

# MicroRNAs y receptores hormonales: identificación y cuantificación en tumores de mama

Francisco Germán Rodríguez González

Bonifacio Nicolás Díaz Chico (director)

Juan C. Díaz Chico (co-director)

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA endógeno no codificante (19-25 nucleótidos), actúan como moléculas reguladoras de la expresión génica. Tras unirse a la región 3'-UTR de sus mRNAs diana inhiben su traducción, bien provocando su degradación, o la inhibición de la maquinaria de traducción. En este trabajo, hemos tratado de identificar, y poner a punto las técnicas necesarias para la cuantificación de los miRNAs asociados con el control post-transcripcional del receptor de andrógenos (AR) y el receptor de estrógenos (ER) en tumores de mama. Para ello, hemos usado las bases de datos publicadas en Internet. Además, comparamos la cantidad y la calidad del RNA total aislado (miRNA y mRNA) en 11 tumores de mama incluidos en parafina mediante el uso de dos kits comerciales. La cuantificación de los niveles de expresión de los miRNAs pre-seleccionados se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR, Applied Biosystems). Los mejores resultados se obtuvieron con el kit RecoverAll Total Nucleic Acid (Ambion) tanto en el aislamiento del RNA como en la cuantificación de los miRNAs. El conocimiento de los niveles de expresión de los miRNAs que regulan al RA y al RE sería de gran utilidad para la comprensión de los mecanismos moleculares que intervienen en la respuesta tumoral frente a andrógenos y estrógenos en cáncer de mama, pudiendo ser usados como factores pronóstico y/o predictivo en la práctica clínica.

*MicroRNAs (miRNA) are short non-coding RNAs (22-nucleotide), that can regulate the gene expression by sequence-specific base pairing at the 3'-untranslated regions (UTR) of the target mRNA, inducing direct mRNA degradation or translational inhibition. Using published databases we tried to find out which miRNAs are associated with posttranscriptional regulation of androgen receptor (AR) and estrogen receptor (ER). In addition, we tested the quality and quantity of isolated RNA by two commercial extraction kits. Furthermore, we quantify by Real Time PCR, the expression levels of selected miRNAs in 11 formalin fixed paraffin embedded (FFPE) breast tumors. The best results were obtained from RecoverAll Total Nucleic Acid (Ambion), either for RNA isolation or miRNA quantification. The Knowledge of AR and ER regulating miRNAs and their expression levels could help to elucidate the role of androgens and estrogens in breast cancer. Furthermore those miRNAs could be used as prognostic or predictive markers by the clinicians.*

## Introducción

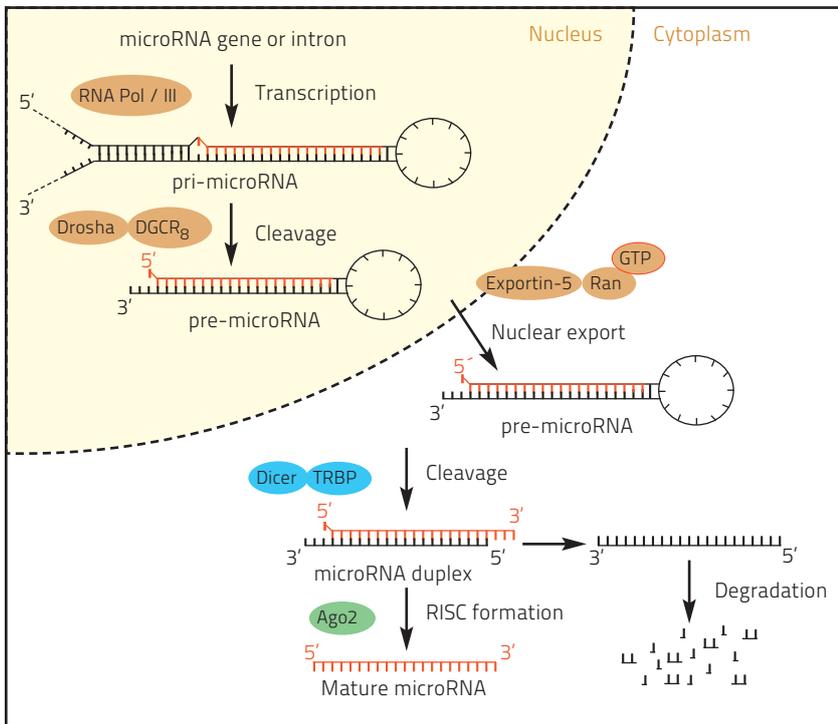
### Los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son pequeñas moléculas de RNA endógeno que no codifican para proteína. Actúan como moléculas que regulan post-transcripcionalmente la expresión génica (Bartel 2004). Es-

tas moléculas de RNA no codificantes fueron inicialmente descubiertas en *C. elegans* por Victor Ambros et al., quienes descubrieron que lin-4, un gen que actuaba en el control del desarrollo de *C. elegans*, no codificaba para proteína, pero en cambio producía dos RNAs pequeños, uno de 22nt y otro de 61nt de longitud. El más largo adopta una

conformación en *stem loop*, que es el precursor de un RNA más corto (Lee et al. 1993).

En humanos, se han registrado más de 500 miRNAs maduros. Esta cifra va en aumento a medida que se implementan los algoritmos bioinformáticos empleados para su identificación. Poco a poco se van identificando sus dianas reales en



**Figura 1.** Elementos que intervienen en la biogénesis de los miRNAs (Winter et al. 2009)

Una vez en el citoplasma, esta molécula de unos 70nt será cortada por la endonucleasa RNasa III conocida como Dicer, asociada a las proteínas TRBP y PACT en mamíferos, dando lugar a una molécula de miRNA bicatenario (Grishok et al. 2001; Lund et al. 2004). Este miRNA bicatenario se separa en dos cadenas y da lugar al miRNA maduro de unos 20–25nt que se incorpora al complejo ribonucleoproteico conocido como *RNA induced silencing complex* (RISC) el cual es la maquinaria catalítica responsable de la degradación del mRNA diana y/o de la inhibición de la traducción, mientras que la otra cadena, conocida como miRNA\*, es degradada (Khvorova et al. 2003; Schwarz et al. 2003). Una vez el RISC se ha ensamblado con el miRNA maduro, este se unirá al mRNA diana en la región UTR 3' para bloquear su traducción (Winter et al. 2009). (Figura 1).

#### Mecanismos de acción de los miRNAs

Los miRNAs pueden regular negativamente la expresión génica a través de dos mecanismos principales: a) degradación del mRNA diana o b) mediante la represión de la traducción. Una vez el miRNA se incorpora en el complejo citoplasmático RISC, actuará un mecanismo u otro dependiendo del grado de complementariedad del miRNA con su diana. Si la complementariedad es elevada o total se producirá la degradación del mRNA, mientras que si la complementariedad no es total o es insuficiente se producirá

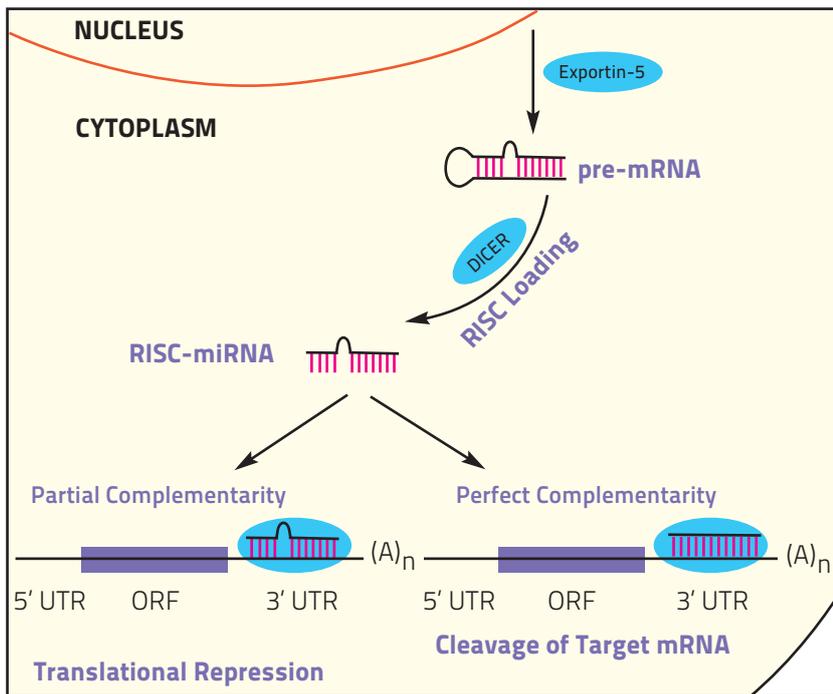
base a las predichas por las herramientas informáticas. Entre las funciones que desempeñan los miRNAs podemos destacar: el control de la proliferación y muerte celular, metabolismo de los ácidos grasos en moscas, formación del patrón neuronal en nematodos, modulación de la diferenciación del linaje hematopoyético en mamíferos o control del desarrollo de las hojas y las flores en plantas, entre muchas otras.

#### Biogénesis de los miRNAs

Los genes que codifican para los miRNAs se localizan principalmente en los intrones de genes que pueden codificar para proteínas, así como también en regiones intergénicas o exónicas (Rodríguez et al. 2004; Zeng 2006).

Los microRNAs maduros son moléculas de unos 20–25 nucleótidos de longitud, con un grupo fosfato en el extremo 5' y un grupo hidroxilo en el extremo 3'. Éstos derivan

de un procesamiento que se inicia en el núcleo de la célula y termina en el citoplasma donde realizan su función. Son transcritos por la RNA polimerasa II que produce una larga molécula de RNA que puede exceder 1 kb, conocida con el nombre de miRNA primario (pri-miRNAs) (Lee et al. 2004). Este forma una estructura en *hairpin stem-loop* la cual es cortada en el núcleo por la endonucleasa RNasa III conocida con el nombre de Drosha, que está asociada con la proteína DGCR8 (en mamíferos) o Pasha (en *Drosophila* y *C.elegans*). *Drosha* corta de forma asimétrica ambas cadenas en los sitios cercanos a la base de la estructura primaria en forma de stem-loop, de forma que el producto resultante es una molécula de unos 60–70 nucleótidos denominada pre-miRNA (Lee et al. 2003). Este pre-miRNA es exportado al citoplasma de forma activa a través del complejo dependiente de RAN-GTP, Exportina-5 (Yi et al. 2003).



**Figura 2.** Mecanismos de acción de los miRNAs (Bartel 2004)

una inhibición de la traducción (Bagga et al. 2005). (Figura 2).

### miRNAs y cáncer

La mayoría de los miRNAs humanos se encuentran localizados en regiones genómicas asociadas a cáncer (Calin et al. 2004), y hay una evidencia creciente que sugiere que la expresión anormal de los miRNAs es una característica común de los procesos neoplásicos (Calin and Croce 2006). Además se ha sugerido que los patrones de expresión de miRNAs pueden distinguir cánceres según su diagnóstico y estadio de desarrollo, de forma mucho más precisa que los estudios tradicionales de expresión génica (Lu et al. 2005). Por tanto, juegan un papel directo en la oncogénesis, pudiendo actuar como oncogenes o bien actuando como genes supresores de tumores (Esquela-Kerscher and Slack 2006).

### Cáncer de mama

Aproximadamente el 70% de los pacientes con cáncer de mama (CM)

expresan diferentes receptores hormonales, los más importantes son: el receptor de estrógenos (RE), el receptor de progesterona (RPg) y el receptor de andrógenos (RA). Los dos primeros se usan en la práctica clínica, tanto para el diagnóstico como para predecir la evolución de la enfermedad (Gradishar 2004). Las pacientes con tumores que expresan el RE, son las candidatas adecuadas para ser tratadas con terapia hormonal, que tiene como objeto bloquear la estimulación ejercida por estrógenos en las células cancerosas.

### Andrógenos y cáncer de mama

Los andrógenos, además de ser las hormonas sexuales masculinas por excelencia, son las hormonas sexuales predominantes en las mujeres después de la menopausia, una etapa de la vida en la que son diagnosticados muchos cánceres de mama. En condiciones normales, en las mujeres postmenopáusicas, los principales andrógenos sintetizados por los ovarios y la glándula suprarrenal son la dehidroepiandrosterona

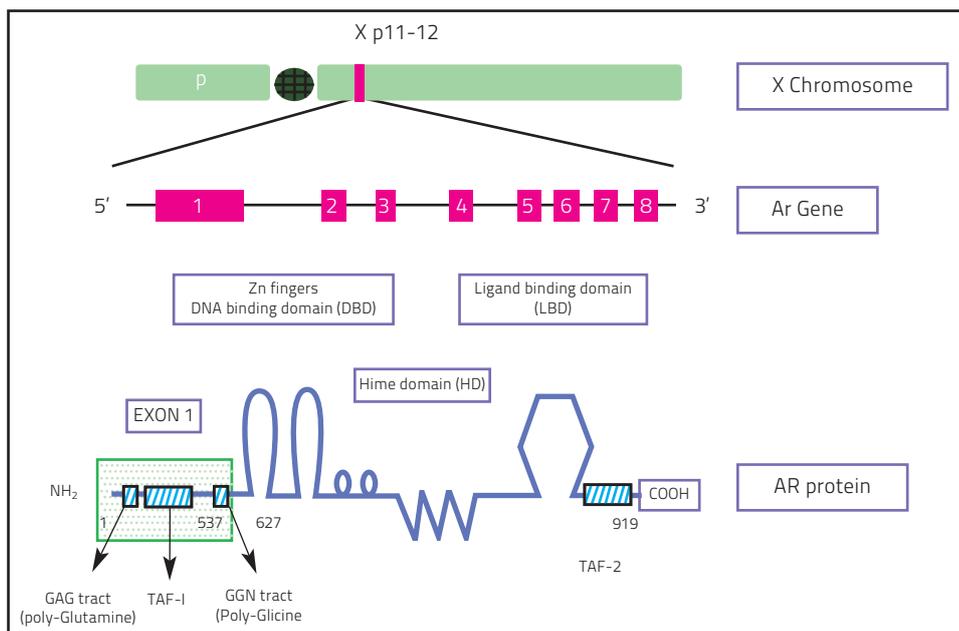
sulfato, la androstenediona y la testosterona (T) (Labrie et al. 2003). Tanto en mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas, se ha descrito que el aumento de los niveles plasmáticos de andrógenos está considerado como un factor de riesgo de padecer cáncer de mama. (Kaaks et al. 2005a; Kaaks et al. 2005b).

En determinados tejidos y órganos, incluido el epitelio mamario, la aromatasa (CYP 19), transforma los andrógenos (T y androstenediona) en estrógenos; (estradiol y estrona), respectivamente (Brodie et al. 1997). A su vez, el estradiol, activa al RE, favoreciendo la actividad mitogénica en las células de mama que son estrógeno dependientes (Hackenberg et al. 1993).

Los andrógenos también pueden actuar directamente sobre las células de CM tras unirse al RA provocando la expresión de genes inducidos por andrógenos en el epitelio mamario (Gao et al. 1996), entre ellos, podemos nombrar al propio receptor de andrógenos, el antígeno prostático específico (PSA). Lo que indica la capacidad de las células de mama para responder a la estimulación directa de los andrógenos (Hall et al. 1998).

### El receptor de andrógenos

EL receptor RA es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares al igual que el RE, RP, el receptor de vitamina D (VDR), etc. Todos funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando. Tras unirse a su ligando específico,



**Figura 3.** Estructura génica y proteica del receptor de andrógenos

dimerizan y se traslocan al núcleo donde interactúan con regiones específicas del ADN estimulando la transcripción génica. La figura 3 muestra la estructura génica y proteica del RA.

### Polimorfismos del RA

El gen del RA, posee dos regiones polimórficas, situadas en el exón 1: un tracto CAG (poliglutamina) con un número variable de repeticiones que oscila entre 16 y 45 y un tracto GGN (poliglicina) con un número variable de repeticiones que oscila entre 14 y 36. Ambos tractos repetidos están en el extremo amino, cerca de la región "transactivadora 1" TAF-1, a la que se unen los coactivadores de la transcripción. La longitud de estas regiones polimórficas puede provocar cambios conformacionales en esta región, por lo que ejerce un efecto modulador en la expresión de genes dependientes de andrógenos.

Hemos visto que mujeres que poseen una combinación alelos largos de los tractos CAG/GGN en el exón 1 del gen del Receptor de

Andrógenos, tienen más riesgo de padecer la enfermedad que aquellas con alelos cortos (Gonzalez et al. 2007).

### Objeto

Poner a punto la metodología necesaria para estudiar la expresión de los miRNAs que tienen como diana al RE y al RA en tumores de mama fijados con formalina e incluidos en parafina. Éstos, junto con la longitud de los tractos polimórficos del RA, podrían modular la respuesta inducida por los andrógenos y estrógenos en las células tumorales mediante regulación post-transcripcional de dichos receptores.

### Material y métodos

#### a) Muestras usadas para la puesta a punto de la metodología

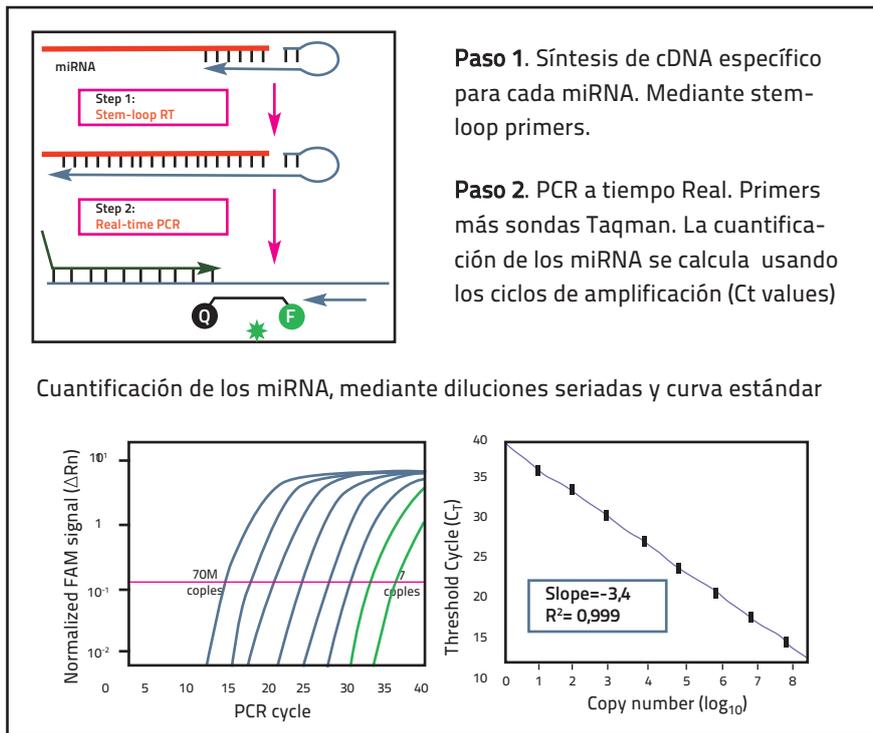
Tejido tumoral de CM: procedentes de once tumores fijados con formalina e incluidos en bloques de parafina (FFPE), suministrados por los hospitales Canarios.

#### b) Extracción de RNA

Tras desparafinar las muestras con Xileno y re-hidratarlas con etanol en concentraciones decrecientes, procedimos con la extracción del RNA. Usamos dos kits comerciales siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Estos fueron: High Pure miRNA isolation Kit (Roche), and RecoverAll Total Nucleic Acid (Ambion).

#### c) Determinación de la cantidad y calidad del RNA total

La concentración y la pureza de las muestras de RNA se determinaron mediante el uso de un espectrofotómetro. La integridad se evaluó mediante inspección visual del tamaño promedio de los fragmentos en pares de bases (pb) en un gel de agarosa al 1%. Hay que destacar que el RNA extraído de muestras parafinadas está altamente degradado siendo imposible visualizar en el gel de agarosa las bandas 28S y 18S correspondientes al RNA ribosómico. (Figura 5).



**Figura 4.** Metodología empleada para la cuantificación de los miRNAs mediante sondas TaqMan y PCR cuantitativa a tiempo real

#### d) PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR)

Todos los experimentos de PCR Cuantitativa a Tiempo Real (qRT-PCR), empleados para determinar la expresión de los miRNAs seleccionados, fueron realizados usando 12 ng de RNA mediante el uso de sondas TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA). (Figura 4).

#### e) Búsqueda y selección en las bases de datos de los miRNA ha estudiar

Cada miRNA tiene un gran número de mRNA dianas, y a su vez cada mRNA puede estar regulado por más de un miRNA (Lewis et al. 2005). Son muchas las bases de datos publicadas en Internet donde podemos encontrar que mRNAs son dianas potenciales de un miRNA, en nuestro caso concreto el receptor de andrógenos y el receptor de estrógenos. La Tabla 1 muestra un listado de las bases de datos más usadas.

**Tabla 1.** Bases de datos de miRNAs humanos y de predicción de dianas

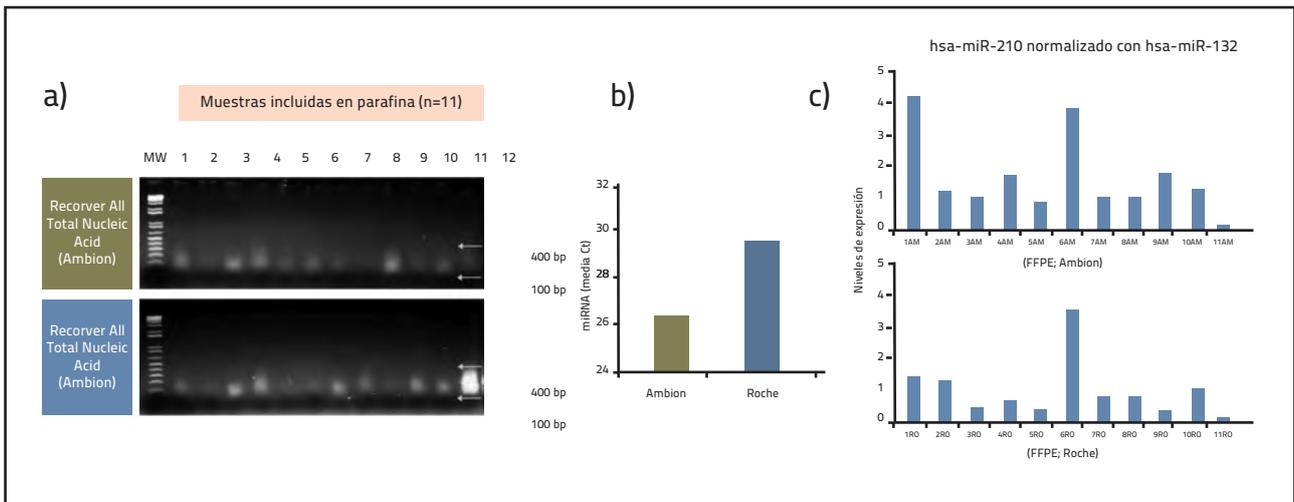
Base de datos	Dirección Web	Características
MIRBASE	<a href="http://mirrna.sanger.ac.uk">http://mirrna.sanger.ac.uk</a>	Secuencias y dianas
TARGETSCAN	<a href="http://www.targescan.org">http://www.targescan.org</a>	Dianas potenciales
TARBASE	<a href="http://www.diana.pcbi.upenn.edu">http://www.diana.pcbi.upenn.edu</a>	Dianas predichas

#### Resultados

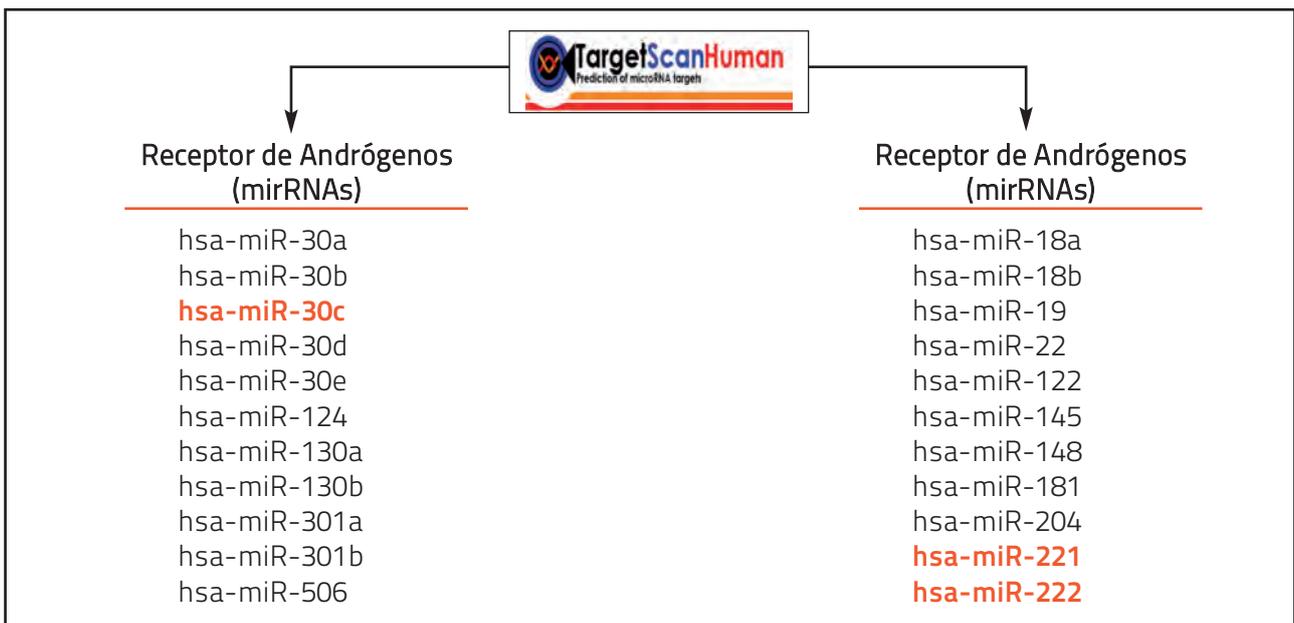
Cuando comparamos la calidad y cantidad del RNA extraído de las 11 muestras tumorales incluidas en parafina, con los kits de Ambion y Roche vemos que en ambos casos el RNA está muy degradado como consecuencia de los tratamientos químicos empleados en la fijación y posterior inclusión en parafina. No son visibles las bandas del RNA ribosómico (indicadoras de la buena calidad del RNA aislado). Utilizando el Kit de Ambión, y tras sintetizar el cDNA de los miRNA estudiados, hsa-miR-210, hsa-miR-132 y el hsa-miR-374 y cuantificarlos mediante qRT-PCR, obtuvimos los mejores resultados tanto en la calidad del RNA extraído como en los datos de cuan-

tificación. (Figura 5). Por esta razón decidimos seleccionar el kit de Ambion (RecoverAll Total Nucleic Acid) para realizar la extracción de RNA y continuar con los experimentos de expresión miRNA en las muestras de cáncer de mama incluidas en parafina.

Debido a que la identificación experimental de dianas de los miRNAs es difícil y cada miRNA puede tener muchos mRNAs diana, el uso de herramientas bioinformáticas se hace indispensable en su estudio. En nuestro caso concreto, la identificación de los miRNAs que tienen como dianas al RA y al RE hemos usado dos de las bases de datos más fiables y con mejores algoritmos predictivos: miRBASE (<http://www.mirbase.org/>) y TargetScan (



**Figura 5.** Muestra los resultados de la estimación de la calidad del RNA extraído en las muestras tumorales incluidas en parafina. A) Análisis en gel de agarosa al 1% del RNA extraído con los kits de Ambion y Roche. El RNA está muy degradado como consecuencia de los tratamientos químicos de la fijación y posterior inclusión en parafina y no son visibles las bandas del RNA ribosómico. B) Comparativa entre los ciclos de amplificación en qRT-PCR del hsa-miR-210 entre ambos kits. El número de Ct's es menor cuando empleamos el kit de Ambion, lo que indica una mayor cantidad y calidad del RNA de partida. C) Muestra los niveles de expresión del hsa-miR-210. El kit de Ambion arroja los mejores resultados



**Figura 5.** Selección de miRNAs mediante el uso de la base de datos TargetScan de aquellos que tienen como dianas al RA y al RE. En rojo se muestran los miRNAs con mayor probabilidad de unirse al RNA mensajero para cada uno de los receptores provocando su degradación y/o bloquear la síntesis de la proteína.

can.org/). La Figura 6 muestra la selección de los miRNAs que tienen como dianas al RA y al RE.

### Discusión

Los archivos de muestras fijadas con formalina y parafinadas (FFPE) son empleados en la práctica clí-

nica por todos los hospitales, siendo una fuente de material biológico para el estudio molecular de los tumores. El RNA total extraído de estas muestras se ha considerado inadecuado para el estudio de los patrones de expresión génica mediante el uso de las técnicas más modernas de biología molecular co-

mo son: la PCR cuantitativa a tiempo real qRT-PCR) o DNA microarrays. Por lo tanto, hay un considerable interés en la comunidad científica por mejorar los protocolos de fijación y extracción de ácidos nucleicos que permitan la aplicación de las mencionadas técnicas en la práctica clínica diaria.

Vimos que el kit de Ambion (RecoverAll Total Nucleic Acid) mostró los mejores resultados, tanto en calidad como en cantidad del RNA extraído. Este hecho se traduce en que podemos cuantificar de una forma precisa y reproducible los niveles de expresión de los miRNAs propuestos en las muestras de cáncer de mama incluidas en parafina.

Tras la extracción y análisis de expresión de los miRNAs seleccionados en este caso el hsa-miR-210, como control positivo, en 11 tumores de mama incluidos en parafina, vimos que la recuperación y análisis de la expresión de los miRNAs es más robusta y precisa que la de los RNA mensajeros. Esto se debe principalmente a que los miRNAs

son moléculas muy pequeñas de 21 pares de bases, lo que los protege de la degradación provocada por la adición de reactivos químicos empleados en los protocolos de fijación.

En vista de los buenos resultados obtenidos en la cuantificación del hsa-miR-210 en el RNA extraído de esas muestras tumorales parafinadas, hemos decidido continuar con la cuantificación de los miRNAs seleccionados expuestos en la Figura 5. Además, y en colaboración con los hospitales canarios, pretendemos ampliar la colección de tumores fijados y continuar con la cuantificación de miRNAs.

**Conclusión:** Especialmente en muestras tumorales fijadas con formol e

incluidas en parafina, la elección del mejor método de extracción de ácidos nucleicos es crucial para el éxito de este tipo de estudios. En nuestro caso hemos decidido elegir el kit de Ambion para realizar todas las extracciones de RNA. La aplicación de estas técnicas de extracción en muestras parafinadas podrían tener una repercusión importante en la práctica clínica. En particular, el análisis de la expresión de miRNAs, pueden ser de utilidad ya que pueden ser empleados como novedosos marcadores pronóstico o predictivos. Repercutiendo en la elección de los tratamientos más efectivos para el tratamiento del cáncer de mama de muestras pacientes.

## Referencias bibliográficas

- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A. E. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." *Cell*, 122(4), 553-63.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." *Cell*, 116(2), 281-97.
- Brodie, A., Lu, Q., and Nakamura, J. (1997). "Aromatase in the normal breast and breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol*, 61(3-6), 281-6.
- Calin, G. A., and Croce, C. M. (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." *Nat Rev Cancer*, 6(11), 857-66.
- Calin, G. A., Sevignani, C., Dumitru, C. D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., and Croce, C. M. (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), 2999-3004.
- Esquela-Kerscher, A., and Slack, F. J. (2006). "Oncomirs - microRNAs with a role in cancer." *Nat Rev Cancer*, 6(4), 259-69.
- Gao, T., Marcelli, M., and McPhaul, M. J. (1996). "Transcriptional activation and transient expression of the human androgen receptor." *J Steroid Biochem Mol Biol*, 59(1), 9-20.
- Gonzalez, A., Javier Dorta, F., Rodriguez, G., Brito, B., Rodriguez, M. A., Cabrera, A., Diaz-Chico, J. C., Reyes, R., Aguirre-Jaime, A., and Nicolas Diaz-Chico, B. (2007). "Increased risk of breast cancer in women bearing a combination of large CAG and GGN repeats in the exon 1 of the androgen receptor gene." *Eur J Cancer*, 43(16), 2373-80.
- Gradishar, W. J. (2004). "Tamoxifen-what next?" *Oncologist*, 9(4), 378-84.
- Grishok, A., Pasquinelli, A. E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D. L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C. C. (2001). "Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing." *Cell*, 106(1), 23-34.
- Hackenberg, R., Turgetto, I., Filmer, A., and Schulz, K. D. (1993). "Estrogen and androgen receptor mediated stimulation and inhibition of proliferation by androst-5-ene-3 beta,17 beta-diol in human mammary cancer cells." *J Steroid Biochem Mol Biol*, 46(5), 597-603.
- Hall, R. E., Clements, J. A., Birrell, S. N., and Tilley, W. D. (1998). "Prostate-specific antigen and gross cystic disease fluid protein-15 are co-expressed in androgen receptor-positive breast tumours." *Br J Cancer*, 78(3), 360-5.
- Kaaks, R., Berrino, F., Key, T., Rinaldi, S., Dossus, L., Biessy, C., Secreto, G., Amiano, P., Bingham, S., Boeing, H., Bueno de Mesquita, H. B., Chang-Claude, J., Clavel-Chapelon, F., Fournier, A., van Gils, C. H., Gonzalez, C. A., Gurrea, A. B., Critselis, E., Khaw, K. T., Krogh, V., Lahmann, P. H., Nagel, G., Olsen, A., Onland-Moret, N. C., Overvad, K., Palli, D., Panico, S., Peeters, P., Quiros, J. R., Roddam, A., Thiebaut, A., Tjonneland,

## Agradecimientos

Quiero mostrar mi más sincero agradecimiento a los Doctores John W. Martens, John Foekens y Anieta M. Sieuwerts, científicos del Departamento de Oncología Médica del Instituto Josephine Nefkens de Rotterdam por su inestimable participación en este trabajo.

- A., Chirlaque, M. D., Trichopoulou, A., Trichopoulos, D., Tumino, R., Vineis, P., Norat, T., Ferrari, P., Slimani, N., and Riboli, E. (2005a). "Serum sex steroids in premenopausal women and breast cancer risk within the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)." *J Natl Cancer Inst*, 97(10), 755-65.
- Kaaks, R., Rinaldi, S., Key, T. J., Berrino, F., Peeters, P. H., Biessy, C., Dossus, L., Lukanova, A., Bingham, S., Khaw, K. T., Allen, N. E., Bueno-de-Mesquita, H. B., van Gils, C. H., Grobbee, D., Boeing, H., Lahmann, P. H., Nagel, G., Chang-Claude, J., Clavel-Chapelon, F., Fournier, A., Thiebaut, A., Gonzalez, C. A., Quiros, J. R., Tormo, M. J., Ardanaz, E., Amiano, P., Krogh, V., Palli, D., Panico, S., Tumino, R., Vineis, P., Trichopoulou, A., Kalapothaki, V., Trichopoulos, D., Ferrari, P., Norat, T., Saracci, R., and Riboli, E. (2005b). "Postmenopausal serum androgens, oestrogens and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition." *Endocr Relat Cancer*, 12(4), 1071-82.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S. D. (2003). "Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias." *Cell*, 115(2), 209-16.
- Labrie, F., Luu-The, V., Labrie, C., Belanger, A., Simard, J., Lin, S. X., and Pelletier, G. (2003). "Endocrine and intracrine sources of androgens in women: inhibition of breast cancer and other roles of androgens and their precursor dehydroepiandrosterone." *Endocr Rev*, 24(2), 152-82.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., and Ambros, V. (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." *Cell*, 75(5), 843-54.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., and Kim, V. N. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." *Nature*, 425(6956), 415-9.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K. H., Lee, S., Baek, S. H., and Kim, V. N. (2004). "MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II." *Embo J*, 23(20), 4051-60.
- Lewis, B. P., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2005). "Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets." *Cell*, 120(1), 15-20.
- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Sweet-Cordero, A., Ebert, B. L., Mak, R. H., Ferrando, A. A., Downing, J. R., Jacks, T., Horvitz, H. R., and Golub, T. R. (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." *Nature*, 435(7043), 834-8.
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J. E., and Kutay, U. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." *Science*, 303(5654), 95-8.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., and Bradley, A. (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." *Genome Res*, 14(10A), 1902-10.
- Schwarz, D. S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P. D. (2003). "Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex." *Cell*, 115(2), 199-208.
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., and Diederichs, S. (2009). "Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation." *Nat Cell Biol*, 11(3), 228-34.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G., and Cullen, B. R. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." *Genes Dev*, 17(24), 3011-6.
- Zeng, Y. (2006). "Principles of micro-RNA production and maturation." *Oncogene*, 25(46), 6156-62.

## Reseña curricular

**Francisco Germán Rodríguez González.** Doctorado Europeo por la ULPGC (2009); Diploma de estudios avanzados por la ULPGC; Máster en Oncología Molecular por la ULPGC; Licenciado en Biología por la ULL, Estancia predoctoral en el Dept. of Medical Oncology, Josephine Nefkens Institute; Erasmus Medical Center de Rotterdam; es autor de más de 10 artículos científicos publicados en revistas internacionales con índice de impacto; ha participado en más de 30 congresos locales, nacionales e internacionales y en 6 proyectos de investigación. E-mail: grodriguez@becarios.ulpgc.es

**Bonifacio Nicolás Díaz Chico.** Catedrático de Fisiología de la ULPGC; Estancia post-doctoral en la University of Texas Health Science Center in San Antonio, Texas. Autor de 66 artículos científicos publicados en revistas internacionales con índice de impacto, ha participado en más de 80 congresos locales, nacionales e internacionales y en más de 10 proyectos de investigación. E-mail: bdiaz@dbbf.ulpgc.es