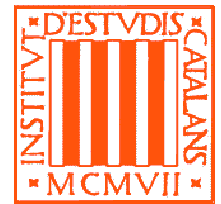




www.acclc.cat/ca/publicacions/revista-in-vitro-veritas:

In vitro veritas



Revisió

microRNAs en càncer de còlon i recte

Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

Secció de Biomarcadors Oncològics¹

Laura Foj Capell^a, Josep Maria Augé Fradera^b, Marina Carbonell Prat^c, Marta de Ramon Amat^a, María Luisa Granada Ybern^d, Sílvia Miró Cañís^c, Jaume Trapé Pujol^e, Xavier Filella Pla^b

^a Laboratori de Referència de Catalunya, El Prat de Llobregat.

^b Servei de Bioquímica i Genètica Molecular (CDB), Hospital Clínic de Barcelona, Barcelona.

^c Laboratori d'Anàlisis Clíniques, CLILAB Diagnòstics, Vilafranca del Penedès.

^d Servei de Bioquímica, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona.

^e Servei de Bioquímica Clínica, Departament de Diagnòstic Biològic, Althaia Xarxa Assistencial de Manresa, Manresa.

¹ Membres de la Secció de Biomarcadors Oncològics durant la preparació d'aquest document: Josep Maria Augé Fradera, Marina Carbonell Prat, Xavier Filella Pla (coordinador), Laura Foj Capell, María Luisa Granada Ybern, Sílvia Miró Cañís, Marta de Ramon Amat, Jaume Trapé Pujol.

Adreça de correu electrònic per l'autor de la correspondència: jmauge@clinic.cat

2019 © Publicat per l'Associació Catalana de Ciències de Laboratori Clínic

Introducció

En els darrers anys s'ha evidenciat un interès creixent en l'estudi dels microRNAs (d'ara endavant miRNAs). S'ha descobert que tenen un paper destacat en diferents malalties, com ara neurològiques, cardiovasculars, digestives i fins i tot s'han postulat com a possibles dianes terapèutiques. De tota manera, bona part dels estudis s'han centrat en el camp de l'oncologia (1). La seva implicació en diferents activitats biològiques es deu, principalment, a la seva participació en la regulació de processos cel·lulars tan destacats com la diferenciació, el desenvolupament, la proliferació i l'apoptosi (2).

Aquest document se centra en revisar com actuen els miRNAs sobre diferents aspectes relacionats amb el desenvolupament del càncer de còlon i recte (CCR) i com el seu estudi pot influir en la detecció precoç, el pronòstic o la

quimiosensibilitat (3). La seva anàlisi, tot i que es considera molt prometedora, es troba en una fase inicial, pel que probablement serà necessari recórrer un llarg camí abans de poder posar en pràctica els coneixements assolits, on caldrà aprofundir tant en aspectes metodològics (material utilitzat per la seva anàlisi, variables preanalítiques, normalització) com en la identificació dels candidats més adequats (panells de miRNAs) i en la interpretació dels resultats obtinguts (4). Actualment, tot i trobar-nos en un moment emergent, és habitual que se'n faci referència en publicacions que se centren a revisar la utilitat de nous biomarcadors pel CCR (5–9).

1.1 Definició i descripció dels miRNAs

El genoma humà conté milers de regions no codificants, que durant dècades, per la manca d'evidència de la seva

transcripció i per tant d'una suposada no participació en la codificació o traducció a proteïnes, s'han considerat DNA brossa. Procediments basats en la seqüenciació de nova generació (*next generation sequencing* en anglès) i les micromatrius (*microarrays* en anglès), han demostrat que aquestes regions no codificants són transcrits de forma generalitzada, evidenciant que fins al 75 % del genoma humà és transcrit a RNA, tot i que menys del 2 % codifica per a proteïnes (10). Aquesta enorme fracció del transcriptoma humà inclou una quantitat important d'RNA funcional però no codificant (ncRNAs) (11). De forma general aquests ncRNAs es classifiquen en tres grups en funció de la seva longitud: ncRNAs de mida curta, mitjana i llarga. Els miRNAs formen part dels ncRNAs de mida curta. Es tracta de fragments d'RNA de cadena única d'uns 19 a 25 nucleòtids que es troben tant en el regne vegetal com animal i que intervenen en la regulació post-transcripcional. El seu descobriment data de l'any 1994, quan es va descriure *lin-4*, un ncRNA curt, en el nemàtode *Caenorhabditis elegans* (12).

1.2 Síntesi dels miRNAs

Els miRNAs se sintetitzen a partir de dues vies diferenciades (canònica i nocanònica) que tenen lloc al nucli i citoplasma cel·lulars (Figura 1). L'origen és comú en ambdues vies, on els gens dels miRNAs són transcrits per l'RNA polimerasa II. En la via canònica els miRNAs primaris (pri-miRNA) són processats dins el nucli a través de l'RNasa tipus III, coneguda com a Droscha, generant un precursor d'uns 70 nucleòtids (pre-miRNA). A la via nocanònica, en canvi, els pre-miRNAs són generats a partir de processos específics de la síntesi de l'RNA missatger (mRNA), sense passar per la digestió de la Droscha. A partir d'aquest punt ambdues vies tornen a ser comunes, i els pre-miRNAs són reconeguts per un transportador (Exportin 5) que facilita el seu pas al citoplasma. Al citoplasma, una altra RNasa tipus III, coneguda com a Dicer, escindeix el pre-miRNA de les estructures en forma de forquilla, i el miRNA madur generat s'uneix al complex RISC (acrònim de l'anglès *RNA-induced silencing complex*), configurant el que s'anomena miRISC, que juntament amb la proteïna Argonauta, actua com a regulador transcripcional.

Aquest procés, que esquemàticament es diferencia amb una part nuclear (enzim Droscha) i una part citoplasmàtica (enzim Dicer), cal que estigui molt ben regulat sobretot a nivell de l'enzim Droscha perquè és considerat el punt més crític de tota la síntesi. Tanmateix, se sap que un elevat nombre de miRNAs madurs estan localitzats a nivell nuclear, a la mitocondria o dins de petites vesícules; d'aquí la importància que tenen els processos nocanònics en la síntesi de miRNAs. Concretament, s'ha demostrat que els miRNAs presents al nucli cel·lular poden regular la maduració d'altres miRNAs, o fins i tot es poden unir també a altres ncRNA llargs modificant la seva expressió i maduració (12).

1.3 Funció dels miRNAs

La funció dels miRNAs va ser descrita per primera vegada a finals de segle XX. El seu punt clau se centra en la unió del miRNA madur al complex RISC (miRISC) que al mateix

temps és capaç d'unir-se al mRNA diana i regular la seva expressió mitjançant l'aparellament específic de bases a la regió 3' no traduïda (3'UTR) a través d'una seqüència de 2-8 nucleòtids a l'extrem 5', denominada regió llavor (*seed region* en anglès). La complementarietat entre els miRNAs i els corresponents mRNAs pot ser parcial o total, ocasionant una supressió de la traducció o degradació, respectivament. Un miRNA pot unir-se de manera seqüencial a diferents mRNAs i un sol mRNA pot ser objectiu de diferents miRNAs, podent regular l'equilibri de diferents processos cel·lulars.

Recentment també s'ha descrit que independentment de la unió dels miRNAs als 3'UTR dels mRNA, aquests són capaços d'unir-se també a la regió 5' no traduïda (5'UTR) o al marc obert de lectura (ORF, sigles de l'anglès *open reading frame*), ambdós localitzats en regions codificants, ocasionant l'activació de la traducció dels mRNA. Tanmateix però, aquests dos últims models no estan del tot acceptats, ja que és d'esperar que els ribosomes que rastregen les 5'UTR i els ORF eliminin els miRNAs units.

Definir les funcions dels miRNAs s'ha convertit en tot un repte, ja que el descobriment de nous gens que codifiquen per miRNAs creix de manera exponencial, presentant-se un panorama cada vegada més complex (12).

1.4 Participació dels miRNAs en el càncer

Els ncRNAs més estudiats en el desenvolupament del càncer són, amb diferència, els miRNAs. S'ha vist que el perfil dels miRNAs en teixits amb presència de cèl·lules malignes és diferent al dels teixits normals, observant-se també diferències entre diferents tipus de tumors.

S'ha demostrat que el rol dels miRNAs és clau en la tumorigènesi, actuant de forma similar als oncogens o als gens supressors.

Les alteracions que afavoriran el desenvolupament del càncer es classifiquen bàsicament en dos tipus; per una banda es poden produir modificacions epigenètiques, com ara la hipermetilació, i per l'altra alteracions genètiques que en definitiva acabaran afectant la síntesi dels pri-miRNAs, i en conseqüència, dels miRNAs madurs, i per tant les interaccions amb el mRNA diana.

Una de les primeres associacions observades entre els miRNAs i el desenvolupament del càncer va ser l'alteració del miR-15 i miR-16 en la leucèmia linfofítica crònica de cèl·lules B. S'ha observat també la seva participació en el desenvolupament del càncer de mama i ovari i també en melanomes, principalment a partir de miRNAs localitzats en regions fràgils de cromosomes. Recentment també s'ha demostrat que alteracions que afecten els gens que codifiquen TARBP2 (proteïna que forma part del complex RISC), Dicer i Exportin 5, tots tres involucrats en la síntesi de miRNAs, tenen un paper rellevant en la transformació maligna de les cèl·lules (1).

2. Metodologia

2.1 Variables preanalítiques en l'anàlisi de miRNAs

Les diferències en la recollida, manipulació i processament de

les mostres, la variabilitat biològica interindividual i els controls de qualitat emprats constitueixen una font de variabilitat considerable en l'anàlisi dels miRNAs (13).

A continuació es descriuen tres variables preanalítiques fonamentals: l'extracció d'RNA, el control de qualitat i l'estabilitat dels miRNAs. De la seva estandardització, depèn en bona part, minimitzar la variabilitat del diagnòstic basat en l'estudi dels miRNAs.

Extracció de miRNAs

Els miRNAs es poden extreure d'una àmplia gamma de mostres biològiques, en fresc o emmagatzemades, per mitjà d'extracció orgànica (per exemple, amb fenol i cloroform), a través de procediments basats en columnes i filtres o fonamentats en partícules magnètiques. És necessari, però, optimitzar l'extracció dels miRNAs ja que en estudis comparatius dels diversos procediments existents s'observen diferències en els resultats obtinguts segons sigui el reactiu utilitzat per aïllar l'RNA total (mirVana, Exiqon miRCURY, miRNeasy, TRIzol) (14–16). Així per exemple, segons McAlexander *et al.* (17), el reactiu Exiqon miRCURY Biofluids supera els altres procediments d'aïllament d'RNA provats amb plasma, incloent els reactius Exiqon Cell i Plant, TRIzol, mirVana i miRNeasy. Per contra, Kroh *et al.* (18) suggeriren que amb el reactiu miRNeasy de Qiagen s'obtenia de 2 a 3 vegades més concentració d'RNA que amb el reactiu mirVana.

Control de qualitat

El control de qualitat de l'RNA és essencial per analitzar la quantitat, la puresa i la integritat de l'RNA. Habitualment, la qualitat de l'RNA s'avalua mitjançant una combinació de procediments basats en l'espectrometria d'absorció molecular a l'ultraviolat (UV) i electroforesi en gels d'agarosa/poliacrilamida o quantificació basada en tints fluorescents. Cada enfocament té inconvenients que poden afectar la mesura dels miRNAs, com per exemple generació de lectures d'absorbència enganyses a causa de la presència de DNA o de reactius provinents de l'extracció. Alguns sistemes comercials, com ara el sistema Bioanalyzer (Agilent), l'espectrometre NanoDrop™ i el fluoròmetre Qubit®, proporcionen excel·lents controls de qualitat d'RNA, reduint la sobre o infraestimació d'RNA en assaigs de detecció, permetent la comparació entre estudis.

Estabilitat dels miRNAs

En el plasma i el sèrum els miRNAs són resistents a l'activitat endògena de l'RNasa, als canvis de temperatura i de pH extrems, a l'emmagatzematge perllongat i a múltiples cicles de congelació/descongelació (19, 20). En plasma, la resistència a la degradació és major quan els miRNAs s'associen amb proteïnes Argonauta a l'espai extracel·lular que quan es troben encapsulats en vesícules (21). S'han descrit diferències en la circulació de les concentracions de miRNAs entre plasma i sèrum. Wang *et al.* (22) trobaren quantitats més elevades de miRNAs en sèrum que en plasma, suggerint que

es produïen miRNAs addicionals durant el procés de coagulació. A més, els diferents tipus d'anticoagulants poden influir en els resultats. Així, Kim *et al.* (23) van observar que les concentracions de miR-16 i miR-223 són més baixes amb heparina i més altes amb oxalat, mentre que amb EDTA s'obtenen resultats similars al sèrum. L'hemòlisi també és un factor que afecta l'anàlisi d'alguns miRNAs, incloent miR-16, miR-451, miR-92a i miR-486-5p, que són alliberats per eritròcits, un fet a tenir en compte, com es comentarà més endavant, a l'hora d'identificar miRNAs en la femta ja que a més de miRNAs provinents del còlon se'n poden detectar d'altres provinents del sagnat de les lesions que hi són presents.

També es recomana eliminar les plaquetes per analitzar els miRNAs en plasma, així com utilitzar tubs amb gel separadors quan s'estudien en sèrum (24, 25).

El temps que passa entre l'extracció de la mostra i l'aliquotació del plasma o sèrum també afecta els resultats, encara que segons la majoria dels autors, els miRNAs són biomarcadors estables. A més, McDonald *et al.* (26) mostraren que els miRNAs són estables a temperatura ambient durant 24 hores i refrigerats o congelats fins a 72 hores. No obstant, Rice *et al.* (27), obtenint plasma en diferents moments, demostraren que el temps fins a l'extracció de plasma influeix en valors de ΔCt en un 45 % dels miRNAs assajats. Sobre la base d'aquests resultats, els autors recomanen l'extracció en plasma abans de les 12 hores.

2.2 Variables postanalítiques: normalització de les dades

L'anàlisi de miRNAs requereix d'una normalització dels resultats obtinguts per tal de minimitzar la variabilitat de dades. La variabilitat en la mesura dels miRNAs entre assajos es pot atribuir, com hem comentat anteriorment, a diferents fonts, com l'extracció de l'RNA, la quantitat i qualitat d'aquest, o l'eficiència del procediment de la transcripció reversa i de la reacció en cadena per la polimerasa quantitativa en temps real (qRT-PCR). La normalització de les dades és essencial per obtenir resultats homogenis entre experiments i convertir les dades crues en resultats vàlids. S'han fet servir diverses estratègies per tal de normalitzar els nivells d'expressió dels miRNAs, com ara la normalització amb el valor de cicle de quantificació (Cq) promig de tots els miRNAs mesurats en l'assaig (només per assajos amb un gran nombre de miRNAs), la normalització amb un miRNA endogen (miR-16, RNU6B, SNORD43) i la normalització amb un control exogen (*spike-in control* en anglès), que és un oligoRNA afegit durant l'extracció d'RNA (cel-miR-39, cel-miR-54 i cel-miR-238). Actualment no hi ha consens sobre quin gen o control de referència és el més adequat per normalitzar els resultats de la quantificació dels miRNAs. Això continua sent el major obstacle per a la utilitat clínica dels miRNAs ja que gairebé tots els estudis publicats utilitzen un procediment relatiu de quantificació com la qRT-PCR per detectar l'expressió de miRNAs.

El miRNA de referència ideal hauria de ser independent de la variabilitat biològica, de l'estadi de la malaltia o dels tractaments, i amb una estabilitat, propietats d'extracció i eficiència de quantificació similars als del miRNA diana.

Existeixen diversos algorismes, com el programari geNorm i NormFinder, útils per seleccionar el material de referència més estable d'un llistat de candidats. No obstant, el normalitzador ideal, sobretot quan es treballa amb líquids corporals, no existeix (28) i l'ús de gens de referència endògens és controvertit. Actualment, no existeixen controls de referència validats per l'anàlisi de l'expressió de miRNAs en CCR i els diferents estudis publicats presenten resultats contradictoris (o no homogenis o discordants). Danese *et al.* (29) realitzaren una revisió sistemàtica per tal d'identificar miRNAs de referència estables en CCR, excloent els miRNAs que regulen oncogenes o gens supressors tumorals.

Els autors reportaren que diferents combinacions de miR-520d, miR-1228 i miR-345 proporcionen els miRNAs de referència expressats de manera més estable en exosomes, plasma i teixit i que per tant es podrien utilitzar en futures investigacions com a gens normalitzadors. En canvi, Yang *et al.* (30) en un estudi en què es validà un perfil de miRNAs pronòstic per CCR, determinaren que miR-16 era el miRNA més adequat per la normalització de l'expressió dels miRNAs. No obstant, miR-16 pot ser inadequat ja que els seus nivells d'expressió poden veure's afectats significativament per l'hemòlisi (25, 26).

Niu *et al.* (31), d'altra banda, en el seu estudi per identificar els miRNAs de referència òptims per l'anàlisi mitjançant qRT-PCR en pacients amb CCR i controls sans, proposaren miR-93-5p, miR-25-3p i miR-106b-5p com a gens de referència més adequats. No obstant, aquests tres miRNAs difereixen significativament entre els individus sans i amb càncer de pulmó de cèl·lules petites o càncer de mama, de manera que no es poden utilitzar com a gens de referència en aquests dos tipus de càncer.

Quantificar l'expressió de miRNAs en plasma, sèrum o altres líquids corporals mitjançant controls endògens és particularment difícil ja que no s'ha trobat cap control de referència estable.

L'ús de controls exògens (*spike-in*) pot ser una solució a aquest problema (32). L'addició d'un miRNA sintètic exogen (per exemple, els derivats de *Caenorhabditis elegans*, cel-miR-39, cel-miR-54 i cel-miR-238, o de l'*Arabidopsis thaliana*, ath-miR-159a) a la fase fenòlica permet monitoritzar l'eficàcia de la transcripció reversa i de la qRT-PCR, malgrat que no té en compte la variabilitat biològica. Mitchell *et al.* (19) proposaren l'ús combinat de cel-miR-39, cel-miR-54 i cel-miR-238 per quantificar l'expressió de miRNAs en plasma. Sourvinou *et al.* (33) en canvi va concloure que els resultats milloren quan la normalització es basa en la combinació de controls exògens (cel-miR-39) i endògens (miR-16), ja que es compensen les diferències intermostrals en la recuperació de miRNAs i en la síntesi de cDNA. Per contra, McDonald *et al.* (26) demostraren que la imprecisió era més alta utilitzant el control endogen miR-16 que amb l'exogen cel-miR-39, perquè miR-16 —com ja hem esmentat— és susceptible a l'hemòlisi. Els controls exògens, particularment cel-miR-39, semblen ser, per tant, la forma òptima de normalitzar l'expressió de miRNAs en absència d'un control endogen ideal (34), tot i que cal tenir en compte la variabilitat biològica per millorar la mesura dels miRNAs.

En els últims anys, alguns grups han suggerit l'ús d'un procediment de quantificació absoluta com la reacció en cadena per la polimerasa digital (dPCR) per quantificar els miRNAs ja que no requereix l'ús d'un gen de referència i té una major sensibilitat que els procediments basats en la reacció en cadena per la polimerasa quantitativa (qPCR) convencionals (35).

2.3 Procediments de detecció de miRNAs

Després de l'aïllament dels miRNAs de diferents tipus de mostres clíniques, aquests es poden analitzar a través de diferents procediments (Taula 1), que inclouen els *microarrays* (36), la reacció en cadena per la polimerasa quantitativa en temps real (qRT-PCR) (37) la seqüenciació de nova generació (NGS, acrònim de l'anglès *next generation sequencing*) i el sistema d'expressió gènica *Nanostring nCounter* (38). Aquestes són els procediments emprats en la majoria dels estudis clínics relacionats amb perfils d'expressió de miRNAs. S'ha de tenir en compte que les proves clíniques han de ser ràpides, sensibles, precises, fàcils de realitzar i rendibles per tal de ser practicades en el treball quotidià.

Altres procediments existents per analitzar els miRNAs, però utilitzats només en recerca, són els basats en la detecció electroquímica o potenciomètrica (39, 40), el *Northern Blot* (41) i la ressonància de superfície plasmònica (42).

Micromatrius (*microarrays*)

Els procediments basats en *microarrays* s'usen per quantificar un gran nombre de miRNAs simultàniament en un sol assaig. Juntament amb el procediment basat en la qRT-PCR són la plataforma més utilitzada per avaluar l'expressió de miRNAs coneguts. El mètode en el qual estan basats és la hibridació d'àcids nucleics entre les molècules diana a analitzar i les corresponents sondes complementàries. Les sondes complementàries poden ser de DNA, RNA o d'altres àcids nucleics com ara àcids nucleics bloquejats o LNA (acrònim de l'anglès *locked nucleic acid*).

Els *microarrays* són actualment la base dels procediments d'alt rendiment més utilitzats per mesurar els nivells d'expressió de miRNAs (36, 43) i d'elecció pel que fa a la identificació i validació de nous perfils de miRNAs. Tanmateix els *microarrays* tenen un potencial molt limitat per al descobriment de noves seqüències de miRNAs (a diferència de la NGS), i no poden discriminar les variants d'una determinada espècie de miRNA ni tampoc distingir entre un miRNA madur i el seu precursor. D'altra banda, i de manera similar a la NGS, és possible realitzar l'anàlisi paral·lela de diferents mostres com, per exemple, mostres de pacients malalts *versus* pacients amb absència de malaltia.

La quantitat d'RNA total inicial necessària per als *microarrays* és aproximadament 100-150 ng per assaig, la qual és molt menor que la quantitat necessària per a un assaig de NGS (\approx 1000 ng). Aquest és un avantatge important dels procediments amb *microarrays* quan el volum de la mostra és un factor limitant. El miRNA purificat primer és desfosforilat a l'extrem 3' i marcat amb un fluoròfor. El miRNA s'hibrida després al *microarray* des de diverses hores fins a dies.

Després de diversos passos de rentat, que eliminen qualsevol miRNA marcat no unit, s'escaneja la fluorescència i s'analitza les dades mitjançant eines bioinformàtiques. Per l'anàlisi de les dades obtingudes amb el procediment amb *microarrays* és necessària la normalització.

Alguns dels desavantatges són que és un procediment feixuc, llarg, només proporciona quantificacions relatives, té baixa sensibilitat i especificitat i pot ser costós si s'utilitzen àcids nucleics bloquejats (LNA) en el disseny de la sonda.

Reacció en cadena per la polimerasa quantitativa en temps real (qRT-PCR)

Actualment, els procediments basats en la qRT-PCR són de referència (*gold standard* en anglès) per a la quantificació de miRNAs. És un procediment per mesurar l'expressió dels miRNAs individuals (o un nombre limitat), i s'ha utilitzat de forma rutinària tant en mostres de sang (44, 45) com de femta (46, 47) per a la detecció del CCR. Després d'aïllar el miRNA, aquest es converteix en cDNA mitjançant PCR de transcripció reversa. La seqüència d'interès s'amplifica i es mesura en temps real mitjançant sondes fluorescentes.

Com que els miRNAs tenen una longitud curta (≈ 22 nucleòtids), les cues poli (A) a l'extrem 3' del miRNA o l'ús d'encebadors (*primers* en anglès) *stem-loop* específics de miRNA permeten la transcripció reversa, millorant la sensibilitat i l'especificitat de detecció de miRNAs en comparació amb els encebadors lineals. Durant l'amplificació, els productes de PCR poden ser monitoritzats a través de la incorporació d'un tint fluorescent, com el SYBR Green, o mitjançant l'alliberament d'un fluoròfor d'una sonda Taqman® unida a la seqüència diana (37).

La qRT-PCR és la base de procediments de treball quotidià, té alta sensibilitat i especificitat analítica, i és barat comparada amb altres procediments. Tanmateix, és sensible a contaminants com ara nucleases o inhibidors de PCR i requereix la normalització de les dades.

Seqüenciació de nova generació (NGS)

Els procediments basats en NGS s'utilitzen tant per l'anàlisi de seqüències genètiques com també per la quantificació de nivells d'expressió d'RNAs (38, 48). Un avantatge de la NGS per sobre dels *microarrays* és que es poden quantificar les seqüències conegudes així com també identificar i quantificar seqüències no conegudes. Resulta un procediment vàlid tant per al descobriment com per la validació posterior de nous perfils diagnòstics o pronòstics de miRNAs.

Igual que els *microarrays*, també permet l'anàlisi de l'expressió de múltiples miRNAs de diferents mostres en un sol assaig, eliminant així factors que podrien impactar negativament en els resultats de l'anàlisi.

Un altre avantatge és el seu alt rang dinàmic, que permet quantificar amb precisió miRNAs altament expressats com els poc abundants al mateix temps en el mateix assaig. Finalment, la NGS permet detectar i quantificar les isoformes d'un miRNA (49).

La NGS també es pot utilitzar per mesurar petits panells de miRNAs d'un nombre gran de mostres, cosa que serà útil en el treball quotidià al laboratori clínic. Alguns inconvenients és que continua sent un procediment d'alt cost, sobretot comparat amb la qRT-PCR, consumeix molt temps, encara no està totalment automatitzat, l'avaluació de dades encara no està estandarditzada, i malgrat que en recerca ja és capdavanter, encara no es practica en el treball quotidià als laboratoris clínics.

Sistema d'expressió gènica Nanostring nCounter

La plataforma NanoString® nCounter (Nanostring Technologies, Seattle, WA, EUA) és un dels sistemes emergents més prometedors per generar perfils d'RNA. Es tracta d'un sistema de rendiment mitjà, basat en la hibridació per mesurar els nivells d'expressió de mRNAs i miRNAs, capaç de detectar molècules d'àcid nucleic específiques a partir de quantitats petites de mostra inicial sense necessitat de transcripció reversa o d'amplificació de cDNA (50). El sistema es basa en un nou mètode de codis de barres moleculars i detecció digital de molècules diana mitjançant l'ús de parells de sondes codificades per colors. Cada codi de barres de color s'uneix a una única sonda específica de diana corresponent al miRNA o gen d'interès.

Els perfils de miRNAs de nCounter s'utilitzen per diferenciar entre grups dintre de l'interval de referència i grups patològics en diferents malalties, entre elles el càncer (51, 52). A més, els panells s'han utilitzat amb èxit per a l'estratificació dels pacients (53).

En comparació amb qRT-PCR o els *microarrays*, NanoString té diversos beneficis: és més ràpid, el mètode d'hibridació utilitzat evita passos d'amplificació i proporciona una quantificació absoluta, fets que redueixen el biaix. A més, en comparació amb els *microarrays*, el procediment és més sensible i proporciona un alt rang dinàmic, permetent una millor detecció de la desregulació de l'expressió dels miRNA. Tanmateix però, un desavantatge important és que actualment només està disponible en laboratoris d'investigació especialitzats i no en laboratoris clínics de treball programat.

3. miRNAs en el càncer de còlon i recte

Els miRNAs associats al desenvolupament del CCR són molt nombrosos i presenten accions diverses, tant activadores, com inhibidores, o de bloqueig de processos relacionats amb la transformació maligna de les cèl·lules. Els miRNAs es classifiquen generalment en miRNAs supressors de tumors i oncomiRs. Els oncomiRs són aquells miRNA que inhibeixen gens supressors i els miRNAs supressors de tumors inhibeixen els oncogens. L'any 2003 es va identificar per primera vegada l'associació entre els miRNAs i el CCR, veient-se que miR-143 i miR-145 estaven infraexpressats en teixit de CCR quan es comparava amb teixit normal. Els mecanismes relacionats amb la progressió del CCR són diversos, incloent la proliferació cel·lular, la pèrdua de regulació apoptòtica, la invasió, l'angiogènesi i la pervivència de les cèl·lules pluripotencials.

La transformació de la mucosa sana, des d'un adenoma benigne o pòlip fins a arribar a un carcinoma maligne, és el resultat d'una sèrie d'alteracions en la senyalització de diferents vies com ara Wnt/ β -catenina, EGFR, TGF- β i TP53, amb disregulació de diferents miRNAs en cada via.

Els miRNAs clau en la via Wnt són els de la família de miR-135 i miR-34, aquesta darrera amb una important participació en la progressió del CCR. Altres miRNAs que tenen com a diana diferents gens d'aquesta via són el miR-145, miR-29b i miR-146a. S'ha vist que a la via EGFR intervenen let-7, miR-143, miR-145, miR-18a, miR-126, miR-21, miR-32 i miR-181. En la via TGF- β , s'han identificat alteracions en la regulació de miR-21 i miR-135. Finalment, diferents miRNAs s'han associat a defectes de TP53, principalment els de la família miR-34, miR-125b i miR-215 que poden intervenir en aquesta via afavorint el creixement cel·lular i la proliferació del CCR (54).

Des d'un punt de vista pràctic s'ha demostrat que la identificació i estudi dels miRNAs pot ser útil en la valoració de diferents aspectes del CCR, tant pel diagnòstic precoç, com pel pronòstic, i per l'avaluació de l'eficàcia dels tractaments. Se sap que els miRNAs no només estan presents en els teixits neoplàsics, sinó que també estan presents en diferents líquids biològics. S'ha vist que es poden trobar circulant dins microsomes i microvesícules o units a proteïnes com les Argonata o a lipoproteïnes d'alta densitat (HDL). A més, també és possible detectar-los en la femta per la seva presència en cèl·lules de l'epiteli del tub digestiu (55). Aquesta revisió se centrarà a l'estudi dels miRNAs circulants en sèrum i plasma i els presents en femta

3.1 Utilitat dels miRNAs en el diagnòstic precoç del CCR

Actualment el mètode d'elecció per la detecció precoç del CCR és la colonoscòpia. S'ha demostrat que és un mitjà excel·lent, arribant a reduir la incidència i la mortalitat fins al 76 % i al 65 %, respectivament (56–58). Malauradament es tracta d'un mètode invasiu i no absent de complicacions, i el seu cost econòmic fa que molts sistemes sanitaris no el considerin el mètode de primera elecció. Una alternativa, per evitar la realització d'una colonoscòpia a tota la població de risc, és la utilització de mètodes no invasius per seleccionar els individus als quals realitzar la prova. Entre aquests mètodes, aquells que es basen en la detecció de sang a la femta, ja sigui utilitzant el mètode del guaiac o a través de la detecció d'hemoglobina a la femta a partir de procediments immunoquímics, són els més utilitzats en els programes de cribratge del CCR, principalment perquè s'ha demostrat que també redueixen la mortalitat (59–61). A més, actualment, són els més cost-efectius. La sensibilitat de les proves que detecten la sang en femta per detectar lesions preneoplàsiques és limitada tot i tenir una bona especificitat (62, 63). Per aquest motiu s'estan avaluant altres marcadors en diferents líquids biològics, obtenint-se sensibilitats i especificitats molt variables (7, 8); entre aquests marcadors, l'estudi dels miRNAs ha obert un camp força prometedori.

Diferents miRNAs han estat avaluats com a possibles candidats pel diagnòstic precoç del CCR. Els estudis que es presenten se centren en la seva identificació tant en sang (plasma i sèrum) (Taula 2 i 3) com en femta (Taula 4). El

miR-92 va ser el primer candidat identificat en plasma útil per al diagnòstic precoç del CCR i es va descriure l'any 2009. Una metaanàlisi publicada l'any 2014 va mostrar una sensibilitat per la seva identificació del 76 % amb una especificitat del 64 % (64).

La majoria de publicacions, generalment se centren en l'estudi dels miRNAs circulants davant l'aparició del CCR i poc en la seva disregulació davant lesions precursors; no obstant Huang *et al.* (65) van observar un increment en l'expressió dels miR-92a i miR-29a en el plasma dels pacients amb adenomes avançats quan es comparaven amb controls sans, presentant una sensibilitat i especificitat combinades del 73 % i el 80 % respectivament. De la mateixa manera s'ha vist una tendència en la disregulació dels miR-30b (infraexpressat) i miR-486 (sobreexpressat) en la seqüència adenoma-carcinoma (66)

Un estudi recent que avaluava miR-15b, miR-17, miR-21, miR-26b, i miR-145 en plasma, va mostrar una sensibilitat individual per la detecció de CCR que oscil·lava entre el 50 % i el 72 % amb una especificitat entre el 52 % i el 69 %; miR-21 i miR-26b són els que van mostrar una millor eficàcia diagnòstica amb àrees sota la corba de rendiment diagnòstic (ROC) (95 % IC) de 0,708 (0,616-0,799) i 0,702 (0,608-0,795), respectivament (67).

Bona part de la recerca s'està centrant en els panells, on a partir de diferents miRNAs s'avalua quina és la combinació més adequada. Un exemple és el de Wang *et al.* (68), que estudiant 723 miRNAs, va observar que el miR-409-3p, miR-7 i miR-93 presentaven diferents graus de disregulació en els pacients diagnosticats de CCR comparat amb el grup d'individus sans. L'ús combinat en plasma permetia identificar la presència de CCR a diferents estadis tumorals amb una sensibilitat i una especificitat del 82 % i el 89 %, respectivament. En un altre estudi també s'observà que no s'evidenciaven diferències a l'hora de detectar CCR al còlon proximal o al distal (69).

Un altre treball realitzat en sèrum utilitzant un panell dissenyat a partir de miRNAs disregulats en altres estudis (let-7g, miR-21, miR-92a, miR-181b i miR-203) va mostrar una sensibilitat i especificitat combinades del 93 % i 91 %, respectivament. Aquest mateix estudi va avaluar l'eficàcia diagnòstica per la identificació del CCR (72 % en estadis II i III) en les mateixes mostres utilitzant els marcadors tumorals CEA (> 6.5 ng/mL) i CA19.9 (> 39 U/mL), observant una sensibilitat del 35 % i del 23 %, respectivament (70). Recentment, Zhang *et al.* (52) investigaren el potencial de 800 miRNAs circulants com a biomarcadors pel CCR i adenoma en el sèrum de 21 pacients amb CCR, 19 pacients amb adenomes i 21 controls sans mitjançant el sistema d'anàlisi de miRNA NanoString. Els miRNAs diferencialment expressats es validaren en una cohort de 34 pacients amb CCR, 33 amb adenoma i 35 controls sans mitjançant qRT-PCR de Fluidigm (Fluidigm Corporation, San Francisco, California). Cinc proporcions (let-7b/ miR-367-3p, miR-130a-3p/miR-409-3p, miR-148-3p/miR-27b, miR-148a-3p/miR-409-3p, i miR-21-5p/miR-367-3p) es validaren per diferenciar els pacients amb CCR d'aquells amb adenoma, amb àrees sota la corba ROC de 0,797 (95 % IC 0,659-0,935) i 0,732 (95 % IC 0,611-0,851), en el grup de descobriment i de validació,

respectivament. D'altra banda, els valors obtinguts de les àrees sota la corba per miR-17-5p/miR-135b, miR-92a-3p/miR-135b, i miR-451a/miR-491-5p per diferenciar pacients amb adenoma de controls sans foren de 0,831 (95 % IC 0,706-0,956) en el grup de descobriment, i de 0,735 (95 % IC 0,619-0,851) pel grup validació. Els autors també realitzaren una anàlisi funcional, trobant que els gens diana d'aquests miRNAs estaven enriquits sobretot en vies relacionades amb metabolisme i inflamació.

La conclusió a la que s'arriba en tots els estudis publicats, és que no existeix homogeneïtat i que hi ha una certa manca d'acord entre els resultats observats. S'han realitzat diferents metaanàlisis. En un d'aquests estudis, que parteix de 19 publicacions on s'inclouen un total de 1558 pacients diagnosticats de CCR i 1085 controls, la sensibilitat i especificitat agrupades van ser del 0.80 (IC 95 % 0,77-0,85) i 0.84 (IC 95 % 0,78-0,88) respectivament. En aquest mateix estudi es va concloure que utilitzant diferents miRNAs l'eficàcia era superior a la de la utilització d'un sol miRNA, probablement perquè un panell de miRNAs mostra de manera més àmplia diferents aspectes de la tumorigènesi (71).

Altres autors, tractant d'emular la sistemàtica de les proves utilitzades en els programes de cribratge del CCR, s'han centrat en la identificació dels miRNAs en femta, un camp força menys estudiat. S'han avaluat, de forma individual, miR-92a, miR-20a, miR-21, miR-221, miR-18a i miR-144, observant-se diferències entre pacients diagnosticats de CCR i voluntaris sans. Aquests estudis han mostrat sensibilitats que oscil·len entre el 55 % i el 74 % amb especificitats entre el 68 % i el 87 % (55). Altres miRNAs estudiats en femta que s'han vist sobreexpressats en pacients amb neoplàsia de còlon, són el miR-106a, i el miR-135b; aquest darrer ha demostrat ser un bon indicador de neoplàsia avançada (54). Es creu que alguns d'aquests miRNAs no provenen de les cèl·lules neoplàsiques de la mucosa del còlon, sinó que es tracta de miRNAs propis de cèl·lules sanguínies provinents del sagnat de les lesions, com és el cas del miR-451 i miR-223 propis dels eritròcits i de les cèl·lules mieloides, respectivament (72). També s'ha suggerit que la combinació de miRNAs en femta i plasma pot incrementar la seva eficàcia diagnòstica. Un estudi recent que avalua de forma conjunta miR-223 i miR-92a en femta i plasma, assoleix una sensibilitat per la identificació del CCR del 97 %, amb una especificitat del 75 % (47).

3.2 Pronòstic

Bona part dels estudis sobre miRNAs se centren en la detecció precoç del CCR i de les seves lesions precursorses, i per tant en l'intent de reducció de mortalitat i d'incidència, respectivament. Tanmateix però, també cal disposar d'eines que complementin les existents en l'avaluació del pronòstic dels pacients diagnosticats en els estadis no inicials de la malaltia, àmbit en què els miRNAs estan prenent un paper rellevant. Aquest camp es va iniciar amb un primer estudi en el qual s'establí una clara relació entre l'expressió del miR-200c i la supervivència (73). A partir d'aquell moment, altres treballs han anat demostrant la relació entre diferents miRNAs, tant sobreexpressats com infraexpressats, i el pronòstic del CCR. Centrats en el miR-200c, un miRNA

important en la transició epiteli-mesènquima (EMT) i per tant en la regulació dels processos d'adhesió cel·lular a través d'E-cadherina, s'ha observat una expressió sèrica significativament més elevada en aquells pacients en estadi IV comparats amb la resta d'estadis tumorals. Per altra banda, l'expressió de miR-200c ha demostrat ser un factor pronòstic independent de l'aparició de metàstasis ganglionars i de recidiva tumoral (74). L'estudi dinàmic dels miRNAs, de la mateixa manera que es fa amb els marcadors tumorals clàssics, podria ser d'utilitat. En aquest sentit, el miR-200c ha estat estudiat de manera seqüencial en pacients intervinguts quirúrgicament i tractats amb quimioteràpia, observant-se que l'expressió en el serum retorna a la normalitat en aquells pacients amb un millor pronòstic; en canvi continua sobreexpressant-se davant la presència de recidiva tumoral o metàstasi a distància (75).

Un altre bon candidat és el miR-21; s'ha vist que l'augment de la seva expressió és també un factor pronòstic independent i que es correlaciona amb la seva expressió en teixit. (76).

Resultats similars han estat observats en altres treballs, on l'expressió de miR-21, en pacients amb CCR o adenomes avançats, es troba incrementada tant en sang (sèrum i plasma) com en femta (46, 67, 77-79). Contràriament, existeix un estudi on l'expressió en sèrum de miR-21 es correlaciona de forma inversa amb l'aparició de recidives locals i amb la mortalitat (80). Les raons per aquests resultats discordants poden ser diverses, des de diferències en el processament de les mostres, la quantificació dels miRNA o fins i tot en la normalització de les dades, ja que habitualment són la font més freqüent de variabilitat en aquest tipus d'estudis (81, 82). També s'ha observat que l'expressió de miR-29a i miR-31 en plasma, abans de la cirurgia, permet diferenciar aquells pacients que presentaran una recidiva tumoral dels que no la presentaran, i de la mateixa manera, augments en l'expressió plasmàtica de miR-31 en el seguiment dels pacients intervinguts s'han associat a un risc de recidiva tres vegades superior a la dels pacients que no les presentaven. En aquest mateix estudi es va observar també una associació entre l'expressió en el plasma dels miR-141 i miR-16 i el risc de presentar recidiva tumoral (83).

La majoria de miRNAs en plasma que s'associen a mal pronòstic estan sobreexpressats, però hi ha un estudi publicat en el que es va observar una sobreexpressió de miR-24-3p, miR-320a i miR-423-5p després de la cirurgia en aquells pacients que experimentaven una milloria clínica, mentre que es trobaven infraexpressats en els pacients que presentaven lesions preneoplàsiques o neoplàsiques, i en canvi estaven sobreexpressats davant la presència de malaltia inflamatòria intestinal. Aquest fet suggereix que el seu monitoratge pot ser també útil en l'avaluació del pronòstic dels pacients amb CCR (84). Actualment, la publicació d'estudis que avaluen el miRNAs com a factor pronòstic és constant.

3.3 Tractament

Els miRNAs han estat també proposats com a possibles candidats per a la detecció de resistència a determinats fàrmacs quimioteràpics. Aquests estudis se centren en el seu paper en la inducció de la quimioresistència i en conseqüència a l'èxit del tractament i el pronòstic dels pacients (85). De tota

manera, aquest camp és el menys estudiat de tots i a l'actualitat els treballs que se centren en la utilitat dels miRNAs circulants per avaluar l'eficàcia dels tractaments i la resistència a quimioteràpics és força limitat, ja que la majoria d'estudis es fixen en la desregulació del miRNAs en teixit.

El primer estudi conegut es va centrar en avaluar l'eficàcia de la pauta FOLFOX (5-fluorouracil/leucovorina/oxaliplatí) com a tractament de primera línia en CCR avançat. En aquest estudi, a partir de 168 miRNAs, se'n van seleccionar cinc (miR-222, miR-144, miR-221, miR-19a, miR-122) que complien una sèrie de criteris de desregulació prèviament establerts. Es va realitzar la seva validació en 36 pacients responedors i 36 resistents al tractament de primera línia i es va evidenciar que miR-19a era l'únic miRNA que presentava una desregulació significativa, sobreexpressant-se en el sèrum d'aquells pacients que presentaven resistència a FOLFOX, mostrant una eficàcia representada per l'àrea sota la corba ROC de 0,68 (95 % IC 0,53-0,82) i presentant una sensibilitat del 67 % i una especificitat del 64 % (86).

Un altre estudi que avaluava també la resistència a una pauta FOLFOX modificada, va observar a la cohort de validació composta per 93 responedors i 80 pacients amb resistència al tractament quimioteràpic que miR-20a, miR-130, miR-145, miR-216 i miR-372 estaven sobreexpressats entre 2,1 i 3,1 vegades en el sèrum del control inicial d'aquells pacients que presentarien posteriorment resistència a oxaliplatí. Sent capaç de diferenciar, a partir d'un algorisme, ambdós grups amb una eficàcia representada per l'àrea sota la corba ROC de 0,92 (95 % IC 0,87-0,96) (87).

S'ha vist també, que en pacients intervinguts i que posteriorment reben un tractament adjuvant amb 5-fluorouracil, la sobreexpressió de miR-17, miR-21, i miR-92 en sèrum després del darrer cicle s'associa a manca de resposta i per tant a recidiva tumoral (88).

En un altre estudi, centrat en avaluar la resposta al tractament neoadjuvant en pacients amb càncer de recte localment avançat, es va observar abans del tractament una sobreexpressió de miR-125b en el sèrum d'aquells pacients no responedors (89).

Altres grups s'han centrat a avaluar l'expressió dels miRNAs en plasma. Kjersem *et al.* (90), partint del plasma de 12 pacients responedors i 12 pacients resistents a oxaliplatí, van examinar l'expressió de 742 miRNAs abans i després del tractament de 4 cicles de 5-fluorouracil/oxaliplatí. Aquells miRNAs que presentaven un grau més elevat de desregulació es van validar en una cohort composta per 150 pacients, observant que miR-106a, miR-484 i miR-130b estaven sobreexpressats, abans del tractament, en el plasma d'aquells pacients no responedors. D'altra banda es va observar també que la sobreexpressió de miR-27b, miR-148a i miR-326 s'associava a un interval lliure de recidiva més curt quan es comparava amb els pacients que no els presentaven sobreexpressats; a més, aquells en els que s'observava sobreexpressió de miR-326 presentaven també una

supervivència inferior. Altres miRNAs en els que s'ha vist que la seva sobreexpressió en plasma després del tractament estava associada a recidiva local i metastasi a distància són miR-155, miR-200c, i miR-210 (75); per altra banda, la sobreexpressió de miR-126 durant la quimioteràpia associada al tractament antiangiogènec amb bevacizumab, s'ha relacionat amb una mala resposta terapèutica (91).

4. Conclusions

Els miRNAs són fragments d'RNA de cadena única d'uns 19 a 25 nucleòtids de llargada que formen part dels ncRNAs de mida curta que intervenen en la regulació post-transcripcional.

Se sap que els miRNAs que es troben en teixits amb cèl·lules malignes s'expressen de forma diferent als dels teixits normals, existint també diferències en funció dels tipus de tumors.

Les diferències en la recollida, manipulació i processament de les mostres, la variabilitat biològica interindividual i els controls de qualitat emprats constitueixen una font d'inconsistència considerable en l'anàlisi dels miRNAs. Aquest fet obliga a una normalització dels resultats obtinguts per reduir la seva variabilitat.

Els miRNAs, un cop aïllats, es poden analitzar a través de diferents procediments, que es basen principalment en els *microarrays*, la qRT-PCR i la NGS.

Existeixen nombrosos miRNAs associats al CCR que presenten accions tant activadores, com inhibidores o de bloqueig de processos relacionats amb el desenvolupament de les cèl·lules malignes. Generalment es classifiquen en oncomiRs i miRNAs supressors, segons inhibeixin l'expressió de gens supressors tumorals o d'oncogens, respectivament.

A dia d'avui existeix l'evidència que l'estudi dels miRNAs en diferents líquids biològics, però sobretot en sèrum, plasma i femta, presenta utilitat en l'avaluació de diferents aspectes del CCR, tant pel que fa al diagnòstic precoç, com al pronòstic i a la valoració de l'eficàcia dels tractaments.

L'anàlisi dels miRNAs és molt prometedora però encara és necessari assolir experiència abans d'utilitzar-los a la pràctica clínica. Serà indispensable aprofundir tant en aspectes metodològics (líquids biològics, variables preanalítiques, normalització) com en la selecció dels candidats més adients i en la interpretació dels resultats obtinguts.

Procediment	Avantatges	Limitacions	Referències
Microarray	<ul style="list-style-type: none"> - D'elecció per la identificació i validació de nous perfils de miRNAs. - Reactius comercialment disponibles - Cobertura àmplia de gens - Es poden processar múltiples mostres simultàniament 	<ul style="list-style-type: none"> - Sondes específiques - Requereix equips especialitzats - Falta de reproductibilitat entre diferents plataformes - Requereix temps i personal qualificat - Normalització de dades complicada - No es poden processar múltiples mostres simultàniament - Potencial limitat per al descobriment de noves seqüències de miRNAs 	(36, 43)
qRT-PCR	<ul style="list-style-type: none"> - <i>Gold</i> estàndard per mesurar l'expressió de miRNAs individuals - Alta especificitat i sensibilitat - Assequible per laboratoris de treball programat 	<ul style="list-style-type: none"> - Cobertura limitada de gens - Requereix normalització de dades 	(37)
NGS	<ul style="list-style-type: none"> - Seqüenciació i quantificació de nivells d'expressió de gens. - Cobertura àmplia de gens - Es poden processar múltiples mostres simultàniament - Permet el descobriment de nous miRNAs - Permet detectar polimorfismes 	<ul style="list-style-type: none"> - Anàlisi de dades no estandarditzat - Alt cost - Requereix temps i personal qualificat 	(38, 48, 49)
Nanostring	<ul style="list-style-type: none"> - Més ràpid i sensible que <i>microarrays</i> i RT-qPCR - Quantificació absoluta 	<ul style="list-style-type: none"> - Només disponible en laboratoris d'investigació actualment 	(50–52)

Taula 1. Comparació dels principals procediments de detecció de miRNAs.

Plasma							
miRNAs	Expressió	CCR/A/Controls	ASC ROC	Sensibilitat	Especificitat	Observacions	Referència
miR-223	+	121/0/153	0,71 (0,65-0,77)	66 % CCR	77 %	Combinació femta i plasma millora ASC ROC fins a 0,91	(47)
miR-92a	+		0,75 (0,69-0,81)	76 % CCR	77 %		
miR-15b	+	80/0/80	0,62 (0,54-0,71)	50 % CCR	69 %	Combinació de 5 miRNAs juntament amb CEA millora ASC ROC fins a 0,82	(67)
miR-17	+		0,66 (0,56-0,74)	68 % CCR	63 %		
miR-21	+		0,65 (0,56-0,74)	71 % CCR	53 %		
miR-26b	+		0,71 (0,63-0,79)	73 % CCR	56 %		
miR-145	+		0,63 (0,54-0,72)	63 % CCR	61 %		
miR-29a	+	100/37/59	0,84 (0,79-0,90)	69 % CCR	89 %	En combinació s'obté una ASC ROC per CCR de 0,88 (0,83-0,94) i 0,77 (0,67-0,88) per AA	(65)
			0,77 (0,67-0,87)	62 % AA	85 %		
miR-92	+		0,84 (0,78-0,90)	84 % CCR	71 %		
			0,75 (0,64-0,86)	65 % AA	81 %		
miR-20a	+	100/0/79	0,59 (0,51-0,67)	46 % CCR	73 %	miR-20a s'associa a tumors indiferenciats	(92)
miR-106a	+		0,61 (0,52-0,69)	74 % CCR	44 %		
miR-34a	+	53/64/28		---	---	Desregulats a A i CCR	(93)
miR-150	-						
miR-221	+	103/0/37	0,61 (0,49-0,72)	86 % CCR	41 %	Pronòstic per supervivència	(94)
miR-506	+	56/0/70	0,75 (0,66-0,82)	61 % CCR	77 %	ASC ROC combinada 0,76 (0,67-0,82)	(45)
miR-4316	+		0,74 (0,66-0,82)	84 % CCR	61 %		
miR-24	-	111/59/130	0,84 (0,79-0,89)	78 % CCR	84 %	Sobreexpressió en pacients que responen al tractament quimioteràpic	(84)
miR-320a	-		0,89 (0,85-0,93)	93 % CCR	73 %		
miR-423-5p	-		0,83 (0,78-0,89)	92 % CCR	77 %		
miR-96	+	40/0/10	0,74 (0,65-0,83)	65 % CCR	73 %	Pronòstic per supervivència	(95)
miR-375	-	88/0/40	0,75 (0,65-0,84)	77 % CCR	64 %		(96)
miR-200c	+	78/0/86	0,75 (0,68-0,82)	64 % CCR	73 %	ASC ROC combinada 0,84 Sen 84,6 % / Espec 75,6 %	(97)
miR-18a	+		0,80 (0,74-0,87)	73 % CCR	79 %		
miR-19a	+	42/0/53	0,84 (0,76-0,92)	79 % CCR	79 %		(69)
miR-19b	+						
miR-15b	+						
miR-18a		0/40/53	0,64 (0,52-0,75)	72 % AA	57 %		(69)
miR-532-3p	+	45/16/26	0,87 (0,76-0,98)	88 % A	64 %		(98)
miR-331	+						
miR-195	+						
miR-17	+						
miR-142-3p	+						
miR-15b	+						
miR-532	+						
miR-652	+						
miR-431	+	45/16/26	0,83 (0,73-0,93)	91 % CCR	57 %		(98)

miR-139-3p	+						
miR-409-3p	+	22/0/27	0,90 (0,75-0,95)	82 % CCR	89 %	Resultats del panell en la sèrie de validació	(68)
miR-7	-						
miR-93	-						
miR-601	-	90/43/58	0,79 (0,72-0,87),	83 % CCR	69 %		(99)
miR-760	-		0,68 (0,58-0,79)	72 % AA	62 %		

Taula 2. Capacitat diagnòstica individual i combinada de diferents miRNAs en plasma.

CCR: càncer colorectal; AA: adenoma avançat; A: adenoma; +: sobreexpressat; -: infraexpressat; ASC: Àrea sota la corba.

Sèrum							
miRNAs	Expressió	CCR/A/Controls	ASC ROC	Sensibilitat	Especificitat	Observacions	Referència
miR-21	+	148/12/77	0,71 (0,64-0,77)	---	---	Distribució grup de validació (8/128 versus 52) Combinada 0,83 (0,77-0,88)	(77)
miR-29a	+		0,74 (0,67-0,80)				
miR-125b	+		0,81 (0,74-0,86)				
miR-29b	-	55/0/55	0,87 (0,80-0,96)	77 % CCR	75 %	Correlacionats inversament amb estadi tumoral	(100)
miR-194	-		0,85 (0,79-0,93)	72 % CCR	80 %		
miR-103	+	114/0/32	0,66 (---)	56 % CCR	75 %	Descens de l'expressió després de la cirurgia	(78)
miR-720	+		0,63 (---)	58 % CCR	56 %		
miR-21	+		0,68 (---)	55 % CCR	84 %		
miR-155	+	146/0/60	0,78 (0,71-0,84)	58 % CCR	95 %	Impacte en supervivència i progressió	(101)
miR-210	+	268/0/102	0,82 (0,78-0,86)	75 % CCR	74 %	Impacte en supervivència i progressió	(102)
miR-196b	+	103/51/100	0,81 (0,75-0,87)	87 % CCR	63 %	Sense utilitat en adenomes	(103)
miR-139-3p	-	117/0/90	0,99 (0,99-1,00)	97 % CCR	98 %		(104)
miR-622	+		(---)	88 % CCR	68 %		
miR-18a	+	30/0/26	(---)	---	---	No tots els miRNAs expressats en tumor es detecten en sèrum	(105)
miR-29a	+		(---)				
miR-30b	-	11/20/10	(---)	---	---		(66)
miR-486	+		(---)				
miR-145	-	175/0/130	0,87 (0,84-0,91)	79 % CCR	83 % CCR	ASC ROC combinada 0,89 (0,85-0,92)	(106)
miR-106a	+		0,81 (0,77-0,86)				
miR-17-3p	+		0,78 (0,73-0,83)				
let-7g	+	83/0/59	0,92 (0,87-0,98)	96 % CCR	88 %	Millora l'eficàcia diagnòstica de CEA i CA19.9	(70)
miR-21	+						
miR-31	-						
miR-92a	-						
miR-181b	-						
miR-203	-						
miR-19a-3p	+	120/50/70	0,85 (0,79-0,90)	84 % CCR	92 %	ASC ROC combinada 0,95 (0,91-0,98)	(107)
miR-223-3p	+		0,89 (0,83-0,93)				
miR-92a-3p	+		0,87 (0,81-0,92)				
miR-422a	-		0,84 (0,78-0,89)				

Taula 3. Capacitat diagnòstica individual i combinada de diferents miRNAs en sèrum.

CCR: càncer colorectal; AA: adenoma avançat; A: adenoma; +: sobreexpressat; -: infraexpressat; ASC: Àrea sota la corba.

Femta							
miRNAs	Expressió	CRC/A/Controls	ASC ROC	Sensibilitat	Especificitat	Observacions	Referència
miR-106a	+	10/09/2010		---	---	Obtenció de miRNAs a partir de tubs d'hemoglobina en femta	(79)
miR-21	+						
miR-135b	+	104/169/109	0,79 (---) CCR	78 % CCR	68 %	Reducció de l'expressió després de la cirurgia	(108)
			0,71 (---) A	73 % AA			
miR-92a	+	88/57/101	0,78 (---) CCR	72 % CCR	73 %	Reducció de l'expressió després d'extirpar AA i CCR	(46)
				56 % A			
miR-20a	+	198/199 /198	0,73 (0,68-0,78)	55 % CRC	82 %		(109)
miR-21	+	88/57/101	0,64 (---) CCR	56 % CCR	73 %	Reducció de l'expressió després d'extirpar CCR	(46)
				44 % A			
miR-221	+	198/199 /198	0,73 (0,68-0,78)	62 % CRC	74 %	ASC ROC combinada 0,75 (0,70-0,80)	(110)
miR-18a	+		0,67 (0,62-0,72)	61 % CRC	69 %		
miR-144	+	35/0/40	0,83 (---)	74 % CRC	87 %		(111)
miR-106a	+	117/0/107		34 % CRC	97 %		(112)
miR-223	+	17/0/28		77 % CRC	96 %		(72)
miR-451	+			88 % CRC	100 %		
miR-223	+	247/0/76	0,80 (0,73-0,86)	77 % CRC	65 %	Combinació femta i plasma millora ASC ROC fins a 0,91	(47)
miR-92a	+		0,75 (0,68-0,81)	61 % CRC	82 %		
miR-4478	-	40/0/16	0,70 (---)	---	---		(113)
miR-1295b-3p	-		0,71 (---)				
miR-143	-	38/0/13		---	---		(114)
miR-145	-						
	-	80/0/51	0,78 (---)	---	---		(115)
miR-223	-		0,65 (---)				
miR-224	-		0,74 (---)				

Taula 4. Capacitat diagnòstica individual i combinada de diferents miRNAs en femta.

CCR: càncer colorectal; AA: adenoma avançat; A: adenoma; +: sobreexpressat; -: infraexpressat; ASC: Àrea sota la corba.

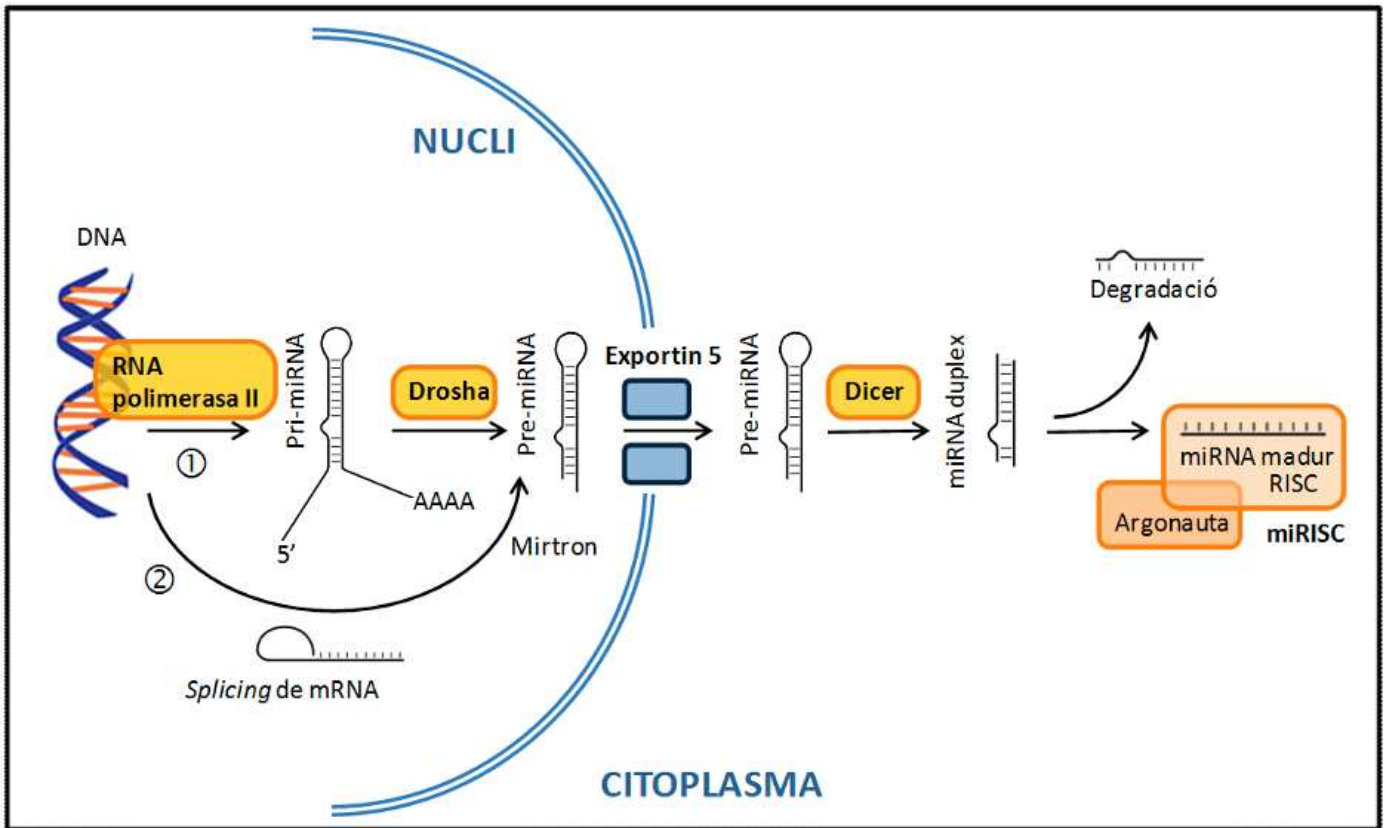


Figura 1 Síntesi dels miRNAs

① Via canónica; ② Via nocanònica; RISC: sigles de l'anglès *RNA-induced silencing complex*

Referències

1. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011;12(12):861–74.
2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
3. Hollis M, Nair K, Vyas A, Chaturvedi LS, Gambhir S, Vyas D. MicroRNAs potential utility in colon cancer: Early detection, prognosis, and chemosensitivity. *World J Gastroenterol* 2015;21(27):8284–92.
4. Ren A, Dong Y, Tsoi H, Yu J. Detection of miRNA as Non-Invasive Biomarkers of Colorectal Cancer. *Int J Mol Sci* 2015;16(2):2810–23.
5. Binefa G, Rodríguez-Moranta F, Teule A, Medina-Hayas M. Colorectal cancer: from prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol* 2014;20(22):6786–808.
6. Carroll MRR, Seaman HE, Halloran SP. Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clin Biochem* 2014;47(10–11):921–39.
7. Castells A. Choosing the optimal method in programmatic colorectal cancer screening: Current evidence and controversies. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2015;8:221–33.
8. Schreuders EH, Grobbee EJ, Spaander MCW, Kuipers EJ. Advances in Fecal Tests for Colorectal Cancer Screening. *Curr Treat Options Gastroenterol* 2016;14(1):152–62.
9. Gonzalez-Pons M, Cruz-Correa M. Colorectal Cancer Biomarkers: Where Are We Now? *Biomed Res Int* 2015:1–14.
10. Hu X, Sood AK, Dang C V, Zhang L. The role of long noncoding RNAs in cancer: the dark matter matters. *Curr Opin Genet Dev* 2018;48:8–15.
11. Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends Genet* 2005;21(5):289–97.
12. Oliveto S, Mancino M, Manfrini N, Biffo S. Role of microRNAs in translation regulation and cancer. *World J Biol Chem* 2017;8(1):45–56.
13. Becker N, Lockwood CM. Pre-analytical variables in miRNA analysis. *Clin Biochem* 2013;46:861–8.
14. Duy J, Koehler JW, Honko AN, Minogue TD. Optimized microRNA purification from TRIzol-treated plasma. *BMC Genomics* 2015;18(1):16–95.
15. Doleshal M, Magotra AA, Choudhury B, Cannon BD, Labourier E, Szafranska AE. Evaluation and validation of total RNA extraction methods for microRNA expression analyses in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *J Mol Diagn* 2008;10(3):203–11.
16. Brunet-Vega A, Pericay C, Quílez ME, Ramírez-Lázaro MJ, Calvet X, Lario S. Variability in microRNA recovery from plasma: Comparison of five commercial kits. *Anal Biochem* 2015;488:28–35.
17. McAlexander MA, Phillips MJ, Witwer KW. Comparison of methods for miRNA extraction from plasma and quantitative recovery of RNA from cerebrospinal fluid. *Front Genet* 2013;4:83.
18. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010;50(4):298–301.
19. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogossova-Agadjanya EL, *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105(30):10513–8.
20. Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, *et al.* Characterization of microRNAs in serum: A novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008;18(10):997–1006.
21. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci* 2011;108(12):5003–8.
22. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ. Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012;7(7).
23. Kim DJ, Linnstaedt S, Palma J, Park JC, Ntrivalas E, Kwak-Kim JYH, *et al.* Plasma components affect accuracy of circulating cancer-related microRNA quantitation. *J Mol Diagn* 2012;14(1):71–80.
24. Kirschner MB, Kao SC, Edelman JJ, Armstrong NJ, Valley MP, van Zandwijk N, *et al.* Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 2011;6(9).
25. Pritchard CC, Kroh E, Wood B, Arroyo JD, Dougherty KJ, Miyaji MM, *et al.* Blood Cell Origin of Circulating MicroRNAs: A Cautionary Note for Cancer Biomarker Studies. *Cancer Prev Res* 2012;5(3):492–7.
26. McDonald JS, Milosevic D, Reddi H V., Grebe SK, Algeciras-Schimmich A. Analysis of Circulating MicroRNA: Preanalytical and Analytical Challenges. *Clin Chem* 2011;57(6):833–40.
27. Rice J, Roberts H, Burton J, Pan J, States V, Rai SN, *et al.* Assay reproducibility in clinical studies of plasma miRNA. *PLoS One* 2015;10(4).
28. 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(5):844–52.
29. Danese E, Minicozzi AM, Benati M, Paviati E, Lima-Oliveira G, Gusella M, *et al.* Reference miRNAs for colorectal cancer: Analysis and verification of current data. *Sci Rep* 2017;7(1):8413.
30. Yang J, Ma D, Fesler A, Zhai H, Leamniramit A, Li W, *et al.* Expression analysis of microRNA as prognostic biomarkers in colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8(32):52403–12.
31. Niu Y, Wu Y, Huang J, Li Q, Kang K, Qu J, *et al.* Identification of reference genes for circulating microRNA analysis in colorectal cancer. *Sci Rep* 2016;6:35611.

32. Moldovan L, Batte KE, Trgovcich J, Wisler J, Marsh CB, Piper M. Methodological challenges in utilizing miRNAs as circulating biomarkers. *J Cell Mol Med* 2014;18(3):371–90.
33. Sourvinou IS, Markou A, Lianidou ES. Quantification of Circulating miRNAs in Plasma. *J Mol Diagn* 2013;15(6):827–34.
34. Roberts TC, Coenen-Stass AML, Betts CA, Wood MJA. Detection and quantification of extracellular microRNAs in murine biofluids. *Biol Proced Online* 2014;16(1):5.
35. Day E, Dear PH, McCaughan F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine. *Methods* 2013;59(1):101–7.
36. Yin JQ, Zhao RC, Morris K V. Profiling microRNA expression with microarrays. *Trends Biotechnol* 2008;26(2):70–6.
37. Benes V, Castoldi M. Expression profiling of microRNA using real-time quantitative PCR, how to use it and what is available. *Methods* 2010;50(4):244–9.
38. Buermans HPJ, den Dunnen JT. Next generation sequencing technology: Advances and applications. *Biochim Biophys Acta* 2014;1842(10):1932–41.
39. Gao Z, Yang Z. Detection of microRNAs using electrocatalytic nanoparticle tags. *Anal Chem* 2006;78(5):1470–7.
40. Hofmann S, Huang Y, Paulicka P, Kappel A, Katus HA, Keller A, *et al.* Double-Stranded Ligation Assay for the Rapid Multiplex Quantification of MicroRNAs. *Anal Chem* 2015;87(24):12104–11.
41. Várallyay É, Burgyán J, Havelda Z. Detection of microRNAs by Northern blot analyses using LNA probes. *Methods* 2007;43(2):140–5.
42. Zhou WJ, Chen Y, Corn RM. Ultrasensitive microarray detection of short RNA sequences with enzymatically modified nanoparticles and surface plasmon resonance imaging measurements. *Anal Chem* 2011;83(10):3897–902.
43. Liu C-G, Calin GA, Volinia S, Croce CM. MicroRNA expression profiling using microarrays. *Nat Protoc* 2008;3(4):563–78.
44. Elshafei A, Shaker O, Abd El-motaal O, Salman T. The expression profiling of serum miR-92a, miR-375, and miR-760 in colorectal cancer: An Egyptian study. *Tumour Biol* 2017;39(6):101042831770576.
45. Krawczyk P, Powrózek T, Olesiński T, Dmitruk A, Dziwota J, Kowalski D, *et al.* Evaluation of miR-506 and miR-4316 expression in early and non-invasive diagnosis of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 2017;32(7):1057–60.
46. Wu CW, Ng SSM, Dong YJ, Ng SC, Leung WW, Lee CW, *et al.* Detection of miR-92a and miR-21 in stool samples as potential screening biomarkers for colorectal cancer and polyps. *Gut* 2012;61(5):739–45.
47. Chang P-Y, Chen C-C, Chang Y-S, Tsai W-S, You J-F, Lin G-P, *et al.* MicroRNA-223 and microRNA-92a in stool and plasma samples act as complementary biomarkers to increase colorectal cancer detection. *Oncotarget* 2016;7(9):10663–75.
48. Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet* 2010;11(1):31–46.
49. Cloonan N, Wani S, Xu Q, Gu J, Lea K, Heater S, *et al.* MicroRNAs and their isomiRs function cooperatively to target common biological pathways. *Genome Biol* 2011;12(12):R126.
50. Geiss GK, Bumgarner RE, Birditt B, Dahl T, Dowidar N, Dunaway DL, *et al.* Direct multiplexed measurement of gene expression with color-coded probe pairs. *Nat Biotechnol* 2008;26(3):317–25.
51. Bailey ST, Westerling T, Brown M. Loss of Estrogen-Regulated microRNA Expression Increases HER2 Signaling and Is Prognostic of Poor Outcome in Luminal Breast Cancer. *Cancer Res* 2015;75(2):436–45.
52. Zhang J, Raju GS, Chang DW, Lin SH, Chen Z, Wu X. Global and targeted circulating microRNA profiling of colorectal adenoma and colorectal cancer. *Cancer* 2018;124(4):785–96.
53. Guinn D, Ruppert AS, Maddocks K, Jaglowski S, Gordon A, Lin TS, *et al.* miR-155 expression is associated with chemoimmunotherapy outcome and is modulated by Bruton's tyrosine kinase inhibition with Ibrutinib. *Leukemia* 2015;29(5):1210–3.
54. Shirafkan N, Mansoori B, Mohammadi A, Shomali N, Ghasbi M, Baradaran B. MicroRNAs as novel biomarkers for colorectal cancer: New outlooks. *Biomed Pharmacother* 2018;97:1319–30.
55. Moody L, He H, Pan Y-X, Chen H. Methods and novel technology for microRNA quantification in colorectal cancer screening. *Clin Epigenetics* 2017;9(1):119.
56. Baxter NN, Warren JL, Barrett MJ, Stukel TA, Doria-Rose VP. Association between colonoscopy and colorectal cancer mortality in a US cohort according to site of cancer and colonoscopist specialty. *J Clin Oncol* 2012;30(21):2664–9.
57. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L. Association of colonoscopy and death from colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2009;150(1):1–8.
58. Kahi CJ, Anderson JC, Rex DK. Screening and surveillance for colorectal cancer: State of the art. *Gastrointestinal Endoscopy* 2013;77:335–50.
59. Hardcastle JD, Chamberlain JO, Robinson MH, Moss SM, Amar SS, Balfour TW, *et al.* Randomised controlled trial of faecal-occult-blood screening for colorectal cancer. *Lancet* 1996;348(9040):1472–7.
60. Kronborg O, Fenger C, Olsen J, Jørgensen OD, Søndergaard O. Randomised study of screening for colorectal cancer with faecal-occult-blood test. *Lancet* 1996;348:1467–71.
61. Mandel JS, Bond JH, Church TR, Snover DC, Bradley GM, Schuman LM, *et al.* Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood. Minnesota Colon Cancer Control Study. *N Engl J Med* 1993;328(19):1365–71.
62. Lee JK, Liles EG, Bent S, Levin TR, Corley DA. Accuracy of fecal immunochemical tests for

- colorectal cancer: Systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med* 2014;160(3):171–81.
63. Park D II, Ryu S, Kim Y-H, Lee S-H, Lee CK, Eun CS, *et al.* Comparison of guaiac-based and quantitative immunochemical fecal occult blood testing in a population at average risk undergoing colorectal cancer screening. *Am J Gastroenterol* 2010;105(9):2017–25.
 64. Yang X, Zeng Z, Hou Y, Yuan T, Gao C, Jia W, *et al.* MicroRNA-92a as a potential biomarker in diagnosis of colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2014;9(2).
 65. 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(1):118–26.
 66. Ho GYF, Jung HJ, Schoen RE, Wang T, Lin J, Williams Z, *et al.* Differential expression of circulating microRNAs according to severity of colorectal neoplasia. *Transl Res* 2015;166(3):225–32.
 67. Pan C, Yan X, Li H, Huang L, Yin M, Yang Y, *et al.* Systematic literature review and clinical validation of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8:68317-28.
 68. Wang S, Xiang J, Li Z, Lu S, Hu J, Gao X, *et al.* A plasma microRNA panel for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 2015;136(1):152–61.
 69. Giraldez MD, Lozano JJ, Ramirez G, Hijona E, Bujanda L, Castells A, *et al.* Circulating microRNAs as biomarkers of colorectal cancer: results from a genome-wide profiling and validation study. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2013;11(6):681–8 e3.
 70. Wang J, Huang S, Zhao M, Yang M, Zhong J, Gu Y, *et al.* Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PLoS One* 2014;9(4):e87451.
 71. Zeng W, Tu Y, Zhu Y, Wang Z, Li C, Lao L, *et al.* Predictive power of circulating miRNAs in detecting colorectal cancer. *Tumor Biol* 2015;36(4):2559–67.
 72. Phua LC, Chue XP, Koh PK, Cheah PY, Chan ECY, Ho HK. Global fecal microRNA profiling in the identification of biomarkers for colorectal cancer screening among Asians. *Oncol Rep* 2014;32(1):97–104.
 73. Xi Y, Formentini A, Chien M, Weir DB, Russo JJ, Ju J, *et al.* Prognostic Values of microRNAs in Colorectal Cancer. *Biomark Insights* 2007;1:113–21.
 74. Toiyama Y, Hur K, Tanaka K, Inoue Y, Kusunoki M, Boland CR, *et al.* Serum miR-200c is a novel prognostic and metastasis-predictive biomarker in patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 2014;259(4):735–43.
 75. Chen J, Wang W, Zhang Y, Chen Y, Hu T. Predicting distant metastasis and chemoresistance using plasma miRNAs. Vol. 31, *Med Oncol* 2014;31(1):799.
 76. Toiyama Y, Takahashi M, Hur K, Nagasaka T, Tanaka K, Inoue Y, *et al.* Serum miR-21 as a diagnostic and prognostic biomarker in colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 2013;105(12):849–59.
 77. Yamada A, Horimatsu T, Okugawa Y, Nishida N, Honjo H, Ida H, *et al.* Serum MIR-21, MIR-29a, and MIR-125b are promising biomarkers for the early detection of colorectal neoplasia. *Clin Cancer Res* 2015;21(18):4234–42.
 78. Nonaka R, Miyake Y, Hata T, Kagawa Y, Kato T, Osawa H, *et al.* Circulating miR-103 and miR-720 as novel serum biomarkers for patients with colorectal cancer. *Int J Oncol* 2015;47(3):1097–102.
 79. Link A, Balaguer F, Shen Y, Nagasaka T, Lozano JJ, Boland CR, *et al.* Fecal MicroRNAs as novel biomarkers for colon cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2010;19(7):1766–74.
 80. Menéndez P, Padilla D, Villarejo P, Palomino T, Nieto P, Menéndez JM, *et al.* Prognostic implications of serum microRNA-21 in colorectal cancer. *J Surg Oncol* 2013;108(6):369–73.
 81. Faltejskova P, Bocanek O, Sachlova M, Svoboda M, Kiss I, Vyzula R, *et al.* Circulating miR-17-3p, miR-29a, miR-92a and miR-135b in serum: Evidence against their usage as biomarkers in colorectal cancer. *Cancer Biomarkers* 2012;12(4–5):199–204.
 82. Witwer KW. Circulating MicroRNA biomarker studies: Pitfalls and potential solutions. *Clin Chem* 2015;61:56–63.
 83. Yuan Z, Baker K, Redman MW, Wang L, Adams S V., Yu M, *et al.* Dynamic plasma microRNAs are biomarkers for prognosis and early detection of recurrence in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2017;117(8):1202–10.
 84. Fang Z, Tang J, Bai Y, Lin H, You H, Jin H, *et al.* Plasma levels of microRNA-24, microRNA-320a, and microRNA-423-5p are potential biomarkers for colorectal carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2015;34(1):86.
 85. Amirkhah R, Farazmand A, Irfan-Maqsood M, Wolkenhauer O, Schmitz U. The role of microRNAs in the resistance to colorectal cancer treatments. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 2015;61(6):17–23.
 86. Chen Q, Xia HW, Ge XJ, Zhang YC, Tang QL, Bi F. Serum miR-19a predicts resistance to FOLFOX chemotherapy in advanced colorectal cancer cases. *Asian Pacific J Cancer Prev* 2013;14(12):7421–6.
 87. Zhang J, Zhang K, Bi M, Jiao X, Zhang D, Dong Q. Circulating microRNA expressions in colorectal cancer as predictors of response to chemotherapy. *Anticancer Drugs* 2014;25(3):346–52.
 88. Conev N V., Donev IS, Konsoulova-Kirova AA, Chervenkov TG, Kashlov JK, Ivanov KD. Serum expression levels of miR-17, miR-21, and miR-92 as potential biomarkers for recurrence after adjuvant chemotherapy in colon cancer patients. *Biosci Trends* 2015;9(6):393–401.
 89. D'Angelo E, Fassan M, Maretto I, Pucciarelli S, Zanon C, Digito M, *et al.* Serum miR-125b is a non-invasive predictive biomarker of the pre-operative chemoradiotherapy responsiveness in patients with rectal adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016;7(19):28647–57.
 90. Kjersem JB, Ikdahl T, Lingjaerde OC, Guren T, Tveit KM, Kure EH. Plasma microRNAs predicting clinical

- outcome in metastatic colorectal cancer patients receiving first-line oxaliplatin-based treatment. *Mol Oncol* 2014;8(1):59–67.
91. Hansen TF, Carlsen AL, Heegaard NHH, Sørensen FB, Jakobsen A. Changes in circulating microRNA-126 during treatment with chemotherapy and bevacizumab predicts treatment response in patients with metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015;112(4):624–9.
 92. Chen WY, Zhao XJ, Yu ZF, Hu FL, Liu YP, Cui B Bin, *et al.* The potential of plasma miRNAs for diagnosis and risk estimation of colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(6):7092–101.
 93. Aherne ST, Madden SF, Hughes DJ, Pardini B, Naccarati A, Levy M, *et al.* Circulating miRNAs miR-34a and miR-150 associated with colorectal cancer progression. *BMC Cancer* 2015;15(1).
 94. Pu XX, Huang GL, Guo HQ, Guo CC, Li H, Ye S, *et al.* Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol Hepatol* 2010;25(10):1674–80.
 95. Sun Y, Liu Y, Cogdell D, Calin GA, Sun B, Kopetz S, *et al.* Examining plasma microRNA markers for colorectal cancer at different stages. *Oncotarget* 2016;7(10):11434–49.
 96. Xu L, Li M, Wang M, Yan D, Feng G, An G. The expression of microRNA-375 in plasma and tissue is matched in human colorectal cancer. *BMC Cancer* 2014;14(1):714.
 97. Zhang G-JG, Zhou T, Liu Z-LZ, Tian H-P, Xia S-S. Plasma miR-200c and miR-18a as potential biomarkers for the detection of colorectal carcinoma. *Mol Clin Oncol* 2013;1(2):379–84.
 98. Kanaan Z, Roberts H, Eichenberger MR, Billeter A, Ocheretner G, Pan J, *et al.* A plasma MicroRNA panel for detection of colorectal adenomas: A step toward more precise screening for colorectal cancer. *Ann Surg* 2013;258(3) 400–6.
 99. Wang Q, Huang Z, Ni S, Xiao X, Xu Q, Wang L, *et al.* Plasma miR-601 and miR-760 Are Novel Biomarkers for the Early Detection of Colorectal Cancer. *PLoS One* 2012;7(9).
 100. Basati G, Razavi AE, Pakzad I, Malayeri FA. Circulating levels of the miRNAs, miR-194, and miR-29b, as clinically useful biomarkers for colorectal cancer. *Tumor Biol* 2016;37(2):1781–8.
 101. Lv Z chuan, Fan Y sheng, Chen H bing, Zhao D wei. Investigation of microRNA-155 as a serum diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *Tumor Biol* 2014;36(3):1619–25.
 102. Wang W, Qu A, Liu W, Liu Y, Zheng G, Du L, *et al.* Circulating miR-210 as a diagnostic and prognostic biomarker for colorectal cancer. *Eur J Cancer Care (Engl)* 2017;26(4).
 103. Xu C, Gu L. The diagnostic effect of serum miR-196b as biomarker in colorectal cancer. *Biomed reports* 2017;6(1):39–45.
 104. Ng L, Wan TM-H, Man JH-W, Chow AK-M, Iyer D, Chen G, *et al.* Identification of serum miR-139-3p as a non-invasive biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget* 2017;8(16):27393–400.
 105. Vega AB, Pericay C, Moya I, Ferrer A, Dotor E, Pisa A, *et al.* microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: Circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncol Rep* 2013;30(1):320–6.
 106. Li J, Liu Y, Wang C, Deng T, Liang H, Wang Y, *et al.* Serum miRNA expression profile as a prognostic biomarker of stage II/III colorectal adenocarcinoma. *Sci Rep* 2015;5:12921.
 107. Zheng G, Du L, Yang X, Zhang X, Wang L, Yang Y, *et al.* Serum microRNA panel as biomarkers for early diagnosis of colorectal adenocarcinoma. *Br J Cancer* 2014;111(10):1985–92.
 108. Wu CW, Ng SC, Dong Y, Tian L, Ng SSM, Leung WW, *et al.* Identification of microRNA-135b in stool as a potential noninvasive biomarker for colorectal cancer and adenoma. *Clin Cancer Res* 2014;20(11):2994–3002.
 109. Yau TO, Wu CW, Tang C-M, Chen Y, Fang J, Dong Y, *et al.* microRNA-20a in human faeces as a non-invasive biomarker for colorectal cancer. *Oncotarget* 2016;7(2):1559–68.
 110. Yau TO, Wu CW, Dong Y, Tang CM, Ng SSM, Chan FKL, *et al.* microRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2014;111(9):1765–71.
 111. Kalimutho M, Del Vecchio Blanco G, Di Cecilia S, Sileri P, Cretella M, Pallone F, *et al.* Differential expression of miR-144* as a novel fecal-based diagnostic marker for colorectal cancer. *J Gastroenterol* 2011;46(12):1391–402.
 112. Koga Y, Yamazaki N, Yamamoto Y, Yamamoto S, Saito N, Kakugawa Y, *et al.* Fecal miR-106a is a useful marker for colorectal cancer patients with false-negative results in immunochemical fecal occult blood test. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2013;22(10):1844–52.
 113. Ghanbari R, Mosakhani N, Asadi J, Nouraei N, Mowla SJ avad, Poustchi H, *et al.* Decreased expression of fecal miR-4478 and miR-1295b-3p in early-stage colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2015;15(2):189–95.
 114. Li JM, Zhao RH, Li ST, Xie CX, Jiang HH, Ding WJ, *et al.* Down-regulation of fecal miR-143 and miR-145 as potential markers for colorectal cancer. *Saudi Med J* 2012;33(1):24–9.
 115. Zhu Y, Xu A, Li J, Fu J, Wang G, Yang Y, *et al.* Fecal miR-29a and miR-224 as the noninvasive biomarkers for colorectal cancer. *Cancer Biomarkers* 2016;16(2):259–64.