarcadores). También es importante señalar que estos estudios se han enfocado únicamente en la población asiática y, a diferencia de los miRNAs en tejido, no se han realizado estudios enfocados a verificar la influencia de la raza en los perfiles de expresión de los miRNAs séricos. Por lo anterior sería recomendable verificar estos datos en poblaciones con distintos fondos raciales, pero aun cuando se verificara que existen diferencias en el tipo de miRNAs séricos dependiendo de la raza, lo que procedería es diseñar cuidadosamente una estrategia para utilizar aquellos miRNAs comunes como biomarcadores, ya que las ventajas que ofrece un método no-invasivo en el cáncer pulmonar son inestimables.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Uno de los mayores retos en cáncer, incluyendo el pulmonar, es lograr el desarrollo de tratamientos personalizados basados en las características individuales de cada paciente y del tipo específico de cáncer que presenten. Lo anterior se convierte en una meta necesaria en la lucha contra el cáncer, debido a la heterogeneidad del comportamiento tumoral –aun en el mismo tipo histológico de cáncer– y a la heterogeneidad de la respuesta del propio individuo al tumor y a la terapia; así como a la existencia de factores múltiples (genéticos y ambientales) que inciden en el desarrollo del proceso neoplásico. Al respecto, el uso de los miRNAs como biomarcadores potenciales ofrece un campo prometedor en el desarrollo de pruebas diagnósticas, de clasificación y de seguimiento del comportamiento tumoral; ofreciendo además la alternativa del desarrollo de pruebas no-invasivas. Las evidencias hasta el momento indican claramente que la expresión de miRNAs se encuentra alterada en los procesos neoplásicos, que son tejido-específicos, que parecen no depender de la raza, género o edad; todas ellas, características deseables en biomarcadores. Sin embargo, para que los miRNAs puedan ser usados finalmente en pruebas de uso clínico se requiere de la validación independiente de los datos reportados, además del desarrollo de pruebas diagnósticas o de pronosis validadas clínicamente que puedan ser desarrolladas de manera práctica en un laboratorio e interpretadas fácilmente por personal clínico y de laboratorio. Por otro lado se requiere del uso de múltiples miRNAs como biomarcadores para cubrir la posible heterogeneidad de expresión de una población abierta. A lo anterior se suma la necesidad del desarrollo de pruebas que sean reproducibles en cualquier laboratorio y que

presenten un costo accesible para su implementación como pruebas de rutina, además de la inclusión de controles de calidad que las conviertan en pruebas confiables.

Para que lo anterior pueda ser posible en el cáncer pulmonar, es necesario realizar un diseño cuidadoso de las muestras en un estudio, que incluya la clasificación correcta del tipo histológico y estadio del tumor y el tipo de tratamientos recibidos. Estos factores influyen directamente en el comportamiento tumoral y, por ende, es probable que influyan directamente en el tipo y expresión de miRNAs. Además, existen factores ambientales como la exposición al tabaco (tabaquismo activo o pasivo) y al humo de leña que deben ser cuidadosamente analizados, ya que influyen en el desarrollo y agresividad del cáncer pulmonar. Igualmente importante es la estandarización de las técnicas de obtención y análisis de los miRNAs para su final aplicación como posibles pruebas diagnósticas o de pronosis.

En el caso particular del cáncer pulmonar, donde el índice de mortalidad es el más alto, tanto a nivel mundial como en México, es urgente explorar estrategias alternativas como el uso de los miRNAs como biomarcadores. A este respecto, en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) se han iniciado proyectos de investigación enfocados al uso potencial de los miRNAs en tejido y circulación como biomarcadores para el diagnóstico y pronosis del cáncer pulmonar, bajo el contexto genético y de exposición ambiental de la población mexicana. El INER es un instituto que brinda servicios de salud de tercer nivel y es un centro de investigación de enfermedades respiratorias de la Secretaría de Salud Pública (SSA), en la Ciudad de México. Dichos proyectos incluyen el inicio de colaboraciones con el Instituto Nacional de Cancerología (INCAN, de la SSA) y la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de la Universidad Nacional Autónoma de México (Unidad de Biomedicina-FES Iztacala) para la integración de un equipo de trabajo multidisciplinario que permita consolidar el desarrollo de esta línea de investigación que pretende contribuir a soluciones potenciales para este importante problema de salud pública.

Cabe señalar que este tipo de iniciativas ya se han establecido en otros países como España, donde además se promueve la exploración de este nuevo campo de la investigación, como fue expuesto recientemente en el marco del XXVIII Congreso Nacional y II Internacional de Oncología a través de la ponencia del Dr. Jesús García Foncillas (División de Oncología y Laboratorio de Fármaco-Genómica del Centro para la Investigación Médica Aplicada CIMA

de la Universidad de Navarra España). De acuerdo con la experiencia científica del Dr. Foncillas en cáncer gástrico y colorrectal,^{151,152} es necesario una inversión financiera y tecnológica enfocada a profundizar sobre el papel de los miRNAs involucrados en la progresión histopatológica, proliferación, invasión, metástasis y quimiorresistencia, debido al impacto potencial del uso de los miRNAs en la oncología clínica actual.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología División de Fondo Sectorial de Investigación en Salud y Seguridad social, Proyecto SALUD-2010-01-141984; y la Universidad Autónoma de México, Proyecto PAPIIT-IACOD:IA201611

REFERENCIAS

1. GLOBOCAN 2008 (IARC): Section of Cancer Information (19/6/2011). Available from: <http://globocan.iarc.fr>
2. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 225-49.
3. Ruiz-Godoy L, Rizo Rios P, Sanchez Cervantes F, Osornio-Vargasa A, García-Cuellar C, Meneses García A. Mortality due to lung cancer in Mexico. *Lung Cancer* 2007; 58: 184-90.
4. Goldstraw P, Crowley J, Chansky K, Giroux DJ, Groome PA, Rami-Porta R, et al. The IASLC Lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours. *J Thoracic Oncol* 2007; 2: 706-14.
5. López LFA, Verdugo AC, Figueroa CGS, Flores MS, Togno FR, Marina FF, et al. Epidemiología del cáncer pulmonar en México; hallazgos por imagen. *Rev INER* 2003; 16: 197-204.
6. Laskin JJ, Sandler AB. State of the art in therapy for non-small cell lung cancer. *Cancer Invest* 2005; 23: 427-42.
7. Gkiozos I, Charpidou A, Syrigos K. Developments in the treatment of non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* 2007; 27: 2823-7.
8. Travis WD, Brambilla E, Müller-Hermelink HK, Harris CC (eds.). WHO classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart. Lyon: IARC Press; 2004.
9. Secretaría de Salud. Dirección de estadística, Informática y Evaluación: Estadísticas de mortalidad en México, 2000. México, D.F. 2003. Disponible en: www.ssa.gob.mx
10. Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annu Rev Med* 2003; 54: 73-87.
11. Sato M, Shames DS, Gazdar AF, Minna JD, Hamon. A translational view of the molecular pathogenesis of lung cancer. *J Thorac Oncol* 2007; 2(4): 327-43.
12. Risch A, Plass CE, Chyczewski L. Lung cancer epigenetics and genetics. *Int J Cancer* 2008; 123: 1-7.
13. Hanash S, Taguchi A. The grand challenge to decipher the cancer proteome. *Nat Rev Cancer* 2010; 10: 652-60.
14. Walther A, Johnstone E, Swanton C, Midgley R, Tomlinson I, Kerr D. Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2009; 9: 489-99.
15. Salk JJ, Horwitz MS. Passenger mutations as a marker of clonal cell lineages in emerging neoplasia. *Semin Cancer Biol* 2010 [Epub ahead of print].
16. Zheng YL, Zhou X, Loffredo CA, Shields PG, Sun B. Telomere deficiencies on chromosomes 9p, 15p, 15q and Xp: potential biomarkers for breast cancer risk. *Hum Mol Genet* 2010 [Epub ahead of print].
17. Wang CI, Wang CL, Wang CW, Chen CD, Wu CC, Liang Y, et al. Importin subunit alpha-2 is identified as a potential biomarker for non-small cell lung cancer by integration of the cancer cell secretome and tissue transcriptome. *Int J Cancer* 2010 [Epub ahead of print].
18. Carthew RW. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136: 642-55.
19. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6.
20. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell* 2003; 113: 25-36.
21. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303: 83-6.
22. O'Connell RM, Taganov KD, Boldin MP, Cheng G, Baltimore D. MicroRNA-155 is induced during the macrophage inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 1604-9.
23. van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 18255-60.
24. Fiore R, Siegel G, Schmitt G. MicroRNA function in neuronal development, plasticity and disease. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 471-8.
25. Tang X, Tang G, Özcan S. Role of MicroRNAs in Diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779: 697-701.
26. Calin GA, Croce CM. MicroRNA-cancer connection: the beginning of a new tale. *Cancer Res* 2006; 66: 7390-4.
27. Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* 2006; 9: 189-98.
28. Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* 2008; 299: 425-36.
29. Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer Res* 2010; 70: 36-45.
30. Raponi M, Dossey L, Jatke T, Wu X, Chen G, Fan H, Beer DG. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5776-83.
31. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; 297: 1901-8.
32. Chen Y, Stallings RL. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 2007; 67: 976-83.
33. Calin GA, Ferracin M, Cimmino A, et al. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005; 353: 1793-801.
34. Wu H, Zhu S, Mo YY. Suppression of cell growth and invasion by miR-205 in breast cancer. *Cell Res* 2009; 19: 439-48.
35. Zhang X, Liu S, Hu T, Liu S, He Y, Sun S. Up-regulated microRNA-143 transcribed by nuclear factor kappa B enhances hepatocarcinoma metastasis by repressing fibronectin expression. *Hepatology* 2009; 50: 490-9.
36. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, Allgayer H. MicroRNA-21 (miR-21) post-trans-

- criptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene* 2008; 3(27): 2128-36.
37. Crawford M, Brawner E, Batte K, Yu L, Hunter MG, Otterson GA, et al. MicroRNA-126 inhibits invasion in non-small cell lung carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 5: 373: 607-12.
 38. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther* 2001; 69: 89-95.
 39. Bodovitz S, Patterson S. Protein biomarker strategies. *Drug Discovery World, Fall* 2003; 67-78.
 40. Pepe MS, Etzioni R, Feng Z, Potter JD, Thompson ML, Thornquist M, et al. Phases of biomarker development for early detection of cancer. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93: 1054-61.
 41. Pepe MS. Receiver operating characteristic methodology. *J Am Stat Assoc* 2000; 95: 308-311.
 42. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.
 43. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.
 44. Baskerville S, Bartel DP. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* 2005; 11: 241-7.
 45. Lee Y, Jeon K, Lee JT, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J* 2002; 21: 4663-70.
 46. Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Struct Mol Biol* 2006; 13: 1097-101.
 47. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-9.
 48. Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, et al. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 2006; 125: 887-901.
 49. Bohnsack MT, Czapinski K, Gorlich D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* 2004; 10: 185-91.
 50. Provost P, Dishart D, Doucet J, Frendewey D, Samuelsson B, Rådmark O. Ribonuclease activity and RNA binding of recombinant human. *Dicer EMBO J* 2002; 21: 5864-74.
 51. Chendrimada TP, et al. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 2005; 436: 740-4.
 52. Haase AD, et al. TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Rep* 2005; 6: 961-7.
 53. Lee Y, et al. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J* 2006; 25: 522-32.
 54. Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007; 130: 89-100.
 55. Ruby JG, Jan CH, Bartel DP. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 2007; 448: 83-6.
 56. Liu X, Park JK, Jiang F, Liu Y, McKearin D, Liu Q. Dicer-1, but not Loquacious, is critical for assembly of miRNA-induced silencing complexes. *RNA* 2007; 13: 2324-9.
 57. Azuma-Mukai A, et al. Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 7964-9.
 58. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, Parker R, Hannon GJ. A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 1261-6.
 59. Meister G, Landthaler M, Peters L, Chen PY, Urlaub H, Luhrmann R, Tuschl T. Identification of novel argonaute-associated proteins. *Curr Biol* 2005; 15: 2149-55.
 60. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; 100: 9779-84.
 61. Hutvagner G, Zamore PD. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 2002; 297: 2056-60.
 62. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004; 18: 504-11.
 63. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
 64. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006; 21: 533-42.
 65. Olsen PH, Ambros V. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol* 1999; 216: 671-80.
 66. Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010; 466: 835-40.
 67. Pillai RS, et al. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science* 2005; 309: 1573-6.
 68. Humphreys DT, Westman BJ, Martin DI, Preiss T. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 16961-6.
 69. Wang B, Yanez A, Novina CD. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 5343-8.
 70. Petersen CP, Bordeleau ME, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell* 2006; 21: 533-42.
 71. Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev* 2006; 20: 1885-98.
 72. Giraldez AJ, Mishima Y, Rihel J, Grocock RJ, Van Dongen S, Inoue K, et al. Zebrafish MiR-430 promotes Deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science* 2006; 312: 75-9.
 73. Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid Deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 4034-9.
 74. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nature Cell Biol* 2005; 7: 633-6.
 75. Kedersha N, et al. Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol* 2005; 169: 871-84.
 76. Eulalia A, Behm-Ansmant I, Schweizer D, Izaurralde E. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 3970-81.
 77. Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 2006; 34 (Database issue): D140-D144.
 78. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; 9: 277-9.
 79. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-8.
 80. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 858-62.

81. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 2001; 294: 862-4.
82. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843-54.
83. Moss EG, Lee RC, Ambros V. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell* 1997; 88: 637-46.
84. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 2000; 403: 901-6.
85. Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, et al. A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 2003; 9: 277-9.
86. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Meyer J, Borkhardt A, Tuschl T. New microRNAs from mouse and human. *RNA* 2003; 9: 175-9.
87. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, et al. miRNPs: A novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes & Dev* 2002; 16: 720-8.
88. Reinhart BJ, Bartel DP. Small RNAs correspond to centromere heterochromatic repeats. *Science* 2002; 297: 1831.
89. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Yalcin A, Meyer J, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 2002; 12: 735-9.
90. Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, et al. The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 2003; 17: 991-1008.
91. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463.
92. Ruby JG, Jan C, Player C, Axtell MJ, Lee W, et al. Large-scale sequencing reveals 21U-RNAs and additional microRNAs and endogenous siRNAs in *C. elegans*. *Cell* 2006; 127: 1193-207.
93. Stark A, et al. Systematic discovery and characterization of fly microRNAs using 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res* 2007; 17: 1865-79.
94. Lu C, Meyers BC, Green PJ. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods* 2007; 43: 110-7.
95. Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, et al. MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells* 2008; 26: 2496-505.
96. Ribeiro-dos-Santos Â, Khayat AS, Silva A, Alencar DO, Lobato J, Luz L, et al. Ultra-deep sequencing reveals the microRNA expression pattern of the human stomach. *PLoS One* 2010; 5: e13205.
97. Meiri E, Levy A, Benjamin H, Ben-David M, Cohen L, Dov A, et al. Discovery of microRNAs and other small RNAs in solid tumors. *Nucleic Acids Res* 2010; 38: 6234-46 [454 pyroseq].
98. Jima DD, Zhang J, Jacobs C, et al. Deep sequencing of the small RNA transcriptome of normal and malignant human B cells identifies hundreds of novel microRNAs. *Blood* 2010; 116: e118-e127.
99. Farazi TA, Horlings HM, Ten Hoeve J, Mihailovic A, et al. MicroRNA sequence and expression analysis in breast tumors by deep sequencing. *Cancer Res* 2011 [Epub ahead of print].
100. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat Rev Genet* 2009; 10: 57-63.
101. Kosomara A, Griffiths-Jones S. MiRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* 2011; 39: D152-D157.
102. Mardis ER. Next-Generation DNA Sequencing Methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 2008; 9: 387-402.
103. Mardis ER. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet* 2008; 24: 133-41.
104. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 2009; 55: 641-58.
105. Thomas MF, Ansel KM. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods Mol Biol* 2010; 667: 93-111.
106. Chiang HR, Schoenfeld LW, Ruby JG, Auyeung VC, Spies N, Baek D, et al. Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes. *Genes Dev* 2010; 24: 992-1009.
107. Berezikov E, Liu N, Flynt AS, Hodges E, Rooks M, Hannon GJ, Lai EC. Evolutionary flux of canonical microRNAs and mirtrons in *Drosophila*. *Nat Genet* 2010; 42: 6-9.
108. Hendrix D, Levine M, Shi W. miRTRAP, a computational method for the systematic identification of miRNAs from high throughput sequencing data. *Genome Biol* 2010; 11: R39.
109. Valoczi A, Hornyik C, Varga N, Burgyan J, Kauppinen S, Havelda Z. Sensitive and specific detection of microRNAs by northern blot analysis using LNA-modified oligonucleotide probes. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: e175.
110. Pall GS, Codony-Servat C, Byrne J, Ritchie L, Hamilton A. Carbodiimide-mediated cross-linking of RNA to nylon membranes improves the detection of siRNA, miRNA and piRNA by northern blot. *Nucleic Acids Res* 2007; 35: e60.
111. Koshkin AA, Singh SK, Nielsen P, Rajwanshi VK, Kumar R, Meldgaard M, et al. LNA (Locked Nucleic Acids): synthesis of the adenine, cytosine, guanine, 5-methylcytosine, thymine and uracil bicyclonucleoside monomers, oligomerisation, and unprecedented nucleic acid recognition. *Tetrahedron* 1998; 54(14): 3607-30.
112. Wei Li, Kangcheng Ruan. MicroRNA detection by microarray. *Anal Bioanal Chem* 2009; 394: 1117-24.
113. Pradervand S, Weber J, Thomas J, Bueno M, Wirapati P, Lefort K, et al. Impact of normalization on miRNA microarray expression profiling. *RNA* 2009; 15: 493-501.
114. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One* 2009; 4: e5540.
115. Pradervand S, Weber J, Lemoine F, Consales F, Paillusson A, Dupasquier M, et al. Concordance among digital gene expression, microarrays, and qPCR when measuring differential expression of microRNAs. *Biotechniques* 2010; 48(3): 219-22.
116. Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, et al. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e179.
117. Shi R, Chiang VL. Facile means for quantifying microRNA expression by real-time PCR. *Biotechniques* 2005; 39: 519-25 [qPCR using poly(A) tailing].
118. QIAGEN. Available from: http://www1.qiagen.com/products/miRNA/miScriptSys_tem.aspx
119. Raymond CJ, Roberts BS, Garrett-Engle P, Lim LP, Johnson JM: Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 2005; 11: 1737-44 [qPCR_LNA primers].
120. Wienholds E, Kloosterman WP, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Berezikov E, de Bruijn E, et al. MicroRNA expression in zebrafish embryonic development. *Science* 2005; 309: 310-1 [ISH].
121. Valoczi A, Varallyay E, Kauppinen S, Burgyan J, Havelda Z. Spatio-temporal accumulation of microRNAs is highly coordinated in developing plant tissues. *Plant J* 2006; 47: 140-51 [ISH].

122. Allawi HT, Dahlberg JE, Olson S, Lund E, Olson M, Ma WP, et al. Quantitation of microRNAs using a modified Invader assay. *RNA* 2004; 10: 1153-61.
123. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, et al. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64: 3753-6.
124. Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2257-61.
125. Yu SL, Chen HY, Chang GC, et al. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell* 2008; 13: 48-57.
126. Raponi M, Dossey L, Jatke T, Wu X, Chen G, Fan H, Beer DG. MicroRNA classifiers for predicting prognosis of squamous cell lung cancer. *Cancer Res* 2009; 69: 5776-83.
127. Patnaik SK, Kannisto E, Knudsen S, Yendamuri S. Evaluation of microRNA expression profiles that may predict recurrence of localized stage I non-small cell lung cancer after surgical resection. *Cancer Res* 2010; 70: 36-45.
128. Landi MT, Zhao Y, Rotunno M, Koshiol J, Liu H, Bergen AW, et al. MicroRNA expression differentiates histology and predicts survival of lung cancer. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 430-41.
129. Lebanony D, Benjamin H, Gilad S, Ezagouri M, Dov A, Ashkenazi K, et al. Diagnostic assay based on hsa-miR-205 expression distinguishes squamous from nonsquamous non-small-cell lung carcinoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 2030-7.
130. Bishop JA, Benjamin H, Cholkh H, Chajut A, Clark DP, Westra WH. Accurate classification of non-small cell lung carcinoma using a novel microRNA-based approach. *Clin Cancer Res* 2010; 16: 610-9.
131. Sato F, Tsuchiya S, Terasawa K, Tsujimoto G. Intra-platform repeatability and inter-platform comparability of microRNA microarray technology. *PLoS One* 2009; 4: e5540.
132. Chen Y, Gelfond JA, McManus LM, Shireman PK. Reproducibility of quantitative RT-PCR array in miRNA expression profiling and comparison with microarray analysis. *BMC Genomics* 2009; 28; 10: 407.
133. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004; 64: 5245-50.
134. Peltier HJ, Latham GJ. Normalization of microRNA expression levels in quantitative RT-PCR assays: Identification of suitable reference RNA targets in normal and cancerous human solid tissues. *RNA* 2008; 14: 844-52.
135. Chang KH, Mestdagh P, Vandesompele J, Kerin MJ, Miller N. MicroRNA expression profiling to identify and validate reference genes for relative quantification in colorectal cancer. *BMC Cancer* 2010; 29(10): 173.
136. Latham GJ. Normalization of microRNA quantitative RT-PCR data in reduced scale experimental designs. *Methods Mol Biol* 2010; 667: 19-31.
137. Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 2009; 55(4): 611-22.
138. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet* 2001; 29(4): 365-71.
139. Xi Y, Nakajima G, Gavin E, Morris CG, Kudo K, Hayashi K, Ju J. Systematic analysis of microRNA expression of RNA extracted from fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded samples. *RNA* 2007; 13(10): 1668-74.
140. Leite KR, Canavez JM, Reis ST, Tomiyama AH, Piantino CB, Sañudo A, et al. miRNA analysis of prostate cancer by quantitative real time PCR: Comparison between formalin-fixed paraffin embedded and fresh-frozen tissue. *Urol Oncol* 2009 [Epub ahead of print].
141. Mitchell PS, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008; 105: 10513-8.
142. Chen X, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006.
143. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010; 127: 118-26.
144. Ng EK, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* 2009; 58: 1375-81.
145. Resnick KE, Alder H, Hagan JP, Richardson DL, Croce CM, Cohn DE. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol Oncol* 2009; 112: 55-9.
146. Lodes MJ, Caraballo M, Suci D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009; 4: e6229.
147. Petersen I, Langreck H, Wolf G, Schwendel A, Psille R, Vogt P, et al. Small-cell lung cancer is characterized by a high incidence of deletions on chromosomes 3p, 4q, 5q, 10q, 13q and 17p. *Br J Cancer* 1997; 75: 79-86.
148. Keller A, Leidinger P, Borries A, Wendschlag A, Wucherpfennig F, Scheffler M, et al. miRNAs in lung cancer-studying complex fingerprints in patient's blood cells by microarray experiments. *BMC Cancer* 2009; 9: 353.
149. Hu Z, Chen X, Zhao Y, Tian T, Jin G, Shu Y, et al. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28: 1721-6.
150. Chen X, Hu Z, Wang W, Ba Y, Ma L, Zhang C, et al. Identification of ten serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as novel non-invasive biomarkers for non-small cell lung cancer diagnosis. *Int J Cancer* 2011. DOI: 10.1002/ijc.26177 [Epub ahead of print].
151. Bandres E, Bitarte N, Arias F, Agorreta J, Fortes P, Agirre X, et al. microRNA-451 regulates macrophage migration inhibitory factor production and proliferation of gastrointestinal cancer cells. *Clin Cancer Res* 2009; 15(7): 2281-90.
152. Monzo M, Navarro A, Bandres E, Artells R, Moreno I, Gel B, et al. Overlapping expression of microRNAs in human embryonic colon and colorectal cancer. *Cell Research* 2008; 18: 823-33.

Reimpresos:

Blanca Ortiz-Quintero

Investigadora en Ciencias Médicas
Unidad de Investigación
Instituto Nacional de Enfermedades
Respiratorias Ismael Cosío Villegas
Clzd. de Tlalpan Núm. 4502
Col. Sección XVI
14080, México D.F.
Tel.: (52) (55) 5487-1705
Fax: (52) (55) 5665-4623
Correo electrónico: boq@iner.gob.mx

Recibido el 17 de noviembre 2010.
Aceptado el 8 de julio 2011.