

## IN DEPTH REVIEW

# I microRNA nelle principali patologie renali: una nuova frontiera per il nefrologo



Mariagrazia Granata<sup>1</sup>, Lorenzo Malatino<sup>2</sup>, Luca Zanolli<sup>3</sup>, Pasquale Fatuzzo<sup>3</sup>, Antonio Granata<sup>4</sup>

(1) Dip. di Scienze Biomediche e Biotecnologiche, Univ. di Catania, Catania, Italia

(2) Clinica Medica, Dipartimento di Medicina Clinica e Sperimentale, Università di Catania, Italia

(3) Dip. di Medicina Interna, Scuola di Specializzazione in Nefrologia, AOU "Policlinico-Vittorio Emanuele", Catania, Italia

(4) UOC Nefrologia e Dialisi, P.O. "San Giovanni di Dio", Agrigento, Italia

Corrispondenza a: Antonio Granata; UOC Nefrologia e Dialisi, P.O. "San Giovanni di Dio", Agrigento, Italia.; Tel: +39 0922442292; Fax: +39 0922442238 ; E-mail: [antonio.granata4@tin.it](mailto:antonio.granata4@tin.it)

## Abstract

I microRNA sono piccole molecole endogene di RNA non codificante che svolgono un ruolo chiave nell'omeostasi e nell'insorgenza di numerose patologie in diversi organi. Di particolare interesse sono gli studi che, condotti su diverse nefropatie, hanno permesso di identificare i miRNA differenzialmente espressi nei soggetti affetti rispetto ai sani. Uno degli obiettivi finali di questi studi è quello di fornire al nefrologo la possibilità di effettuare diagnosi non più soltanto su biopsie solide ma anche su biopsie liquide avvalendosi quindi di metodiche meno invasive per il paziente. La presente *review* si propone l'obiettivo di puntualizzare la funzione dei miRNA nella fisiologia e nella patologia renale umana e di analizzare il potenziale ruolo che, nel prossimo futuro, essi possono avere nella diagnosi e nella terapia delle nefropatie sia acute che croniche.

Parole chiave: Glomerulosclerosi focale e segmentale, IgAN, miRNA, Nefrite lupica, nefropatia diabetica

## miRNAs in main renal diseases: a new frontier for the nephrologist

miRNAs are short non-coding RNAs that play a key role in the homeostasis and in the onset of many diseases. Different studies on nephropathies have identified miRNAs that are differentially expressed in nephropathic subjects compared to healthy controls. An important goal of these studies is to give the nephrologist the possibility to diagnose different nephropathies based on liquid biopsies that are less invasive for the patient than solid ones. The present review focalizes on the function of miRNAs in human physiology and renal diseases and analyzes the potential role that, in the near future, they may have in the diagnosis and treatment of acute and chronic kidney diseases.

Key words: miRNA, lupus nephritis

## Introduzione

I microRNA (miRNA) sono piccole molecole endogene di RNA non codificante lunghe 20-22 nucleotidi, a singolo filamento, che regolano negativamente l'espressione genica a livello post-trascrizionale [1]. Sono dei piccoli RNA che mostrano complementarità parziale o totale delle loro basi rispetto a quelle dei loro RNA messaggeri (mRNA) bersaglio.

Nel genoma umano sono presenti più di 1000 miRNA [2] e solo una piccola parte di essi è in grado di regolare dal 30 all'80 % dei geni codificati [3] (full text). Essi sono in grado di impedire la traduzione dei loro *target* o di provocarne la distruzione, svolgendo un ruolo fondamentale nella regolazione di *networks* e *pathways* cellulari silenziando specifiche molecole di mRNA. In particolare ciascun miRNA può avere più *target* nella regione 3'-UTR (*Untranslated Region*) di un determinato mRNA e, grazie a studi di bioinformatica, è stato possibile dimostrare che una singola famiglia di miRNA può regolare fino a 400 *target* costituiti da mRNA codificanti proteine [4]. Un recente studio di filogenetica molecolare ha evidenziato che le sequenze di molti miRNA sono altamente conservate in specie anche molto lontane tra loro, a testimoniare ulteriormente il ruolo chiave che essi svolgono nei *pathways* fondamentali per le cellule [5]. Essi possono essere determinati non solo nei tessuti oggetto di studio ma anche nel siero, nelle urine ed in altri fluidi biologici [6] (full text). L'analisi dell'espressione dei miRNA e la loro eventuale disregolazione possono fornire importanti informazioni aggiuntive nell'interpretazione della patogenesi e nella formulazione della diagnosi di molte patologie umane (cardiovascolari, metaboliche, autoimmuni, neoplastiche, etc). In prospettiva anche la terapia di queste patologie può giovare dallo studio dei miRNA, che rappresentano un potenziale *target* dell'intervento farmacologico. Alcuni Autori hanno inoltre riportato una possibile correlazione tra i miRNA e le nefropatie [7]. La presente *review* si propone l'obiettivo di puntualizzare la funzione dei miRNA nella fisiologia e nella patologia renale umana e di analizzare il potenziale ruolo che, nel prossimo futuro, essi possono avere nella diagnosi e nella terapia delle nefropatie sia acute che croniche.

## Materiali e metodi

Per la stesura della presente *review*, abbiamo eseguito una ricerca su Pubmed creando differenti *queries* con le seguenti parole chiave: miRNA AND *kidney*, miRNA IN *diabetic nephropathy*, miRNA IN ADPKD, miRNA IN FSGS, miRNA IN IgAN, miRNA IN *renal fibrosis*, miRNA IN AKI, miRNA IN *renal cancer*. Tra tutti i risultati ottenuti abbiamo cercato di censire gli articoli di più immediato interesse clinico per il nefrologo.

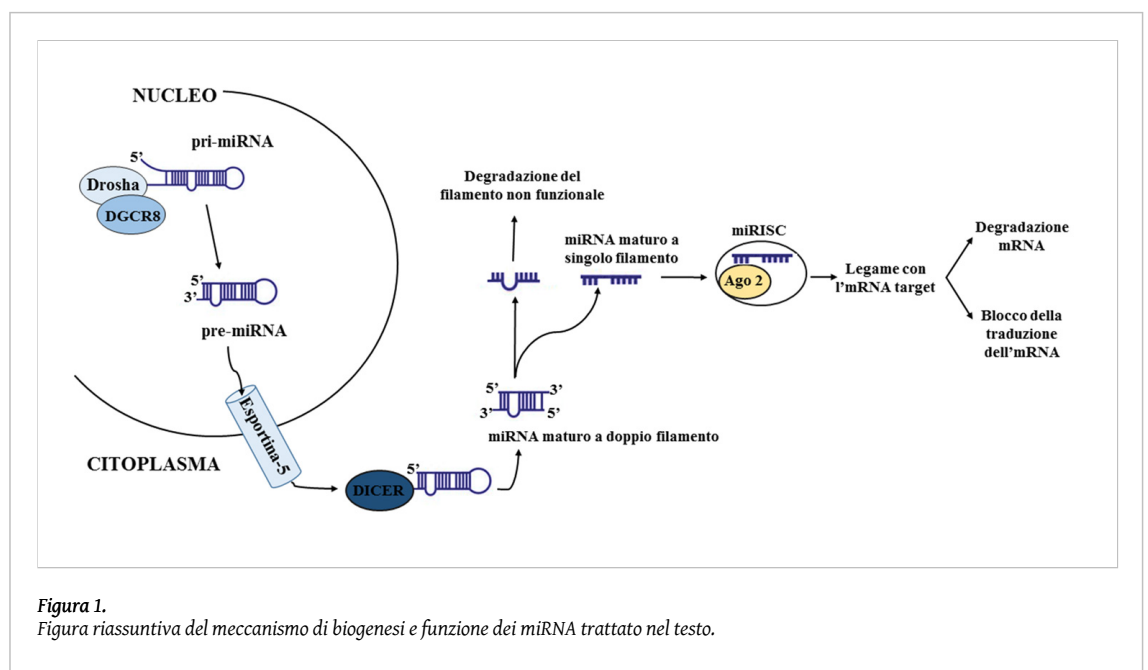
## Biogenesi e funzione biologica dei microRNA

I miRNA possono essere generati tramite le vie canonica e non canonica [1]. Nella via canonica le sequenze nucleotidiche codificanti i miRNA sono trascritte dalla RNA polimerasi II (Pol II) anche se recentemente è stato dimostrato che un gruppo di miRNA umani, localizzati sul cromosoma 19 e intercalati all'interno di elementi Alu (una breve sequenza interspersa di DNA che può essere utile per distinguere il DNA umano per esempio dal DNA murino), viene trascritto dall'RNA polimerasi III (Pol III). Il prodotto di trascrizione della Pol II o III è un lungo trascritto primario caratterizzato da una complessa struttura a forcina che prende il nome di *primary* miRNA (*pri-miRNA*). Questo precursore viene processato nel nucleo ad opera del complesso composto dall'RNasi III Droscha e dal suo cofattore DGCR8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8*). Il DGCR8 riconosce la struttura a forcina del *pri-miRNA* e recluta Droscha che taglia il *pri-miRNA* a livello della sua struttura a *stem loop*. Questo processo porta alla formazione di un precursore secondario di circa 70-100 nucleotidi: il cosiddetto pre-miRNA. Quest'ultimo viene esportato nel citoplasma grazie ad un meccanismo mediato dal trasportatore nucleocitoplasmatico Exportina-5. Nel citoplasma il pre-miRNA viene processato dall'RNasi III Dicer: si ottiene così il miRNA maturo a doppio filamento (dsRNA) costituito da 21-25 nucleotidi [8]. Dei due filamenti costituenti il miRNA maturo, quello complementare alla proteina Argonata (Ago 2) viene incorporato nel complesso proteico noto come miRISC (*RNA-induced silencing complex*), mentre l'altro (non funzionale, miRNA\*) viene

degradato da un'endonucleasi citoplasmatica. All'interno del neofornato complesso proteico miRISC, il miRNA maturo è in grado di appaiarsi al 3'UTR dell'mRNA *target* e di regolare l'espressione genica a livello post-trascrizionale (Figura 1). Il silenziamento genico può avvenire sia tramite degradazione dell'mRNA sia tramite blocco della traduzione [9]. La maggior parte dei miRNA viene prodotto attraverso la via canonica ma recenti studi hanno identificato *pathways* alternativi [10] (full text). La biogenesi dei miRNA può essere regolata in ciascuna delle sue fasi grazie alla presenza di proteine accessorie. Dal momento che anche piccole variazioni dei livelli dei miRNA possono avere importanti ripercussioni sui geni *target*, il controllo della biogenesi di queste molecole svolge un ruolo chiave nel mantenimento dell'omeostasi cellulare (Figura 1).

## Tecniche utilizzate per la determinazione dei MicroRNA

I metodi utilizzati per la determinazione dei miRNA includono il *northern blotting*, che prevede l'utilizzo di una sonda radiomarcata diretta contro il miRNA di interesse [11], la *Real Time-PCR* (RT-PCR), ed i *microarray* [12]. La tecnica del *microarray* consente un *profiling* di migliaia di miRNA contemporaneamente su piccole quantità di campione di RNA, permettendo così l'analisi di piccole biopsie, volumi limitati di fluidi corporei o campioni paraffinati [12] [13] [13]. La *Real Time-PCR* prevede l'utilizzo di una sonda a DNA complementare alla sequenza del suo *target* che consente il monitoraggio continuo dell'andamento della reazione. Tra le varie classi di sonde utilizzate in questa metodica, la sonda TaqMan® è quella di comune utilizzo per la quantificazione dei miRNA. Le metodiche della *Real Time-PCR* e dei *microarray* sono caratterizzate da livelli di specificità e sensibilità tali da renderle le più appropriate, ma gli eccessivi costi di gestione ne limitano l'uso solo ad alcuni laboratori. La determinazione dei miRNA, a prescindere dalla tecnica utilizzata, presenta intrinseche complicazioni dovute, per esempio, alla loro scarsa presenza nei campioni biologici e alla loro breve sequenza nucleotidica.



## Il ruolo dei microRNA nella fisiologia renale

Lo studio dei miRNA nella regolazione dell'organogenesi, dell'omeostasi del rene e nelle patologie che lo coinvolgono, ha assunto un ruolo sempre più importante nella ricerca clinica in questi ultimi anni. L'identificazione e la caratterizzazione dei miRNA in varie nefropatie può portare allo sviluppo di strumenti diagnostici nuovi e a terapie più specifiche ed efficaci. Pertanto, i miRNA rappresentano potenziali *target* terapeutici per nefropatie ed altre patologie la cui incidenza nella popolazione mondiale è in netto aumento [14]. Il *pattern* di espressione di alcuni miRNA a livello renale differisce da quello degli altri organi ed inoltre varia anche tra le diverse regioni del rene [7]. Recenti studi hanno messo in evidenza come i miRNA svolgano un ruolo cruciale nella regolazione delle funzioni fisiologiche del rene, compreso il mantenimento dell'omeostasi degli elettroliti, del pH, della pressione sanguigna, *etc.* Nello specifico, alcuni Autori hanno riscontrato come l'espressione dei miRNA coinvolti nel mantenimento dell'equilibrio osmolale a livello renale vari al variare di esso [15] (full text). Un tipico esempio è dato da un miRNA prettamente renale, il miR-192, che è coinvolto nei processi di regolazione dei liquidi attraverso l'inibizione della pompa  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasi. A sua volta l'ingresso di  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  può influire sui livelli di espressione del miR-192 stesso [15] (full text) [16] (full text). Un ulteriore esempio è costituito dal miR-200 e dal miR-717: in condizioni di ipernatriemia a livello della porzione midollare del tubulo collettore, il livello di espressione di questi miRNA può essere rapidamente e significativamente ridotto [17] (full text). Altri studi hanno evidenziato che nella porzione corticale del tubulo collettore, in condizioni di iperkaliemia, si assiste ad un aumento dell'espressione del miR-802 che a sua volta sopprime l'espressione della Caveolina-1, un regolatore negativo del canale ROMK1 (*Renal Outer Medullary Potassium Channel*) deputato al trasporto del potassio fuori dalle cellule [18] (full text). I miR-9 e miR-374 giocano un ruolo chiave nel tratto ascendente dell'ansa di Henle, dove sono responsabili della regolazione del trasporto del  $\text{Ca}^{2+}$  [19] (full text).

## Il ruolo dei microRNA nelle principali patologie renali

### Nefropatia diabetica (ND)

La nefropatia diabetica (ND) è la complicanza più comune del diabete di tipo 1 e 2 [20] (full text). Nonostante i meccanismi molecolari e biochimici coinvolti in questa patologia siano stati già ampiamente studiati, è stata recentemente dimostrata, in modelli murini e in biopsie renali provenienti da pazienti affetti da ND, la presenza di alterata espressione di alcuni miRNA [21] [22] (full text). Un ruolo chiave nella progressione di questa patologia è svolto dal TGF- $\beta$  (*Transforming Growth Factor-beta*). Gli stessi Autori, infatti, hanno identificato un meccanismo di danno del mesangio in cui il TGF- $\beta$  *up-regola* l'espressione del miR-192; i geni *target* di questo miRNA sono Zeb1 e Zeb2, repressori dell'E-box (*Enhancer-box*), un regolatore dell'espressione genica. Tramite questo meccanismo molecolare si ha l'attivazione e l'*up-regulation* di tutti gli effettori a valle che contengono l'E-box nel promotore, compresi i miR-217, miR-216, miR-200. In tal modo si ha *up-regulation* anche del gene che codifica per il collagene di tipo I con conseguente attivazione dei meccanismi che portano alla fibrosi renale (Figura 2) [23] (full text) [24] (full text). I miR-217 e miR-216 tramite il legame con PTEN (*Phosphatase and Tensin Homolog*) attivano Akt (*Protein kinase B* o PKB), responsabile dell'ulteriore ipertrofia delle cellule del mesangio [25]. Tuttavia altri studi hanno invece dimostrato che il miR-192 potrebbe promuovere la fibrosi renale tramite un meccanismo TGF- $\beta$  indipendente [26] (full text) [27] (full text) [28]. Un ulteriore miRNA, il miR-377 risulta essere *up-regulated* sia in modelli murini che in colture di cellule del me-

sangio umane. Il miR-377 riduce il livello di espressione della superossido dismutasi (SOD) e della PAK 1 (p21-activated kinase 1) provocando l'incremento della produzione di fibronectina [29] (full text).

### Nefropatia policistica autosomica dominante dell'adulto (ADPKD)

La nefropatia policistica autosomica dominante dell'adulto (*Autosomal Dominant Polycystic Kidney Disease*, ADPKD) è la forma più comune della malattia policistica renale ed è causata dalla mutazione dei geni PKD1 e PKD2. La maggior parte degli studi volti all'identificazione dei miRNA coinvolti in questa patologia sono stati eseguiti in modelli murini. Un ruolo importante nei meccanismi molecolari di questa patologia è svolto dal miR-17 il cui gene *target* è PKD2 [30] (full text) [31]. In modelli murini di ADPKD è stato evidenziato che il cluster dei miR-17~92 regola mTOR ed il *pathway* del TGF- $\beta$  svolgendo un ruolo chiave nel processo di cistogenesi. Analisi bioinformatiche hanno identificato nei geni PKD1 e PKD2 i *target* del cluster e che tali geni possiedono un dominio di legame per il miR-17 nell'estremità 3'-UTR [32] (full text). Analisi di *microarray* condotti su biopsie renali provenienti da modelli murini hanno messo in evidenza che i *target* dei miR-214, miR-31, miR-199a-5p, miR-21, miR-34a, miR-132, miR-146b sono coinvolti nei *pathway* più rilevanti per la ADPKD [33] (full text). Dall'analisi del profilo di espressione dei miRNA in campioni di urina da pazienti affetti da ADPKD è emerso che i miR-1 e miR-133b sono *down-regulated* mentre i miR-143 e miR-3619 sono *up-regulated*. Inoltre, i miR-1 e miR-133b risultano essere *down-regulated* sia *in vitro* che nelle biopsie di carcinoma renale evidenziando una possibile correlazione, ancora in fase preliminare, tra carcinoma renale ed ADPKD [34] (full text).

### Glomerulopatia a depositi di IgA (IgAN)

La Glomerulopatia a depositi di IgA (IgAN) è la causa più comune di glomerulonefrite primitiva. Malgrado la patogenesi della malattia non sia ancora del tutto conosciuta, sembra che un ruolo determinante sia svolto dalle immunoglobuline A ed in particolare quelle della classe IgA1. Il primo passo per l'insorgenza di tale patologia è dato dalla produzione da parte dei linfociti B di IgA1 galattosio-deficienti (Gd-IgA1). Gli enzimi responsabili della regolazione dei livelli di galattosio e N-acetilgalattosamina sono rispettivamente C1GALT1 (*core 1  $\beta$ 1,3-galactosyltransferase 1*) e GALNT2 (*N-acetylgalactosaminyltransferase 2*). Questi enzimi sono *down-regulated* nei pazienti affetti da IgA1N [35] (full text) [36] (full text). Recenti studi hanno dimostrato che l'*up-regulation* dei miR-148b e let-7b è correlata con la riduzione dell'attività enzimatica, rispettivamente, di C1GALT1 e GALNT2 [37] (full text). Il livello di espressione dei miR-146a e miR-155, studiati su campioni biopsici e di urina, aumenta nei pazienti affetti da IgA1N e mostra correlazione con un aumento dell'espressione di numerose citochine pro-infiammatorie [38] (full text). Studi hanno messo in evidenza l'*up-regulation* del miR-21 sia nel tessuto tubulointerstiziale che in quello glomerulare;

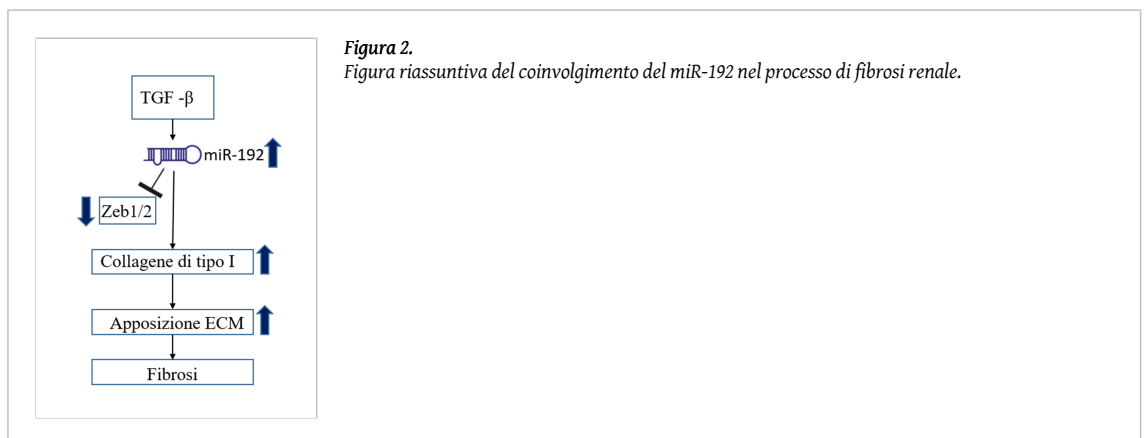


Figura 2.

Figura riassuntiva del coinvolgimento del miR-192 nel processo di fibrosi renale.

l'inibizione di questo miRNA, *in vitro*, ha come effetto sia il blocco dell'attivazione del *pathway* PTEN/Akt che l'espressione del fibrinogeno. Questi studi preliminari identificano il miR-21 come un possibile mezzo per contrastare l'attività fibrinogenica in pazienti affetti da IgA1N [39]. Altri Autori hanno recentemente comparato l'espressione dei miRNA tra biopsie di pazienti affetti da IgA1N *versus* altre glomerulopatie ed è emerso che negli affetti da IgA1N i miR-10b, miR-133b, miR-486 sono *up-regulated* a differenza dei miR-424, miR-143 e miR-200c che sono significativamente *down-regulated* [40].

### Glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS)

La glomerulosclerosi focale e segmentale (FSGS) rappresenta la causa più frequente di sindrome nefrosica negli adulti. Essa è considerata una malattia primitiva dei podociti ed è caratterizzata dalla sclerosi di alcuni glomeruli [41]. Tra i vari miRNA studiati nei soggetti affetti da questa patologia, la miR-30 family sembra giocare un ruolo fondamentale; studi di ibridazione *in situ* condotti su microbiopsie di glomeruli hanno evidenziato una *up-regulation* dei miR-30a e miR-30b nei podociti sani ed una *down-regulation* degli stessi nelle aree sclerotiche dei glomeruli. L'ipotesi che questi miRNA svolgano un ruolo protettivo nei podociti è stata avvalorata dai risultati ottenuti *in vitro* su linee cellulari di podociti che esprimono costitutivamente il miR-30a: in seguito al trattamento con TGF- $\beta$  la percentuale di cellule apoptotiche era significativamente ridotta se comparata con i risultati ottenuti da linee di podociti silenziati per il miR-30a [42] (full text). Altri studi hanno invece attenzionato il ruolo del miR-193a in questa patologia. In particolare alcuni Ricercatori hanno riportato che questo miRNA regola negativamente il fattore di trascrizione WT1 (Wilms' Tumour protein 1) che a sua volta regola il processo di maturazione dei podociti. Il blocco della funzionalità di WT1 si traduce in una riduzione della produzione di proteine fondamentali per l'architettura del podocita, quali la podocalixina e la podocina: si ha, così, perdita della struttura del podocita e quindi della sua funzionalità [43].

### Nefrite lupica (NL)

Il coinvolgimento renale è una delle maggiori cause di morbilità e mortalità nei pazienti affetti da lupus eritematoso sistemico (LES) [44] (full text). Dal punto di vista istologico si assiste ad un considerevole aumento delle cellule del mesangio, della produzione di matrice extracellulare e di infiltrati linfocitari: si assiste, quindi, allo sviluppo di fibrosi e sclerosi. I miRNA giocano un ruolo chiave nella patogenesi della nefrite lupica (NL) alterando la produzione di mediatori pro-infiammatori, la risposta immunitaria innata ed il *pathway* di NF- $\kappa$ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) [45] (full text) [46]. Un recente studio ha analizzato l'espressione dei miRNA nel siero di pazienti affetti da NL e soggetti sani riscontrando, nei primi, una *up-regulation* dei miR-130b-3p, miR-1233-3p, miR-18a-3p, miR-628-3p, miR-1260b, miR-1539 e miR-378. Tra questi, i miR-130b-3p e miR-1233-3p, mostravano sia un netto aumento nelle fasi iniziali della malattia rispetto ai soggetti sani che una diretta correlazione con il danno renale [47] (full text). In particolare il miR-130-3p ha come *target* il trascritto ERBB2IP (*ErbB2 interacting protein*), coinvolto nella regolazione della transizione epitelio-mesenchimale (*epithelial-mesenchymal transition*, EMT) nelle cellule tubulari renali [48]. Altri studi, invece, hanno identificato come geni *target* per questo miRNA PGC-1 $\alpha$  (*Peroxisome Proliferator - Activated Receptor Gamma Coactivator-1 alpha*) e PPAR- $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma*) [49] [50], rendendo il miR-130-3p un potenziale *biomarker* per gli stadi iniziali della NL.

### Glomerulonefrite membranosa (GNM)

La glomerulonefrite membranosa (GNM) è una patologia infiammatoria dei reni istologicamente caratterizzata da un assottigliamento uniforme delle pareti dei capillari glome-

ulari. Un recente studio ha analizzato il profilo di espressione dei miRNA in linfociti estratti da sangue periferico (*Peripheral Blood Lymphocyte Cells*, PBLC) sia di soggetti affetti da GNM che di controlli. L'analisi *high-throughput* ha permesso di evidenziare la *down-regulation* della miRNA-30 *family*. In particolare, l'inibizione dei miR-23b, miR-24 and miR-26a è strettamente correlata con una rapida progressione del danno glomerulare e tubulare [51]. Altri studi hanno confermato il ruolo chiave svolto da questi miRNA nel mantenimento della filtrazione glomerulare [52] ([full text](#)).

### Insufficienza renale acuta (IRA)

L'insufficienza renale acuta (IRA) è caratterizzata da un rapido decremento della funzionalità glomerulare in seguito a ischemia, nefrotossicità, sepsi, ostruzione del tratto urinario, *etc* [53] ([full text](#)). Un recente studio pilota ha permesso di individuare dieci miRNA differenzialmente espressi nel siero dei pazienti affetti da IRA comparati con controlli sani: si ha *down-regulation* dei miR-16, miR-320 e l'*up-regulation* del miR-210 rispetto ai controlli [54] ([full text](#)). La successiva analisi statistica e la *target prediction* dei miRNA disregolati ha confermato il loro potenziale utilizzo come *biomarkers* diagnostici di IRA. In particolare i livelli sierici del miR-210 correlano con l'incidenza di mortalità nei pazienti affetti da IRA e quindi potrebbe essere confermato come *biomarker* in grado di dare informazioni sul cambiamento patofisiologico a livello cellulare [55] ([full text](#)).

### MicroRNA e fibrosi renale

La fibrosi renale è una delle caratteristiche più comuni della malattia renale cronica (MRC). Essa è caratterizzata dall'accumulo di matrice extracellulare (MEC) in seguito ad un aumento della sua sintesi, ad una diminuzione del suo riassorbimento o alla combinazione di entrambi i fattori [56]. Diversi studi *in vitro* hanno evidenziato che il miR-29 svolge, in tale contesto, un ruolo anti-fibrotico inibendo l'accumulo di MEC TGF- $\beta$ -mediata. Questo miRNA, inoltre, ha come *target* più di 20 geni correlati al processo di apposizione della matrice e positivamente regolati da meccanismi TGF- $\beta$ -mediati [57]. Anche il miR-21 è positivamente regolato dal TGF- $\beta$  e la sua inibizione ha mostrato effetti sulla riduzione della fibrosi renale in modelli murini [58] ([full text](#)). Il miR-192 svolge un ruolo anti-fibrotico: è stato osservato che una sottoespressione di questo miRNA è associata ad un aumento della fibrosi interstiziale e ad un basso eGFR (*Estimated Glomerular Filtration Rate*) [22] ([full text](#)). Il miR-433 è stato recentemente identificato come uno dei fattori chiave del *pathway* TGF- $\beta$ /Smad3 che porta alla fibrosi renale. L'inibizione di questo miRNA sopprime l'apposizione della matrice come dimostrato da studi condotti *in vivo*, nei quali la soppressione del miR-433 riduce la fibrosi renale [59].

### MicroRNA e trapianto renale

Il trapianto renale è la terapia di prima scelta nell'uremia terminale ed i pazienti sono sottoposti per tutta la vita ad una terapia immunosoppressiva al fine di evitare il rigetto del *graft* [60] ([full text](#)). Quest'ultimo processo è dovuto all'attivazione dei linfociti del ricevente rivolti verso gli antigeni del *graft* che non vengono riconosciuti come *self*. I miRNA sono coinvolti nella regolazione dei geni implicati nell'immunità adattativa ed innata. Per questo motivo essi sono considerati potenziali biomarcatori predittivi di rigetto. In particolare alcuni studi hanno esaminato il profilo di espressione dei miRNA in campioni provenienti da pazienti sottoposti a trapianto, trovando miRNA *up-regulated* (let-7c, miR-10a, miR-125a, miR-30, miR-32) e *down-regulated* (miR-142, miR-155, miR-223, miR-146a, miR-342) [61]. Tra questi miRNA, i miR-142, miR-155 e miR-223 mostrano una *down-regulation* anche

nelle cellule mononucleate estratte dal sangue periferico dei pazienti durante la fase acuta del rigetto del rene [62] (full text). Altri Ricercatori hanno evidenziato, in campioni di sedimento urinario provenienti da pazienti in fase acuta di rigetto, *up-regulation* dei miR-10a/b e miR-210 [63] (full text). Se confermati da ulteriori studi questi miRNA potrebbero rappresentare, in tale contesto, biomarcatori emergenti di rigetto.

## MicroRNA e carcinoma renale (RCC)

Nell'ultimo decennio molti studi hanno permesso di identificare una certa correlazione tra la disregolazione di alcuni miRNA sia con l'insorgenza di diverse neoplasie che con la prognosi delle neoplasie stesse [64] (full text) [65] (full text). Il miR-21 è uno dei miRNA correlati al cancro più studiati e potrebbe rappresentare il fattore oncogenico più rilevante nella maggior parte dei tumori [66] (full text). L'*up-regulation* del miR-21, tramite la modulazione di numerosi geni, incrementa la proliferazione della neoplasia, la sua invasività e le sue potenzialità metastatiche compromettendo, inoltre, la risposta cellulare alla somministrazione di farmaci chemioterapici [67] [68] (full text). Dey *et al* [69] (full text) hanno evidenziato che il miR-21 media la regolazione post-trascrizionale di PTEN, che a sua volta è responsabile dell'attivazione del *pathway* Akt/TORC1, che ha come effetto l'incremento della proliferazione delle cellule neoplastiche renali. Inoltre, svolgendo un ruolo cruciale nell'incremento anche del processo di iperplasia delle cellule renali, il miR-21 è strettamente correlato con il processo di metastatizzazione [70]. Recenti studi hanno dimostrato che il miR-21 costituisce un fattore prognostico indipendente per pazienti affetti da RCC in assenza di metastasi [71]. Come già menzionato, i miR-1 e miR-133b risultano essere *down-regulated* sia *in vitro* che nelle biopsie di carcinoma renale [34] (full text). Inoltre, esperimenti di trasfezione *in vitro* hanno dimostrato che questi miRNA potrebbero svolgere un ruolo anti-tumorale a livello renale [72]. Un altro miRNA, il miR-199a, risulta essere *down-regulated* nelle biopsie renali nelle quali si assiste ad *up-regulation* del *target* del miRNA, GSK-3 (*glycogen synthase kinase 3*). La *down-regulation* del miR-199a mostra correlazione anche con la stadiazione del tumore. La ri-espressione del miR-199a *down-regola* GSK-3 riducendo la crescita delle cellule tumorali, costituendo un nuovo potenziale *target* terapeutico per il RCC [73] Tabella 1.

## Potenzialità diagnostiche e terapeutiche

La caratteristica della tessuto- o organo- specificità dei miRNA li rende ottimi candidati per lo sviluppo e la validazione del loro utilizzo come biomarcatori diagnostici. A tal proposito, di interesse sempre più crescente sono i miRNA circolanti, riscontrabili in tutti i fluidi (plasma, siero, urina, umor vitreo, *etc*) dove sono relativamente stabili. I miRNA circolanti sono protetti dalla digestione mediata da RNasi o perché contenuti in vescicole (esosomi) o perché complessati con la proteina Argonauta-2 [74] (full text). La scoperta del coinvolgimento dei miRNA nei *pathways* che conducono all'insorgenza di numerose patologie umane li ha posti al centro di un crescente interesse. In particolare, numerose ricerche mirano allo sviluppo di tecniche in grado di inibire queste molecole *in vivo*. L'inibizione dell'attività dei miRNA a scopo terapeutico può avvenire tramite diverse metodologie. Possono essere utilizzati inibitori costituiti da oligonucleotidi antisense (antagomir) che hanno come *target* il miRNA maturo. Gli antagomir, che vengono prodotti chimicamente, contengono anche un residuo di colesterolo che facilita il loro ingresso all'interno delle cellule [75]. I miRNA possono essere inibiti anche tramite l'introduzione di ripetizioni *in tandem* di siti di legame dei miRNA, una tecnologia che prende il nome di Decoy [76]. Nelle patologie renali dove i miRNA sono *down-regulated* si ha la traduzione dell'mRNA *target* e la conseguente produ-



**Tabella 1.** Tabella riassuntiva sul ruolo dei miRNA nelle principali nefropatie trattate nel testo

Patologia	miRNA up-regulated	miRNA down-regulated	Funzione	Referenza
ND	miR-192		Aumento della fibrosi	[23-24]
	miR-216 miR-217			[25]
	miR-377		Aumento della produzione di fibronectina	[29]
ADPKD	miR-17		Aumento della cistogenesi	[30-31]
		miR-1 miR-133b	Possibile correlazione tra ADPKD e RCC	[34]
IgA1N	miR-148b		Produzione di IgA1 galattosio-deficienti	[37]
	let-7b			
	miR-146a miR-155		Aumento dell'espressione di numerose citochine pro-infiammatorie	[38]
	miR-21		Aumento della fibrosi	[39]
FSGS		miR-30a miR-30b	Effetti protettivi sui podociti	[42]
	miR-193a		Riduzione della produzione di podocalixina e podocina	[43]
NL	miR-130b-3p		Regolazione della transizione mesenchimale	[48-49-50]
GMN		miRNA-30 family	Effetti protettivi sui podociti	[51]
IRA		miR-16 miR-320	Coinvolgimento nei pathway che conducono alla patologia	[54]
	miR-210		Correlazione con l'incidenza di mortalità	[55]
FIBROSI RENALE		miR-29	Ruolo anti-fibrotico	[57]
		miR-192		[22]
	miR-433		Aumento della fibrosi	[59]
	miR-21			[58]
TRAPIANTO RENALE		miR-142 miR-155 miR-223	Correlazione preliminare con il rigetto	[62]
	miR-10a miR-210			[63]
CARCINOMA RENALE	miR-21		Proliferazione delle cellule neoplastiche	[70]
		miR-1 miR-133b	Possibile correlazione tra ADPKD e RCC Effetti anti-tumorali	[34-72]
		miR-199a	Riduzione della proliferazione delle cellule neoplastiche	[73]

zione della proteina da esso codificata. Seguendo questo modello molecolare, introducendo una molecola di RNA complementare al suo *target* si potrebbe mimare la funzione molecolare del miRNA coinvolto, ripristinando il controllo post-trascrizionale da esso esercitato. Nello specifico, viene prodotta chimicamente una molecola di RNA che all'estremità 5' possiede una sequenza nucleotidica complementare al 3' UTR dell'mRNA bersaglio che, introdotto nelle cellule, è in grado di ripristinare la regolazione post-trascrizionale esercitata in condizioni fisiologiche dal miRNA [77]. Per limitare, invece, gli effetti patologici innescati da una continua *up-regulation* di un miRNA, è possibile avvalersi di vettori virali che codificano per shRNA (*short hairpin RNA*), che hanno come bersaglio molecolare il miRNA maturo [78] (full text). Le metodiche precedentemente trattate hanno già fornito risultati promettenti in modelli murini [23] (full text) [79] (full text), anche se dovranno essere condotti studi e ricerche più approfondite dal momento che i *pathways* molecolari coinvolti sono molto complessi.

## Conclusioni e prospettive future

Il potenziale clinico dei numerosi studi sperimentali riportati in letteratura è evidente anche in questa fase iniziale di studio sui miRNA. Necessariamente restano aperti importanti quesiti relativi al potenziale uso dei miRNA nella terapia delle nefropatie quali la modalità di somministrazione e la specificità d'organo e di tessuto. L'utilità dei miRNA circolanti come *biomarkers* delle nefropatie apre nuovi scenari, ma attende conferme. La possibilità per il clinico di effettuare diagnosi non più su biopsie solide ma su biopsie liquide, ovvero sui fluidi biologici, costituisce un importante traguardo soprattutto nella prospettiva di avvalersi di metodiche meno invasive per il paziente. Non vi è, comunque, alcun dubbio che, nel prossimo futuro, una maggiore comprensione delle funzioni dei miRNA e delle vescicole che li trasportano e li veicolano all'interno delle cellule possa aprire importanti prospettive in termini di diagnosi, patogenesi e trattamento di rilevanti patologie nel paziente nefropatico.

---

## Bibliografia

- [1] Ha M, Kim VN Regulation of microRNA biogenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology* 2014 Aug;15(8):509-24
- [2] Czech MP MicroRNAs as therapeutic targets. *The New England journal of medicine* 2006 Mar 16;354(11):1194-5
- [3] Farh KK, Grimson A, Jan C et al. The widespread impact of mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution. *Science (New York, N.Y.)* 2005 Dec 16;310(5755):1817-21 (full text)
- [4] Perera RJ, Ray A MicroRNAs in the search for understanding human diseases. *BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy* 2007;21(2):97-104
- [5] Lim LP, Lau NC, Garrett-Engle P et al. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 2005 Feb 17;433(7027):769-73
- [6] Argyropoulos C, Wang K, McClarty S et al. Urinary microRNA profiling in the nephropathy of type 1 diabetes. *PloS one* 2013;8(1):e54662 (full text)
- [7] Li JY, Yong TY, Michael MZ et al. Review: The role of microRNAs in kidney disease. *Nephrology (Carlton, Vic.)* 2010 Sep;15(6):599-608
- [8] Miyoshi K, Miyoshi T, Siomi H et al. Many ways to generate microRNA-like small RNAs: non-canonical pathways for microRNA production. *Molecular genetics and genomics : MGG* 2010 Aug;284(2):95-103
- [9] Finnegan EF, Pasquinelli AE MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* 2013 Jan-Feb;48(1):51-68

ND: Nefropatia diabetica; ADPKD: Nefropatia policistica autosomica dominante dell'adulto; IgAN: Glomerulopatia a depositi di IgA; FSGS: Glomerulosclerosi focale e segmentale; NL: Nefrite lupica; GNM: Glomerulonefrite membranosa; IRA: Insufficienza renale acuta; RCC: Carcinoma renale

- [10] Yang JS, Lai EC Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular cell* 2011 Sep 16;43(6):892-903 (full text)
- [11] Várallyay E, Burgyán J, Havelda Z et al. MicroRNA detection by northern blotting using locked nucleic acid probes. *Nature protocols* 2008;3(2):190-6
- [12] Tian T, Wang J, Zhou X et al. A review: microRNA detection methods. *Organic & biomolecular chemistry* 2015 Feb 28;13(8):2226-38
- [13] Cissell KA, Deo SK Trends in microRNA detection. *Analytical and bioanalytical chemistry* 2009 Jun;394(4):1109-16
- [14] Trionfani P, Benigni A, Remuzzi G et al. MicroRNAs in kidney physiology and disease. *Nature reviews. Nephrology* 2015 Jan;11(1):23-33
- [15] Mladin D, Liu Y, Mattson DL et al. MicroRNAs contribute to the maintenance of cell-type-specific physiological characteristics: miR-192 targets Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\beta$ 1. *Nucleic acids research* 2013 Jan;41(2):1273-83 (full text)
- [16] Elvira-Matelot E, Zhou XO, Farman N et al. Regulation of WNK1 expression by miR-192 and aldosterone. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010 Oct;21(10):1724-31 (full text)
- [17] Huang W, Liu H, Wang T et al. Tonicity-responsive microRNAs contribute to the maximal induction of osmoregulatory transcription factor OREBP in response to high-NaCl hypertonicity. *Nucleic acids research* 2011 Jan;39(2):475-85 (full text)
- [18] Lin DH, Yue P, Pan C et al. MicroRNA 802 stimulates ROMK channels by suppressing caveolin-1. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2011 Jun;22(6):1087-98 (full text)
- [19] Schena FP, Serino G, Sallustio F et al. MicroRNAs in kidney diseases: new promising biomarkers for diagnosis and monitoring. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 2014 Apr;29(4):755-63 (full text)
- [20] Brownlee M The pathobiology of diabetic complications: a unifying mechanism. *Diabetes* 2005 Jun;54(6):1615-25 (full text)
- [21] Kato M, Natarajan R MicroRNA circuits in transforming growth factor- $\beta$  actions and diabetic nephropathy. *Seminars in nephrology* 2012 May;32(3):253-60
- [22] Krupa A, Jenkins R, Luo DD et al. Loss of MicroRNA-192 promotes fibrogenesis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2010 Mar;21(3):438-47 (full text)
- [23] Putta S, Lanting L, Sun G et al. Inhibiting microRNA-192 ameliorates renal fibrosis in diabetic nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012 Mar;23(3):458-69 (full text)
- [24] Kato M, Zhang J, Wang M et al. MicroRNA-192 in diabetic kidney glomeruli and its function in TGF- $\beta$ -induced collagen expression via inhibition of E-box repressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007 Feb 27;104(9):3432-7 (full text)
- [25] Kato M, Putta S, Wang M et al. TGF- $\beta$  activates Akt kinase through a microRNA-dependent amplifying circuit targeting PTEN. *Nature cell biology* 2009 Jul;11(7):881-9
- [26] Wang B, Herman-Edelstein M, Koh P et al. E-cadherin expression is regulated by miR-192/215 by a mechanism that is independent of the profibrotic effects of transforming growth factor- $\beta$ . *Diabetes* 2010 Jul;59(7):1794-802 (full text)
- [27] Wei Q, Mi QS, Dong Z et al. The regulation and function of microRNAs in kidney diseases. *IUBMB life* 2013 Jul;65(7):602-14 (full text)
- [28] Kato M, Natarajan R MicroRNAs in diabetic nephropathy: functions, biomarkers, and therapeutic targets. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2015 Sep;1353:72-88
- [29] Wang Q, Wang Y, Minto AW et al. MicroRNA-377 is up-regulated and can lead to increased fibronectin production in diabetic nephropathy. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 2008 Dec;22(12):4126-35 (full text)
- [30] Tran U, Zakin L, Schweickert A et al. The RNA-binding protein bicaudal C regulates polycystin 2 in the kidney by antagonizing miR-17 activity. *Development (Cambridge, England)* 2010 Apr;137(7):1107-16 (full text)
- [31] Sun H, Li QW, Lv XY et al. MicroRNA-17 post-transcriptionally regulates polycystic kidney disease-2 gene and promotes cell proliferation. *Molecular biology reports* 2010 Jul;37(6):2951-8
- [32] Patel V, Williams D, Hajarnis S et al. miR-17~92 miRNA cluster promotes kidney cyst growth in polycystic kidney disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2013 Jun 25;110(26):10765-70 (full text)
- [33] Dweep H, Sticht C, Kharkar A et al. Parallel analysis of mRNA and microRNA microarray profiles to explore functional regulatory patterns in polycystic kidney disease: using PKD/Mhm rat model. *PLoS one* 2013;8(1):e53780 (full text)
- [34] Ben-Dov IZ, Tan YC, Morozov P et al. Urine microRNA as potential biomarkers of autosomal dominant polycystic kidney disease progression: description of miRNA profiles at baseline. *PLoS one* 2014;9(1):e86856 (full text)
- [35] Kudo T, Iwai T, Kubota T et al. Molecular cloning and characterization of a novel UDP-Gal:GalNAc( $\alpha$ ) peptide beta 1,3-galactosyltransferase (C1Gal-T2), an enzyme synthesizing a core 1 structure of O-glycan. *The Journal of biological chemistry* 2002 Dec 6;277(49):47724-31 (full text)
- [36] Iwasaki H, Zhang Y, Tachibana K et al. Initiation of O-glycan synthesis in IgA1 hinge region is determined by a single enzyme, UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 2. *The Journal of biological chemistry* 2003 Feb 21;278(8):5613-21 (full text)
- [37] Serino G, Sallustio F, Cox SN et al. Abnormal miR-148b expression promotes aberrant glycosylation of IgA1 in IgA nephropathy. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012 May;23(5):814-24 (full text)
- [38] Wang G, Kwan BC, Lai FM et al. Elevated levels of miR-146a and miR-155 in kidney biopsy and urine from patients with IgA nephropathy. *Disease markers* 2011;30(4):171-9 (full text)
- [39] Bao H, Hu S, Zhang C et al. Inhibition of miRNA-21 prevents fibrogenic activation in podocytes and tubular cells in IgA nephropathy. *Biochemical and biophysical research communications* 2014 Feb 21;444(4):455-60
- [40] Tan K, Chen J, Li W et al. Genome-wide analysis of microRNAs expression profiling in patients with primary IgA nephropathy. *Genome / National Research Council Canada = Genome / Conseil national de recherches Canada* 2013 Mar;56(3):161-9

- [41] Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Klatt EC. ROBBINS - KUMAR & KLATT: Il manuale di patologia generale e anatomia patologica, nona edizione. Elsevier ISBN 978-1-14557-2613-4
- [42] Wu J, Zheng C, Fan Y et al. Downregulation of microRNA-30 facilitates podocyte injury and is prevented by glucocorticoids. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2014 Jan;25(1):92-104 (full text)
- [43] Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nature medicine* 2013 Apr;19(4):481-7
- [44] Chafin CB, Reilly CM MicroRNAs implicated in the immunopathogenesis of lupus nephritis. *Clinical & developmental immunology* 2013;2013:430239 (full text)
- [45] Yung S, Chan TM Autoantibodies and resident renal cells in the pathogenesis of lupus nephritis: getting to know the unknown. *Clinical & developmental immunology* 2012;2012:139365 (full text)
- [46] Lewis EJ, Schwartz MM Pathology of lupus nephritis. *Lupus* 2005;14(1):31-8
- [47] Wang W, Mou S, Wang L et al. Up-regulation of Serum MiR-130b-3p Level is Associated with Renal Damage in Early Lupus Nephritis. *Scientific reports* 2015 Aug 28;5:12644 (full text)
- [48] Zhou Q, Zeng R, Xu C et al. Erbin inhibits TGF- $\beta$ 1-induced EMT in renal tubular epithelial cells through an ERK-dependent pathway. *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 2012 May;90(5):563-74
- [49] Wang YC, Li Y, Wang XY et al. Circulating miR-130b mediates metabolic crosstalk between fat and muscle in overweight/obesity. *Diabetologia* 2013 Oct;56(10):2275-85
- [50] Pan S, Yang X, Jia Y et al. Microvesicle-shuttled miR-130b reduces fat deposition in recipient primary cultured porcine adipocytes by inhibiting PPAR-g expression. *Journal of cellular physiology* 2014 May;229(5):631-9
- [51] Chen W, Lin X, Huang J et al. Integrated profiling of microRNA expression in membranous nephropathy using high-throughput sequencing technology. *International journal of molecular medicine* 2014 Jan;33(1):25-34
- [52] Ho J, Ng KH, Rosen S et al. Podocyte-specific loss of functional microRNAs leads to rapid glomerular and tubular injury. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 2008 Nov;19(11):2069-75 (full text)
- [53] Shah SR, Tunio SA, Arshad MH et al. Acute Kidney Injury Recognition and Management: A Review of the Literature and Current Evidence. *Global journal of health science* 2015 Sep 18;8(5):120-4 (full text)
- [54] Aguado-Fraile E, Ramos E, Conde E et al. A Pilot Study Identifying a Set of microRNAs As Precise Diagnostic Biomarkers of Acute Kidney Injury. *PloS one* 2015;10(6):e0127175 (full text)
- [55] Lorenzen JM, Kielstein JT, Hafer C et al. Circulating miR-210 predicts survival in critically ill patients with acute kidney injury. *Clinical journal of the American Society of Nephrology* : CJASN 2011 Jul;6(7):1540-6 (full text)
- [56] Liu Y Cellular and molecular mechanisms of renal fibrosis. *Nature reviews. Nephrology* 2011 Oct 18;7(12):684-96
- [57] Zavadil J, Narasimhan M, Blumenberg M et al. Transforming growth factor-beta and microRNA:mRNA regulatory networks in epithelial plasticity. *Cells, tissues, organs* 2007;185(1-3):157-61
- [58] Chung AC, Lan HY MicroRNAs in renal fibrosis. *Frontiers in physiology* 2015;6:50 (full text)
- [59] Li R, Chung AC, Dong Y et al. The microRNA miR-433 promotes renal fibrosis by amplifying the TGF- $\beta$ /Smad3-Azin1 pathway. *Kidney international* 2013 Dec;84(6):1129-44
- [60] van den Akker EK, Dor FJ, IJzermans JN et al. MicroRNAs in Kidney Transplantation: Living up to Their Expectations? *Journal of transplantation* 2015;2015:354826 (full text)
- [61] Scian MJ, Maluf DG, Mas VR et al. MiRNAs in kidney transplantation: potential role as new biomarkers. *Expert review of molecular diagnostics* 2013 Jan;13(1):93-104
- [62] Anglicheau D, Sharma VK, Ding R et al. MicroRNA expression profiles predictive of human renal allograft status. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2009 Mar 31;106(13):5330-5 (full text)
- [63] Lorenzen JM, Volkman I, Fiedler J et al. Urinary miR-210 as a mediator of acute T-cell mediated rejection in renal allograft recipients. *American journal of transplantation* : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons 2011 Oct;11(10):2221-7 (full text)
- [64] Gu L, Li H, Chen L et al. MicroRNAs as prognostic molecular signatures in renal cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* 2015 Oct 20;6(32):32545-60 (full text)
- [65] Nair VS, Maeda LS, Ioannidis JP et al. Clinical outcome prediction by microRNAs in human cancer: a systematic review. *Journal of the National Cancer Institute* 2012 Apr 4;104(7):528-40 (full text)
- [66] Volinia S, Calin GA, Liu CG et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006 Feb 14;103(7):2257-61 (full text)
- [67] Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *The Journal of molecular diagnostics* : JMD 2012 Jul;14(4):385-92
- [68] Zaman MS, Shahryari V, Deng G et al. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival. *PloS one* 2012;7(2):e31060 (full text)
- [69] Dey N, Das F, Ghosh-Choudhury N et al. microRNA-21 governs TORC1 activation in renal cancer cell proliferation and invasion. *PloS one* 2012;7(6):e37366 (full text)
- [70] Li X, Xin S, He Z et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor PDCD4 and promotes cell transformation, proliferation, and metastasis in renal cell carcinoma. *Cellular physiology and biochemistry* : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology 2014;33(6):1631-42
- [71] Cao J, Liu J, Xu R et al. MicroRNA-21 stimulates epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis in clear cell renal cells. *Molecular medicine reports* 2016 Jan;13(1):75-82
- [72] Jilg CA, Drendel V, Bacher J et al. Autosomal dominant polycystic kidney disease: prevalence of renal neoplasias in surgical kidney specimens. *Nephron. Clinical practice* 2013;123(1-2):13-21
- [73] Tsukigi M, Bilim V, Yuuki K et al. Re-expression of miR-199a suppresses renal cancer cell proliferation and survival by targeting GSK-3 $\beta$ . *Cancer letters* 2012 Feb 28;315(2):189-97

[74] Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM et al. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2011 Mar 22;108(12):5003-8 (full text)

[75] Ørom UA, Kauppinen S, Lund AH et al. LNA-modified oligonucleotides mediate specific inhibition of microRNA function. *Gene* 2006 May 10;372:137-41

[76] Ebert MS, Neilson JR, Sharp PA et al. MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nature methods* 2007 Sep;4(9):721-6

[77] Xiao J, Yang B, Lin H et al. Novel approaches for gene-specific interference via manipulating actions of microRNAs: examination on the pacemaker channel genes HCN2 and HCN4. *Journal of cellular physiology* 2007 Aug;212(2):285-92

[78] Esau C, Davis S, Murray SF et al. miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell metabolism* 2006 Feb;3(2):87-98 (full text)

[79] Wang B, Komers R, Carew R et al. Suppression of microRNA-29 expression by TGF- $\beta$ 1 promotes collagen expression and renal fibrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 2012 Feb;23(2):252-65 (full text)