

MicroRNAs – Biogênese, funções e seu papel potencial na carcinogênese oral

MicroRNAs – Biogenesis, functions and its potential role in oral carcinogenesis

Bruna Aguiar do Amaral¹, Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Roseana de Almeida Freitas², Lélia Batista De Souza², Leão Pereira Pinto²

¹Doutorando - Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

²Professor Doutor - Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral - Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN

DESCRIPTORIOS:

Câncer. MicroRNA. Cavidade oral. Carcinogênese.

Keywords:

Cancer. MicroRNA. Oral cavity. Carcinogenesis.

RESUMO

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codantes, conservados ao longo da evolução, capazes de regular a expressão gênica através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro. A expressão dos miRNAs se apresenta desregulada em diversos processos patológicos, incluindo o câncer. Dependendo do contexto e do tipo celular em que são expressos, um mesmo miRNA pode exibir atividade oncogênica ou supressora tumoral. Dessa forma, a função dos miRNAs pode, em última instância, depender do microambiente específico de determinado tipo celular, o qual pode prover diferentes repertórios de genes-alvo. Entretanto, as alterações na expressão dos miRNAs podem constituir um achado secundário ao próprio fenótipo tumoral e, dessa forma, ainda não está completamente claro se a expressão alterada dos miRNAs constitui causa ou consequência da transformação maligna. O presente estudo realiza uma revisão da literatura sobre miRNAs, enfocando aspectos relacionados à biogênese, mecanismos de ação e o papel potencial desses pequenos RNAs na carcinogênese oral.

ABSTRACT

MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNAs, preserved throughout the evolution, able to regulate gene expression through repression of translation or degradation of target molecules of messenger RNA. The expression of miRNA is deregulated in several pathological processes, including cancer. Depending on the context and the cell is type they are expressed, one can view miRNA oncogenic or tumor suppressor activity. Thus, the function of miRNA may ultimately depend on the specific microenvironment of a particular cell type, which can provide different repertoire of target genes. However, changes in expression of miRNA may be secondary to the tumor phenotype. Thus, is not completely clear whether the altered expression of miRNAs is cause or consequence of malignant transformation. This study performs a literature review of miRNA, focusing on aspects related to biogenesis, mechanisms of action and potential role of these small RNAs in oral carcinogenesis.

105

Endereço para correspondência

Prof. Dr. Leão Pereira Pinto
Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral
Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Av. Senador Salgado Filho, 1787 – Lagoa Nova – Natal – RN – Brasil - CEP 59056-000 Fone/fax: +55 84 3215-4138
e-mail: leao@pesquisador.cnpq.br

INTRODUÇÃO

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs não-codantes, conservados ao longo da evolução, capazes de regular a expressão de genes em nível pós-transcricional através da degradação ou repressão da tradução de moléculas-alvo de RNA mensageiro (RNAm)⁹. Os miRNAs têm sido implicados na maioria das principais funções celulares, como proliferação, diferenciação, apoptose, resposta ao estresse e regulação transcricional^{9,19}.

Até o momento 678 miRNAs foram caracterizados³². Como os miRNAs podem regular mais de um RNAm-alvo³³,

estima-se que estes pequenos RNAs controlem a expressão de aproximadamente 30% dos genes que codificam proteínas²³. Dessa forma, os miRNAs são considerados uma das classes de genes regulatórios mais abundantes em humanos, constituindo um mecanismo-chave no processo de regulação gênica²⁹.

A expressão dos miRNAs se apresenta desregulada em diversos processos patológicos, incluindo o câncer^{29,40-42}. A localização dos genes miRNA em sítios frágeis do genoma e as marcantes variações na expressão destas moléculas em diversas neoplasias provêm evidência circunstancial para a participação dos miRNAs na etiopatogênese tumoral⁴².

Pesquisas revelam que os miRNAs podem atuar como

supressores tumorais^{12,19,39,41} ou oncogenes^{12,40,41}. Os miRNAs oncogênicos encontram-se superexpressos em tumores malignos e atuam estimulando a proliferação celular e inibindo a ação de genes supressores tumorais e genes que controlam a apoptose^{9,41}. Por sua vez, alguns miRNAs apresentam expressão reduzida em tumores malignos, sendo considerados supressores tumorais^{29,41}. Estes miRNAs atuam contra o desenvolvimento de neoplasias através da inibição de oncogenes^{9,12,41}.

O presente estudo realiza uma revisão da literatura sobre miRNAs, enfocando aspectos relacionados à biogênese, mecanismos de ação e o papel potencial dessas pequenas moléculas de RNA na carcinogênese oral.

REVISÃO DA LITERATURA

BIOGÊNESE E MECANISMOS DE AÇÃO DOS MIRNAS

A biogênese dos miRNAs inclui sua transcrição no núcleo celular, exportação para o citoplasma e subsequente processamento e maturação³². Na maioria dos casos, a transcrição dos genes miRNAs é mediada pela RNA polimerase II³⁰, uma enzima que também é responsável pela transcrição de genes que codificam proteínas^{9,33}.

Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias³³, como as regiões “stem”, em que dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “loop”, nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares³³. No núcleo, os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui Drosha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita³². A estrutura resultante, designada miRNA precursor (pre-miRNA), é exportada para o citoplasma por meio da exportina-5³².

No citoplasma, os pre-miRNAs são processados por Dicer^{32,42}, que remove a alça na estrutura stem-loop^{30,33,42}, resultando na formação de um dúplice de RNA^{30,32}. Este dúplice de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual as duas fitas de RNA são separadas^{33,42}. Uma destas fitas permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro^{10,30}, ao passo que a fita complementar sofre degradação^{10,30,33}.

MECANISMOS DE AÇÃO DOS MIRNAS

O complexo miRNA e RISC (miRISC) regula a expressão gênica por meio de dois mecanismos: degradação do RNAm e repressão da tradução do RNAm⁴². Dependendo do grau de complementaridade entre as bases do miRNA e do RNAm^{29,33}, uma das duas vias regulatórias pode ser utilizada: a via do RNA interferente pequeno (siRNA) e a via do miRNA⁹.

Se a complementaridade entre RNAm e miRNA é quase perfeita, o RNAm será processado através da via siRNA⁹. Nestes casos, uma ribonuclease presente em RISC catalisa uma clivagem endonucleolítica do RNAm⁹. Apesar da existência da via regulatória siRNA em células humanas, a maioria dos RNAm humanos são processados através da via miRNA^{9,42}.

Os mecanismos de ação do complexo miRISC permanecem incompletamente elucidados⁵. A repressão da tradução pode ocorrer durante o início da tradução ou após este⁵. No início da tradução, podem ocorrer o bloqueio da associação da subunidade ribossômica 60S ao complexo de pré-iniciação 40S e a deadenilação da cauda poli-A^{2,5}. Os mecanismos posteriores ao início da tradução incluem: dissociação prematura dos ribossomos, diminuição da taxa de alongamento e degradação do polipeptídeo nascente^{27,32}. O complexo miRISC pode,

ainda, aumentar a degradação dos transcritos através do recrutamento de enzimas decapantes e deadenilantes².

Os RNAm silenciados pelos miRNAs se acumulam em compartimentos no citoplasma, denominados corpos de processamento^{9,25}. Estes são ricos em enzimas que podem promover deadenilação, decapamento ou degradação do RNAm^{2,9}. Embora os RNAm também possam ser temporariamente estocados no interior destas estruturas^{9,32}. A compartimentalização do RNAm nos corpos de processamento constitui um mecanismo importante no controle do processo de tradução²⁵.

MIRNAS E CÂNCER

O câncer é uma doença genética e epigenética que requer a inativação de genes supressores tumorais e a ativação de proto-oncogenes. Neste processo, seqüências de DNA mutadas são transcritas em RNAm e posteriormente traduzidas em proteínas funcionalmente aberrantes¹³. Entretanto, o RNA não é um produto intermediário passivo³¹. A expressão de genes também depende de mecanismos baseados em RNAs, como splicing alternativo, miRNAs e edição de RNAs³¹.

Como os miRNAs afetam a expressão gênica, estes RNAs representam moléculas importantes na manutenção do equilíbrio entre oncogenes e genes supressores tumorais¹⁰. Alguns miRNAs promovem a proliferação celular e inibem a apoptose, ao passo que outros determinam diminuição da sobrevivência e da proliferação celular⁹. Estas duas classes de miRNAs são designadas, respectivamente, miRNAs oncogênicos^{12,40,41} e miRNAs supressores tumorais^{12,19,39,41}. Dependendo do contexto e do tipo celular em que são expressos, um mesmo miRNA pode exibir atividade oncogênica ou supressora tumoral^{29,42}. Além disso, um único miRNA é capaz de regular diversos genes-alvo⁴² e, com isso, controlar simultaneamente atividades opostas, como a proliferação celular e a apoptose²⁹.

Um dos primeiros indícios do envolvimento dos miRNAs na carcinogênese foi a identificação das seqüências que codificam o miR-15 e o miR-16 em uma região crítica do cromossomo 13q14, que está deletada em mais da metade dos casos de leucemia linfocítica crônica³. Desde então, alterações na expressão dos miRNAs têm sido detectadas em diversos tumores, como no câncer de mama¹⁶, colorretal¹ e linfomas¹¹.

Os mecanismos responsáveis pelas alterações na expressão dos miRNAs no câncer são diversos⁹. Estudos revelam que as funções dos miRNAs nas neoplasias malignas sofrem alterações pelos mesmos mecanismos que afetam a expressão dos genes que codificam proteínas⁹. Dessa forma, as modificações na expressão dos miRNAs podem ser resultantes de alterações epigenéticas ou de modificações nas seqüências de DNA, como amplificações, translocações, deleções e mutações de ponto⁹.

MIRNAS COMO ONCOGENES

Os miRNAs oncogênicos revelam expressão aumentada em neoplasias malignas, promovendo o desenvolvimento tumoral através do estímulo à proliferação celular e/ou inibição de genes que regulam apoptose⁹ e genes supressores tumorais^{12,41}.

O miR-155 foi um dos primeiros miRNAs oncogênicos a ser identificado. Embora os RNAm-alvo para o miR-155 permaneçam desconhecidos, estudos pioneiros constataram que a superexpressão deste miRNA determinava um aumento no desenvolvimento de linfomas e leucemias em galinhas³⁴. Estudos mais recentes revelaram que a alta expressão de miR-155 em linfomas de grandes células B difuso estava associada à presença de variantes mais agressivas desses tumores e pobre sobrevivência dos pacientes¹¹.

Um grupo de miRNAs, designado miR-17-92, constitui

um dos principais exemplos de miRNAs oncogênicos. Este grupo está localizado no cromossomo 13q31, um locus gênico, que se apresenta amplificado no câncer de pulmão e em diversos tipos de linfoma^{14,15}. Comparado aos tecidos normais, a expressão de miR-17-92 se encontra aumentada em carcinomas de pulmão e linfomas, particularmente nas formas mais agressivas destes tumores, como o carcinoma pulmonar de células pequenas e os linfomas de células B^{14,15}.

MiR-372 e miR-373 são exemplos adicionais de miRNAs com atividade oncogênica, particularmente em tumores de células germinativas testiculares³⁷. Nessas lesões, estes miRNAs promovem a proliferação celular e o desenvolvimento de tumores, por neutralizar a inibição de quinases ciclina-dependentes, mediada pela proteína p53 através da inibição direta da expressão do gene supressor tumoral *LATS37*.

MIRNAS COMO GENES SUPRESSORES TUMORAIS

Uma diminuição global nos níveis de miRNAs tem sido observada em tumores malignos, indicando que estes RNAs podem apresentar uma função supressora tumoral intrínseca²⁹. Lu et al.²⁶ (2005) foram os primeiros a demonstrar que a expressão de muitos miRNAs estava significativamente reduzida em diversos cânceres.

A princípio, os MIRNAS não se comportam como genes supressores tumorais “clássicos”, os quais são inativados por meio da mutação de ambos alelos⁴². As funções supressoras dos MIRNAS são perdidas quando os níveis destes RNAs se encontram abaixo de um limiar crítico, seja por redução da carga gênica ou outros mecanismos, resultando em aumento dos produtos oncogênicos e, conseqüentemente, na expressão do fenótipo tumoral⁴².

A família *let-7* foi o primeiro grupo de miRNAs ao qual se atribuiu atividade regulatória sobre a expressão de um oncogene²⁹. Johnson et al.¹⁷ (2005) observaram que a superexpressão da proteína ras, em câncer de pulmão, correlacionava-se com a expressão reduzida de *let-7*. Além disso, estes autores observaram que cânceres de pulmão, comparados ao tecido pulmonar normal, exibiam níveis elevados de ras e níveis reduzidos de *let-7*.

Desde então, estudos têm constatado uma sub-regulação nos níveis de diversos miRNAs em tumores malignos, como miR-143 e miR-145 em cânceres colorretais¹, miR-145 em cânceres de mama¹⁶ e miR-29b em leucemias linfocíticas crônicas²⁸.

MICRORNA E CÂNCER ORAL

Estudos sobre o papel dos miRNAs no câncer oral são escassos e limitam-se a avaliar apenas carcinomas epidermóides orais (CEOs)^{6,19,39,40}.

Childs et al.⁶ (2009) compararam a expressão de 236 miRNAs entre carcinomas epidermóides (CEs) de cabeça e pescoço e amostras de tecido normal, através de RT-PCR e microarray. A maioria dos miRNAs, como o miR-1, miR-133a, miR-205 e *let-7d*, revelou expressão reduzida nos carcinomas. Análises univariadas e multivariadas revelaram associação entre baixos níveis de expressão de miR-205 e recorrência loco-regional. Além disso, baixos níveis de expressão de miR-205 e *let-7d* nos carcinomas exibiu associação com pobre sobrevida dos pacientes. Para Childs et al.⁶ (2009), os níveis de expressão de miR-205 e *let-7d* poderiam ser utilizados como marcadores prognósticos em carcinomas de cabeça e pescoço.

Wong et al.³⁹ (2008) avaliaram a expressão de 156 miRNAs em CEs de língua e verificaram níveis reduzidos de miR-133a e miR-133b nessas lesões. Em células de CEs de língua

transfectadas com precursores de miR-133a e miR-133b, constatou-se redução da proliferação celular, aumento da apoptose e redução na expressão da proteína piruvato-quinase tipo M2, um oncogene potencial em tumores malignos³⁹. Dessa forma, a redução nos níveis de miR-133a e miR-133b se constitui em um dos mecanismos responsáveis pela expressão desregulada da proteína piruvato-quinase tipo M2 em CEs de língua³⁹.

Kozaki et al.¹⁹ (2008) compararam o perfil de expressão de 148 miRNAs em linhagens celulares de CEOs e ceratinócitos orais imortalizados por meio de RT-PCR e constataram expressão reduzida de 54 miRNAs (36,5%) nos CEOs. As linhagens celulares dos CEOs exibiram, com maior frequência, subexpressão de miR-137 e miR-193a. Tais alterações foram decorrentes de hipermetilação tumor-específica. Além disso, a transfecção ectópica de miR-137 e miR-193a nas linhagens celulares dos CEOs reduziu significativamente o crescimento celular. Para os autores, miR-137 e miR-193a constituem supressores tumorais que são epigeneticamente silenciados nos CEOs.

Wong et al.⁴⁰ (2008) avaliaram a expressão de 156 miRNAs em CEs de língua e amostras de tecido normal através de RT-PCR e identificaram superexpressão de 24 MIRNAS nos tumores. Em seqüência, a expressão destes 24 MIRNAS foi avaliada em 20 casos de CE de língua e 20 amostras de tecido normal. Apenas o miR-184 se manteve superexpresso em todos os CEOs. Além disso, a inibição deste miRNA em linhagens celulares de CEs resultou em subexpressão de *c-myc*, redução da proliferação celular e indução de apoptose. Dessa forma, a superexpressão de miR-184 pode desempenhar um papel oncogênico nos CEs de língua, atuando nos processos de apoptose e proliferação celular⁴⁰.

DISCUSSÃO

Desde as primeiras evidências de que os miRNAs poderiam estar envolvidos no desenvolvimento de tumores³, diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de esclarecer o papel destes RNAs não-codantes na carcinogênese^{6,19,26,36,40}. Os resultados obtidos constituem um corpo crescente de evidências do envolvimento dos miRNAs na tumorigênese^{19,21,38}.

Ainda não está esclarecido se a expressão alterada dos miRNAs em tumores constitui causa ou consequência da transformação maligna²⁹. Uma proporção importante de genes miRNA localiza-se em regiões cromossômicas potencialmente suscetíveis a anormalidades^{4,42}. Coerentemente, no estudo de Calin et al.⁴ (2004), mais da metade dos 186 genes miRNA avaliados localizavam-se em regiões genômicas que apresentavam alterações associadas ao câncer, como: regiões mínimas de perda de heterozigossidade, regiões mínimas de amplificação, e, menos comumente, regiões de quebras cromossômicas. Tais achados provêm evidência circunstancial para a participação dos miRNAs na etiopatogênese de tumores^{4,42}.

Entretanto, Kumar et al.²¹ (2007) comprovaram que a redução na expressão de miRNAs era capaz de promover o desenvolvimento de tumores. Utilizando linhagens celulares neoplásicas malignas de camundongos e humanos, os níveis gerais de expressão dos miRNAs foram reduzidos através da supressão das enzimas de processamento Droscha e Dicer. As células revelaram proliferação aumentada e, quando injetadas em camundongos, determinaram desenvolvimento de tumores mais invasivos e com maiores taxas de crescimento²¹. Tais resultados sugerem que a perda global dos miRNAs estimula a tumorigênese²¹.

A despeito dos achados anteriormente relatados, ainda é discutível se a quantidade global de miRNAs diminui ou aumenta nas neoplasias malignas⁴². Lu et al.²⁶ (2005) compa-

raram o perfil de expressão de 217 miRNAs em cânceres diversos e tecidos normais e constataram uma redução global da expressão dos miRNAs nas neoplasias. Volinia et al.³⁶ (2006) avaliaram a expressão de 228 miRNAs em tumores malignos e observaram quantidades aumentadas de 26 miRNAs, sem qualquer redução nos níveis dos demais miRNAs. Os resultados divergentes apresentados por esses estudos podem ser decorrentes de diferenças no processo de isolamento do RNA, na escolha dos padrões internos utilizados para normalizar as perdas durante o isolamento da amostra e nos métodos de avaliação dos miRNAs⁴².

As alterações na expressão dos miRNAs podem ser secundárias ao próprio fenótipo tumoral⁴². Schmittgen³⁰ (2008) destaca que a expressão aumentada ou diminuída da enzima Droscha e/ou Dicer pode determinar aumento ou redução global, respectivamente, na expressão dos miRNAs. Até o momento, dados sobre o papel potencial das alterações na expressão destas enzimas em cânceres são inconsistentes³⁰. Apesar dos relatos de aumento nos níveis de Dicer em tumores malignos⁷, outras pesquisas revelam expressão reduzida¹⁸ ou nenhuma alteração nos níveis desta enzima²⁶.

Um único miRNA pode regular vários genes-alvo diferentes⁴² e, assim, controlar simultaneamente processos celulares distintos, como a proliferação e a apoptose²⁹. Dessa forma, determinados miRNAs podem atuar como supressores tumorais em certos cânceres e oncogênicos em outros³⁸. Por exemplo, apesar de o grupo miR-17-92 ser caracterizado como oncogênico^{14,15}, a região cromossômica onde este grupo se localiza geralmente é deletada em carcinomas hepatocelulares²⁴. Com isso, a função dos miRNAs pode, em última instância, depender do microambiente específico de determinado tipo celular, o qual provê diferentes repertórios de genes-alvo^{29,42}.

Embora alguns miRNAs apresentem uma correlação nítida entre a sua expressão e o não desenvolvimento de tumores, a escassez de dados a respeito da função destes não permite implicar uma atividade supressora tumoral¹². Por exemplo, miR-128, miR-181a, miR-181b e miR-181c são subexpressos de forma consistente em glioblastomas⁸, e miR-122 encontra-se sub-regulado em carcinomas hepatocelulares²². Contudo, as alterações na expressão destes miRNAs podem ser reflexo da desdiferenciação das células neoplásicas e não necessariamente a causa destes tumores^{8,22}.

Um aspecto importante a ser considerado nos estudos sobre o papel dos miRNAs na carcinogênese são as metodologias empregadas. Embora análises Northern blot, RT-PCR e microarray sejam capazes de determinar quais miRNAs podem estar associados ao surgimento de cânceres, essas técnicas não permitem determinar se as alterações na expressão destes RNAs constituem a causa do desenvolvimento tumoral ou um achado secundário ao próprio fenótipo neoplásico⁴¹. Tais limitações podem ser superadas por meio da super- ou subregulação de miRNAs com utilização de inibidores antissensor, transgênicos, promotores específicos e mutantes de ponto⁴¹.

Pesquisas têm demonstrado que o perfil de expressão dos miRNAs pode ser utilizado no diagnóstico e prognóstico de tumores malignos^{6,11}. Além disso, estudos de vanguarda revelam que os miRNAs podem constituir importantes ferramentas terapêuticas^{20,35}. Neste contexto, miRNAs com atividades oncogênicas poderiam ser suprimidos ou miRNAs supressores tumorais poderiam ter sua expressão estimulada¹⁰. Recentemente, um estudo em ratos reportou marcante redução nos níveis de miR-16, miR-122, miR-192 e miR-194, após utilização de RNAs antissensor modificados²⁰. Além disso, uma pesquisa em linhagem de células pancreáticas revelou que a administração de um miRNA sintético era capaz de inibir a proliferação celular³⁵.

Até o momento, estudos sobre miRNAs em câncer oral

são escassos, limitados à análise apenas de CEOs e têm apresentado resultados diversos^{6,19,39,40}. Algumas dessas pesquisas sugerem que a redução global na expressão dos miRNAs contribui para o desenvolvimento dos CEOs, em virtude da subexpressão ou silenciamento de miRNAs supressores tumorais^{19,39}. No entanto, Wong et al.⁴⁰ (2008) observaram superexpressão de miRNAs em CEOs, sugerindo um papel oncogênico para esses RNAs, atuando através da inibição da apoptose e do estímulo à proliferação celular.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Ao longo dos últimos anos, os miRNAs têm-se consolidado como componentes importantes no intrincado processo de regulação da expressão gênica. Embora a expressão desses pequenos RNAs esteja alterada em diversos cânceres, o papel dos miRNAs na tumorigênese ainda não é completamente conhecido. Evidências indicam que os miRNAs podem atuar como oncogenes ou supressores tumorais. Contudo, a função dos miRNAs pode depender do microambiente específico de determinado tipo celular, o qual provê diferentes repertórios de genes-alvo.

Embora os achados reportados na literatura sugiram o envolvimento dos miRNAs na patogênese dos CEOs, em decorrência do número ainda incipiente de pesquisas, o verdadeiro papel destes RNAs no desenvolvimento dessas neoplasias permanece ainda pouco compreendido. Dessa forma, novos estudos são necessários para esclarecer a participação de miRNAs supressores tumorais e miRNAs oncogênicos no desenvolvimento dos CEOs.

REFERÊNCIAS

1. Akao Y, Nakagawa Y, Naoe T. MicroRNAs 143 and 145 are possible common onco-microRNAs in human cancers. *Oncol Rep*, 2006; 16: 845-850.
2. 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: 1885-1898.
3. Calin GA, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002; 99: 15524-15529.
4. Calin GA, et al. human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 2999-3004.
5. Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*, 2009; 136: 642-655.
6. Childs G, et al. Low-level expression of MicroRNAs *let-7d* and *miR-205* are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol*, 2009; 174: 736-745.
7. Chiosea S, et al. Up-regulation of Dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 2006; 169: 1812-1820.
8. Ciafrè SA, et al. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun*, 2005; 334: 1351-1358.
9. Cowland JB, Hother C, Grønbaek K. MicroRNAs and cancer. *APMIS*, 2007; 115: 1090-1106.
10. Dalmay T. MicroRNAs and cancer. *J Intern Med*, 2008; 263:366-375.
11. Eis PS, et al. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005; 102:

- 3627-3632.
- 12- Gartel AL, Kandel ES. miRNAs: Little known mediators of oncogenesis. *Semin Cancer Biol*, 2008; 18: 103-110.
- 13- Gomes CC, Gomez, RS. MicroRNA and oral cancer: Future perspectives. *Oral Oncol*, 2008; 44: 910-914.
- 14- Hayashita Y, et al. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 2005; 65: 9628-9632.
- 15- He L, et al. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 2005; 435: 828-833.
- 16- Iorio MV, et al. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 2005; 65: 7065-7070.
- 17- Johnson SM, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 2005; 120: 635-647.
- 18- Karube Y, et al. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 2005; 96: 111-115.
- 19- Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive MicroRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res*, 2008; 68: 2094-2105.
- 20- Krutzfeldt J, et al. Silencing of microRNAs *in vivo* with 'antagomirs'. *Nature*, 2005; 438: 685-689.
- 21- Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet*, 2007; 39: 673-677.
- 22- Kutay H, et al. Downregulation of miR-122 in the rodent and human hepatocellular carcinomas. *J Cell Biochem*, 2006; 99: 671-678.
- 23- 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: 1957-1966.
- 24- Lin YW, et al. Loss of heterozygosity at chromosome 13q in hepatocellular carcinoma: identification of three independent regions. *Eur J Cancer*, 1999; 35: 1730-1734.
- 25- Liu J. Control of protein synthesis and mRNA degradation by microRNAs. *Curr Opin Cell Biol*, 2008; 20: 214-221.
- 26- Lu J, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 2005; 435: 834-838.
- 27- Nottrott S, Simard MJ, Richter JD. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 2006; 13: 1108-1114.
- 28- Pekarsky Y, et al. T cell expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res*, 2006; 66: 11590-11593.
- 29- Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA – implications for cancer. *Virchows Arch*, 2008; 452: 1-10.
- 30- Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. *J Cell Mol Med*, 2008; 12: 1811-1819.
- 31- Scholzová E, Malík R, Sevcík J, Kleibl Z. RNA regulation and cancer development. *Cancer Lett*, 2007; 246: 12-23.
- 32- Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs – micro in size but macro in function. *FEBS Journal*, 2008; 275: 4929-4944.
- 33- Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. *J Am Acad Dermatol*, 2008; 59: 725-737.
- 34- Tam W, Ben-Yehuda D, Hayward WS. bic, a novel gene activated by proviral insertions in avian leukosis virus-induced lymphomas, is likely to function through its noncoding RNA. *Mol Cell Biol*, 1997; 17: 1490-14502.
- 35- Tsuda N, Ishiyama S, Li Y, Ioannides CG, Abbruzzese JL, Chang DZ. Synthetic microRNA designed to target gliomas-associated antigen 1 transcription factor inhibits division and induces late apoptosis in pancreatic tumor cells. *Clin Cancer Res*, 2006; 12: 6557-6564.
- 36- Volinia S, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 2257-2261.
- 37- Voorhoeve PM, et al. A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 2006; 124: 1169-1181.
- 38- Wijnhoven BPL, Michael MZ, Watson, DI. MicroRNAs and cancer. *Br J Surg*, 2007; 94: 23-30.
- 39- Wong TS, Liu XB, Ho ACW, Yuen APW, Ng RWM, Wei WI. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer*, 2008; 123: 251-257.
- 40- Wong TS, Liu XB, Wong BYH, Ng RWM, Yuen APW, Wei WI. Mature miR-184 as potential oncogenic microRNA of squamous cell carcinoma of tongue. *Clin Cancer Res*, 2008; 14: 2588-2592.
- 41- Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Dev Biol*, 2007; 302: 1-12.
- 42- Zhang W, Dahlberg JE, Tam W. MicroRNAs in tumorigenesis: a primer. *Am J Pathol*, 2007; 171: 728-738.