

Nuevos métodos de diagnóstico molecular

LA PROTEÓMICA COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO: APLICACIÓN EN EL HEPATOCARCINOMA GENÓMICA pág. 155 EPIGENÓMICA pág. 165
pág. 172

Puntos clave

La transcriptómica es el estudio de los perfiles de expresión génica; evaluación simultánea de los niveles de expresión de múltiples genes en un tejido determinado en un momento concreto.

Los microARN son moléculas de ARN pequeñas no codificantes que regulan la expresión de muchos genes, la cual se encuentra alterada en multitud de patologías, siendo potenciales biomarcadores.

Las técnicas de detección de microARN son adaptaciones de las mismas que se utilizan para la detección de mRNA: RT-qPCR, *microarrays* y, recientemente, secuenciación de nueva generación.

Los perfiles de expresión tanto de mRNA como de microARN ayudan a distinguir entre diferentes tipos de tejido, diferentes estados patológicos, y a predecir el pronóstico y la respuesta al tratamiento.

Transcriptómica (mARN y miR)

MERITXELL GIRONELLA COS

Grupo de Oncología Gastrointestinal y Pancreática. CIBERehd. Hospital Clínic. Barcelona. España.

Los últimos avances científicos y tecnológicos conducen inexorablemente a un nuevo concepto de la Medicina, en el que el diagnóstico molecular desempeñará un papel central. En este contexto, el desarrollo de la transcriptómica, junto con la bioinformática, ha supuesto un impulso determinante en la investigación, que ya está teniendo importantes consecuencias clínicas en cuanto al diagnóstico, el pronóstico y el tratamiento de los pacientes.

Análisis del transcriptoma

El transcriptoma es el conjunto de moléculas de ARN mensajero (mARN) y de ARN no codificante presente en una célula o tejido concreto. El estudio del transcriptoma en diferentes contextos se lleva a cabo desde hace décadas y se ha ido adaptando y mejorando en función de los avances tecnológicos. Inicialmente se usaban técnicas de bajo rendimiento, como Northern-blot, hibridación *in situ* y la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción inversa (RT-PCR), que sólo permiten el análisis cualitativo o semicuantitativo de un gen candidato por análisis. Posteriormente, el desarrollo de la técnica cuantitativa RT-qPCR mejoró en muchos aspectos la metodología y aumentó el rendimiento; varios transcritos podían ser analizados al mismo tiempo, aunque esto todavía estaba lejos de una cobertura a gran escala de todo el transcriptoma.

No fue hasta la aparición de los *microarrays* que se logró la caracterización de niveles de expresión de miles de transcritos simultáneamente. Este método consiste en la retrotranscripción del ARN a cADN combinándolo con un marcaje fluorescente y la posterior hibridación a un chip que contiene múltiples sondas de cADN

correspondientes a los genes de interés. Gracias a este avance, en la última década, han surgido multitud de iniciativas con el objetivo de caracterizar perfiles de expresión en diferentes situaciones patológicas mediante la tecnología *microarray* y dirigidos a distintas finalidades: a) el diagnóstico molecular de las enfermedades; b) la clasificación molecular de las mismas (estratificación); c) búsqueda de nuevas dianas; d) pronóstico, y e) predicción de la respuesta terapéutica.

Aun más recientemente, la aparición de una nueva tecnología llamada secuenciación de nueva generación (NGS) está revolucionando el mundo de la investigación y en breve lo hará sobre sus aplicaciones clínicas en el diagnóstico molecular. La primera aplicación de esta tecnología es la secuenciación del ADN, pero gracias a su gran versatilidad es posible también la secuenciación masiva de todas las moléculas de ARN presentes en una muestra y, por tanto, del transcriptoma completo, mediante la llamada ARN-Seq. Con esta tecnología es posible cuantificar de manera absoluta el total de moléculas de ARN con alta resolución y reproducibilidad. A pesar de que la aplicación de esta tecnología para el análisis del transcriptoma está todavía en sus inicios, ya muestra algunas ventajas sobre la tecnología de los *microarrays*. En los próximos años viviremos la traslación de la NGS al diagnóstico clínico. Aunque todavía queda mucho trabajo por hacer antes de que esto suceda, hay que tener en cuenta que las potenciales aplicaciones son numerosas y prometedoras.

Perfiles de expresión de mRNA

La mayoría de estudios donde se han analizado los perfiles de expresión génica mediante *microarrays* en los últimos años ha sido en el

ámbito de la Oncología, con el fin de identificar marcadores específicos de cada tipo de tumor¹, aunque de una manera creciente también se está aplicando a otras áreas. En la tabla 1 se muestra una selección de estudios en los que se evalúan los perfiles de expresión génica y de microARN en diferentes patologías hepáticas y digestivas²⁻³⁹. En el contexto del cáncer colorrectal, los primeros perfiles de expresión génica fueron publicados por Wang et al en 2004², y los resultados fueron posteriormente validados³. Actualmente existen diversas iniciativas dirigidas a reevaluar estos estudios a partir de muestras de tejido parafinado⁴. Respecto al cáncer de páncreas, también se han llevado a cabo diferentes estudios utilizando *microarrays*⁹. Recientemente, se ha publicado un estudio en el que se analiza el transcriptoma de la saliva de pacientes con cáncer de páncreas resecable con el objetivo de encontrar biomarcadores para un diagnóstico precoz¹⁰.

En relación con otras enfermedades digestivas no oncológicas, también se han realizado análisis de esta índole. Así pues, ya en el año 2000 se publicó un estudio con pacientes con colitis ulcerosa¹³. Posteriormente, se compararon los perfiles en la colitis ulcerosa y en la enfermedad de Crohn, confirmando que se trata de dos entidades distintas desde un punto de vista molecular¹⁴. Más tarde, se vio la posibilidad de usar biopsias endoscópicas, lo cual permitió incluir un mayor tipo de pacientes^{15,16,40-43}. Por otro lado, en el esófago de Barrett también se han realizado estudios transcriptómicos¹⁸⁻²⁰.

En el contexto de las enfermedades hepáticas

causadas por el virus de la hepatitis C (VHC), se han llevado a cabo diversos estudios a partir de biopsias hepáticas con el fin de investigar la respuesta del huésped a la infección por el VHC^{22-25,44} y su relación con diferentes enfermedades incluyendo fibrosis²⁶, cirrosis y hepatocarcinoma²⁷, así como la respuesta al tratamiento con interferón (IFN)²⁸⁻³⁰. Por otro lado, en relación con el trasplante hepático, se ha publicado un estudio en el que se analiza el perfil transcriptómico en sangre periférica de pacientes trasplantados con el fin de desarrollar una prueba diagnóstica que permita identificar aquellos enfermos sin riesgo de rechazo⁴⁵. Por último, otros estudios han evaluado los perfiles de expresión en el hepatocarcinoma³³⁻³⁶. Recientemente, se ha mostrado la factibilidad de usar muestras de tejido hepático parafinado³⁷.

A pesar del gran potencial de la tecnología *microarray*, cabe comentar que existen notables discrepancias en los resultados obtenidos en los distintos estudios publicados, posiblemente debido a la heterogeneidad metodológica y al bajo poder estadístico de algunos de ellos. Este tipo de metodología no permite realizar meta-análisis debido a la variabilidad de protocolos experimentales utilizados, ya que conllevaría un elevado número de falsos positivos y negativos. A partir de ahora, los esfuerzos deben ir dirigidos a realizar este tipo de estudios en series más amplias de pacientes e incluyendo siempre una serie de validación distinta a la serie inicialmente utilizada, para poder obtener perfiles de expresión robustos y reproducibles.

Tabla 1. Selección de artículos para la revisión de los perfiles de expresión génica y de microARN en diferentes patologías hepáticas y digestivas

Enfermedad hepática o digestiva	Perfiles de expresión mARN	Perfiles de expresión de microARN
Cáncer colorrectal	Wang et al ² ; Jiang et al ³ ; Gray et al ⁴	Schetter et al ⁵ ; Slaby et al ⁶
Cáncer gástrico	Yasui et al ⁷	Ueda et al ⁸
Cáncer pancreático	Streit et al ⁹ ; Zhang et al ¹⁰	Bloomston et al ¹¹ ; Rachagani et al ¹²
Enfermedad inflamatoria intestinal	Dieckgraefe et al ¹³ ; Lawrance et al ¹⁴ ; Wu et al ¹⁵ ; Noble et al ¹⁶	Wu et al ¹⁷
Esófago de Barrett	Wang et al ¹⁸ ; El-Serag et al ¹⁹ ; van Baal et al ²⁰	Wijnhoven et al ²¹
Infección por el virus de la hepatitis C	Smith et al ²² ; Bièche et al ²³ ; Shao et al ²⁴ ; Lau et al ²⁵ ; Smith et al ²⁶ ; de Giorgi et al ²⁷ ; Chen et al ²⁸ ; Feld et al ²⁹ ; Chen et al ³⁰	Ura et al ³¹ ; Bala et al ³²
Hepatocarcinoma	Wang et al ³³ ; Tan et al ³⁴ ; Liu et al ³⁵ ; Hui et al ³⁶ ; Hoshida et al ³⁷	Sarasin-Filipowicz et al ³⁸ ; Ji et al ³⁹ ; Bala et al ³²

Lectura rápida



El transcriptoma es el conjunto de moléculas de ARN mensajero (mARN) y de ARN no-codificante presentes en una célula o tejido concreto.

La transcriptómica es el estudio del transcriptoma de una célula o de un tejido en una situación concreta, basándose en el análisis de sus perfiles de expresión génica.

El *microarray* es un método de alto rendimiento para el análisis de los perfiles de expresión génica que permite la caracterización de miles de transcritos simultáneamente. Consiste en la hibridación del ARN, transformado a cADN fluorescente, a un chip que contiene múltiples sondas de cADN correspondientes a los genes de interés; la intensidad de la fluorescencia es proporcional a los niveles de expresión del correspondiente transcrito.

La secuenciación de nueva generación (NGS) es una nueva tecnología que permite cuantificar de manera absoluta y reproducible la cantidad de mARN o miR presente en una muestra. Esta tecnología va a suplantar la tecnología *microarray* en los próximos años y va a ser básica para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico molecular.



Lectura rápida



Hasta el momento, la mayoría de estudios de los perfiles de expresión génica se ha realizado mediante *microarrays* y, de forma mucho más reciente, mediante NGS.

Los estudios sobre perfiles de expresión pueden dividirse en 5 grupos en función de su finalidad:
a) diagnóstico molecular;
b) clasificación molecular (estratificación);
c) búsqueda de nuevas dianas moleculares;
d) pronóstico,
y e) predicción de la respuesta al tratamiento.

La mayoría de estudios donde se han analizado los perfiles de expresión en los últimos años ha sido en el ámbito de la Oncología, con el fin de identificar marcadores específicos de cada tipo de tumor.

Los microARN (miARN o miR) son moléculas pequeñas de ARN no-codificante que regulan la expresión de los mARN diana a través de su degradación o inhibición de la traducción.

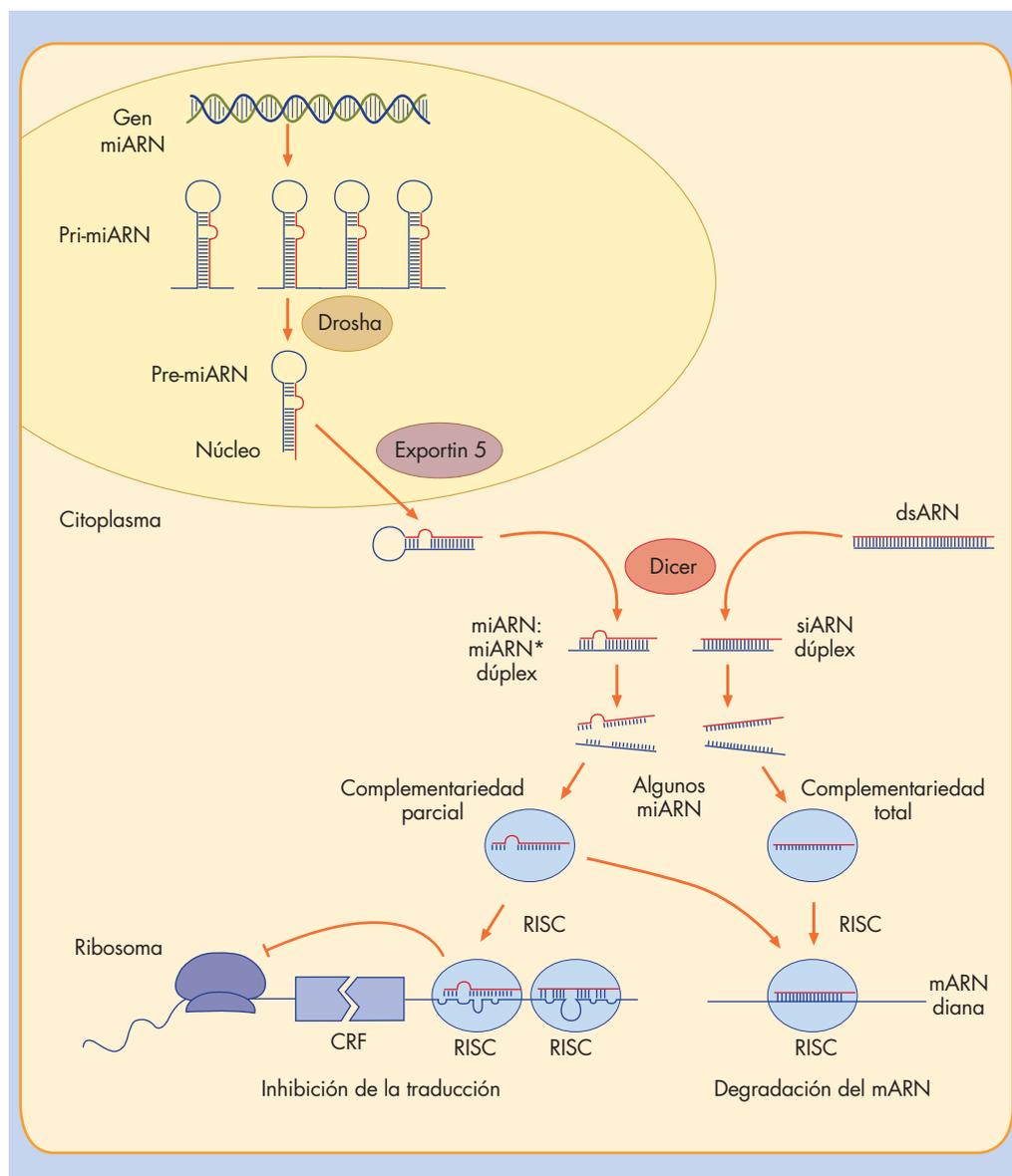


Figura 1. Biogénesis, procesamiento y maduración de los microARN (miARN). Los miARN son transcritos a partir de su correspondiente gen en forma de transcritos primarios largos llamados pri-miARN y procesados en el núcleo por la enzima Drosha a unas formas precursoras de 70 nucleótidos llamadas pre-miARN. Éstas son exportadas al citoplasma por la exportina 5, donde la RNasa Dicer genera dúplex de doble cadena de 22 nucleótidos aproximadamente, llamados miARN:miARN*. Las doble cadenas se separan y el miARN maduro se incorpora al complejo RISC, donde se unirá al 3'UTR del mARN diana provocando su degradación (si la complementariedad es parcial) o la inhibición de su traducción (si la complementariedad es total).

MicroARN: nuevos reguladores de la expresión génica

Los microARN (miARN o miR) son moléculas pequeñas de ARN no-codificante que se unen por complementariedad al extremo 3'UTR de los mARN diana, siendo capaces de regular su expresión a través de la degradación o inhibición de la traducción (fig. 1). Participan

en procesos biológicos fundamentales y se están viendo implicados en multitud de procesos patológicos. Hay evidencias crecientes de que su expresión está alterada en diferentes estados patológicos; de hecho, los perfiles de miR parecen ser incluso más ricos en información patológica que los perfiles de mARN. Así, los miR son prometedores biomarcadores para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción de la respuesta al tratamiento.

Las técnicas de detección de miR se han ido adaptando a partir de las originalmente desarro-

lladas para la detección de mARN y, como éstas, también han ido evolucionando en función de los avances tecnológicos. Actualmente, las técnicas más utilizadas son la RT-qPCR cuantitativa y los *microarrays*. Recientemente, la aparición de la potente tecnología NGS está revolucionando también la investigación en miR, gracias a su capacidad de cuantificar de manera absoluta todas las secuencias ARN cortas presentes en una muestra y, por tanto, permitir también el descubrimiento de nuevos miR. Hasta el momento, existen muy pocos estudios traslacionales que hayan utilizado esta nueva tecnología en muestras humanas.

Perfiles de expresión de microARN

Desde la demostración por Volinia et al en 2006⁴⁶, que los perfiles de expresión de miR podrían distinguir entre diferentes tipos de tumores, están apareciendo numerosos estudios en los que se analiza el perfil de expresión de miR en distintas enfermedades. Así pues, Bloomston et al¹¹ compararon los perfiles de miR a partir de tejido pancreático normal, pancreatitis crónica y cáncer de páncreas. El potencial valor pronóstico y predictivo de los miR fue también demostrado por Schetter et al⁵, en un estudio en el que compararon los patrones de miR en el cáncer colorrectal y el tejido normal adyacente. Siguiendo en esta línea, muy recientemente se ha publicado la asociación entre un grupo de miR y el pronóstico del cáncer gástrico⁸. Por otra parte, se acaban de publicar los perfiles de expresión de miR en diferentes estadios patológicos del epitelio esofágico²¹. Existen pocos estudios dirigidos a establecer el patrón de miR en la enfermedad inflamatoria intestinal, aunque cabe destacar uno en el que se analiza la expresión de miR en distintos tipos de inflamación intestinal¹⁷. En el contexto de las enfermedades hepáticas, varios estudios han analizado la expresión de miR ya sea para su clasificación molecular o para encontrar biomarcadores pronósticos³¹ o predictivos de la respuesta al tratamiento^{38,39}.

Por otro lado, la mayoría de estos estudios publicados hasta la fecha ha sido realizado a partir de muestras de tejido fresco o parafinado. El reciente hallazgo de que los miR están presentes en los fluidos corporales los convierte en potenciales biomarcadores para el diagnóstico precoz no invasivo de muchas enfermedades⁴⁷. Ya se han analizado miR circulantes en pacientes con cáncer colorrectal^{48,49} y cáncer gástrico⁵⁰, aunque todavía ninguno de ellos los analiza de manera exhaustiva mediante *microarrays*.

Bibliografía



● Importante ●● Muy importante

- Ramaswamy S, Tamayo P, Rifkin R, Mukherjee S, Yeang CH, Angelo M, et al. Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98:15149-54.
- Wang Y, Jatkoe T, Zhang Y, Mutch MG, Talantov D, Jiang J, et al. Gene expression profiles and molecular markers to predict recurrence of Dukes' B colon cancer. *J Clin Oncol*. 2004;22:1564-71.
- Jiang Y, Casey G, Lavery IC, Zhang Y, Talantov D, Martin-McGreevy M, et al. Development of a clinically feasible molecular assay to predict recurrence of stage II colon cancer. *J Mol Diagn*. 2008;10:346-54.
- Gray R, Barnwell J, McConkey C, Hills RK, Williams NS, Kerr DJ. Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*. 2007;370:2020-9.
- Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, et al. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*. 2008;299:425-36.
- Slaby O, Svoboda M, Michalek J, Vyzula R. MicroRNAs in colorectal cancer: translation of molecular biology into clinical application. *Mol Cancer*. 2009;8:102.
- Yasui W, Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Motoshita J. Transcriptome dissection of gastric cancer: identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens. *Pathol Int*. 2009;59:121-36.
- Ueda T, Volinia S, Okumura H, Shimizu M, Taccioli C, Rossi S, et al. Relation between microRNA expression and progression and prognosis of gastric cancer: a microRNA expression analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11:136-46.
- Streit S, Michalski CW, Erkan M, Friess H, Kleeff J. Confirmation of DNA microarray-derived differentially expressed genes in pancreatic cancer using quantitative RT-PCR. *Pancreatol*. 2009;9:577-82.
- Zhang L, Farrell JJ, Zhou H, Elashoff D, Akin D, Park NH, et al. Salivary transcriptomic biomarkers for detection of resectable pancreatic cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:949-57.e1-7.
- Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, et al. MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA*. 2007;297:1901-8.
- Rachagani S, Kumar S, Batra SK. MicroRNA in pancreatic cancer: pathological, diagnostic and therapeutic implications. *Cancer Lett*. 2010;292:8-16.
- Dieckgraefe BK, Stenson WF, Korzenik JR, Swanson PE, Harrington CA. Analysis of mucosal gene expression in inflammatory bowel disease by parallel oligonucleotide arrays. *Physiol Genomics*. 2000;4:1-11.
- Lawrance IC, Fiocchi C, Chakravarti S. Ulcerative colitis and Crohn's disease: distinctive gene expression profiles and novel susceptibility candidate genes. *Hum Mol Genet*. 2001;10:445-56.
- Wu F, Dassopoulos T, Cope L, Maitra A, Brant SR, Harris ML, et al. Genome-wide gene expression differences in Crohn's disease and ulcerative colitis from endoscopic pinch biopsies: insights into distinctive pathogenesis. *Inflamm Bowel Dis*. 2007;13:807-21.
- Noble CL, Abbas AR, Cornelius J, Lees CW, Ho GT, Toy K, et al. Regional variation in gene expression in the healthy colon is dysregulated in ulcerative colitis. *Gut*. 2008;57:1398-405.
- Wu F, Zikusoka M, Trindade A, Dassopoulos T, Harris ML, Bayless TM, et al. MicroRNAs are differentially expressed in ulcerative colitis and alter expression of macrophage inflammatory peptide-2 alpha. *Gastroenterology*. 2008;135:1624-35.e24.
- Wang J, Qin R, Ma Y, Wu H, Peters H, Tyska M, et al. Differential gene expression in normal esophagus and Barrett's esophagus. *J Gastroenterol*. 2009;44:897-911.
- El-Serag HB, Nurgalieva ZZ, Mistretta TA, Finegold MJ, Souza R, Hilsenbeck S, et al. Gene expression in Barrett's esophagus: laser capture versus whole tissue. *Scand J Gastroenterol*. 2009;44:787-95.
- Van Baal JW, Krishnadath KK. High throughput techniques for characterizing the expression profile of Barrett's esophagus. *Dis Esophagus*. 2008;21:634-40.
- Wijnhoven BP, Hussey DJ, Watson DI, Tsykin A, Smith CM, Michael MZ; South Australian Oesophageal Research Group.

Lectura rápida



La expresión de los miR se encuentra alterada en diferentes estados patológicos y, por tanto, son prometedores biomarcadores para el diagnóstico, el pronóstico y la predicción de la respuesta a tratamientos.

Las técnicas de detección de miR son adaptaciones de las mismas que se utilizan para la detección de mARN, RT-qPCR, *microarrays* y, recientemente, NGS.

Los perfiles de expresión de miR pueden distinguir entre diferentes tipos de tumores, entre tejido sano y tejido enfermo, y entre diferentes estadios de una misma enfermedad.

Los patrones de expresión de miR tienen valor diagnóstico, pronóstico y predictivo de la respuesta al tratamiento en diferentes enfermedades hepáticas y digestivas.

Además de en los tejidos, los miR están presentes también en los fluidos corporales, lo que los convierte en potenciales biomarcadores para el diagnóstico no invasivo de muchas enfermedades.



Bibliografía recomendada

Esquela-Kerscher A, Slack FJ. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. Nat Rev Cancer. 2006;6:259-69.

En esta revisión se explica qué son los microARN, cuál es su biogénesis y cuáles son sus funciones. El artículo está focalizado en el papel de estas moléculas en el cáncer por ser el tipo de enfermedad donde más se han estudiado, pero todos los conocimientos que de aquí se extraigan pueden ser aplicados a las otras patologías.

Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2009;10:135-51.

Esta revisión explica cómo la nueva tecnología de secuenciación de nueva generación está revolucionando el mundo de la transcriptómica, haciendo hincapié en los principios básicos de esta tecnología y sus aplicaciones sobre el análisis del transcriptoma.

Visone R, Petrocca F, Croce CM. Micro-RNAs in gastrointestinal and liver disease. Gastroenterology. 2008;135:1866-9.

En este artículo se hace hincapié en la importancia de los microARN en las enfermedades gastrointestinales y hepáticas, haciendo una revisión de los estudios más importantes donde se analizan los perfiles de expresión de miR en estas enfermedades, así como aquellos en los que se investiga su posible función.

- MicroRNA profiling of Barrett's oesophagus and oesophageal adenocarcinoma. *Br J Surg.* 2010;97:853-61.
22. Smith MW, Yue ZN, Korth MJ, Do HA, Boix L, Fausto N, et al. Hepatitis C virus and liver disease: global transcriptional profiling and identification of potential markers. *Hepatology.* 2003;38:1458-67.
 23. Bièche I, Asselah T, Laurendeau I, Vidaud D, Degot C, Paradis V, et al. Molecular profiling of early stage liver fibrosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. *Virology.* 2005;332:130-44.
 24. Shao RX, Hoshida Y, Otsuka M, Kato N, Tateishi R, Teratani T, et al. Hepatic gene expression profiles associated with fibrosis progression and hepatocarcinogenesis in hepatitis C patients. *World J Gastroenterol.* 2005;11:1995-9.
 25. Lau DT, Luxon BA, Xiao SY, Beard MR, Lemon SM. Intrahepatic gene expression profiles and alpha-smooth muscle actin patterns in hepatitis C virus induced fibrosis. *Hepatology.* 2005;42:273-81.
 26. Smith MW, Walters KA, Korth MJ, Fitzgibbon M, Proll S, Thompson JC, et al. Gene expression patterns that correlate with hepatitis C and early progression to fibrosis in liver transplant recipients. *Gastroenterology.* 2006;130:179-87.
 27. De Giorgi V, Monaco A, Worchech A, Tornesello M, Izzo F, Buonaguro L, et al. Gene profiling, biomarkers and pathways characterizing HCV-related hepatocellular carcinoma. *J Transl Med.* 2009;7:85.
 28. Chen L, Borozan I, Feld J, Sun J, Tannis LL, Coltescu C, et al. Hepatic gene expression discriminates responders and non-responders in treatment of chronic hepatitis C viral infection. *Gastroenterology.* 2005;128:1437-44.
 29. Feld JJ, Nanda S, Huang Y, Chen W, Cam M, Pusek SN, et al. Hepatic gene expression during treatment with peginterferon and ribavirin: identifying molecular pathways for treatment response. *Hepatology.* 2007;46:1548-63.
 30. Chen L, Borozan I, Sun J, Guindi M, Fischer S, Feld J, et al. Cell-type specific gene expression signature in liver underlies response to interferon therapy in chronic hepatitis C infection. *Gastroenterology.* 2010;138:1123-33.e1-3.
 31. Ura S, Honda M, Yamashita T, Ueda T, Takatori H, Nishino R, et al. Differential microRNA expression between hepatitis B and hepatitis C leading disease progression to hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2009;49:1098-112.
 32. Bala S, Marcos M, Szabo G. Emerging role of microRNAs in liver diseases. *World J Gastroenterol.* 2009;15:5633-40.
 33. Wang SM, Ooi LL, Hui KM. Identification and validation of a novel gene signature associated with the recurrence of human hepatocellular carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2007;13:6275-83.
 34. Tan MG, Ooi LL, Aw SE, Hui KM. Cloning and identification of hepatocellular carcinoma down-regulated mitochondrial carrier protein, a novel liver-specific uncoupling protein. *J Biol Chem.* 2004;279:45235-44.
 35. Liu BH, Goh CH, Ooi LL, Hui KM. Identification of unique and common low abundance tumour-specific transcripts by suppression subtractive hybridization and oligonucleotide probe array analysis. *Oncogene.* 2008;27:4128-36.
 36. Hui KM. Current approaches in the transcriptional-guided gene therapy of human hepatocellular carcinoma. *Curr Opin Mol Ther.* 2007;9:378-84.
 37. ●● Hoshida Y, Villanueva A, Kobayashi M, Peix J, Chiang DY, Camargo A, et al. Gene expression in fixed tissues and outcome in hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2008;359:1995-2004.
 38. Sarasin-Filipowicz M, Krol J, Markiewicz I, Heim MH, Filipowicz W. Decreased levels of microRNA miR-122 in individuals with hepatitis C responding poorly to interferon therapy. *Nat Med.* 2009;15:31-3.
 39. Ji J, Shi J, Budhu A, Yu Z, Forgues M, Roessler S, et al. MicroRNA expression, survival, and response to interferon in liver cancer. *N Engl J Med.* 2009;361:1437-47.
 40. Langmann T, Moehle C, Maurer R, Scharl M, Liebisch G, Zahn A, et al. Loss of detoxification in inflammatory bowel disease: dysregulation of pregnane X receptor target genes. *Gastroenterology.* 2004;127:26-40.
 41. Costello CM, Mah N, Häslar R, Rosenstiel P, Waetzig GH, Hahn A, et al. Dissection of the inflammatory bowel disease transcriptome using genome-wide cDNA microarrays. *PLoS Med.* 2005;2:e199.
 42. Okahara S, Arimura Y, Yabana T, Kobayashi K, Gotoh A, Motoya S, et al. Inflammatory gene signature in ulcerative colitis with cDNA microarray analysis. *Aliment Pharmacol Ther.* 2005;21:1091-7.
 43. Csillag C, Nielsen OH, Borup R, Olsen J, Bjerrum JT, Nielsen FC. CARD15 status and familial predisposition for Crohn's disease and colonic gene expression. *Dig Dis Sci.* 2007;52:1783-9.
 44. Asselah T, Bièche I, Laurendeau I, Paradis V, Vidaud D, Degott C, et al. Liver gene expression signature of mild fibrosis in patients with chronic hepatitis C. *Gastroenterology.* 2005;129:2064-75.
 45. Martínez-Llordella M, Lozano JJ, Puig-Pey I, Orlando G, Tison G, Lerut J, et al. Using transcriptional profiling to develop a diagnostic test of operational tolerance in liver transplant recipients. *J Clin Invest.* 2008;118:2845-57.
 46. ● Volinia S, Calin GA, Liu CG, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:2257-61.
 47. ● Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, et al. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105:10513-8.
 48. Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, et al. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut.* 2009;58:1375-81.
 49. Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer.* 2010;127:118-26.
 50. Tsuchiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, et al. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer.* 2010;102:1174-9.