



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
FACULTAD DE MEDICINA

**BIOMEDICINA**

PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN ASTROCITOMAS  
PEDIÁTRICOS

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL PILAR EGUÍA AGUILAR**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO\*  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2014.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.





**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**BIOMEDICINA**

**PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN ASTROCITOMAS  
PEDIÁTRICOS**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**MARÍA DEL PILAR EGUÍA AGUILAR**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO  
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**COMITÉ TUTOR: DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM  
DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA, UNAM**

**MÉXICO, D.F.**

**NOVIEMBRE, 2014**



COORDINACIÓN

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
**Presente**

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de junio de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **EGUÍA AGUILAR MARÍA DEL PILAR** con número de cuenta **85267112** con la tesis titulada **"PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS"**, realizada bajo la dirección del **DR. FRANCISCO JESÚS ARENAS HUERTERO**:

Presidente: DRA. MARÍA DEL CARMEN MALDONADO BERNAL  
Vocal: DR. FÉLIX RECILLAS TARGA  
Secretario: DR. JOSÉ LUIS REYES TABOADA  
Suplente: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
Suplente: DRA. MARÍA DEL CARMEN LETICIA CALDERÓN EZQUERRO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
Cd. Universitaria, D.F., a 06 de octubre de 2014

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'M. del Coro Arriaga'.

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**



## **AGRADECIMIENTOS**

- **Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).**
- **A los financiamientos:**
- **Asociación Gral. y Lic. Aarón Sáenz Garza A. C.**  
**Fondos Federales Hospital Infantil de México Federico Gómez HIM/2010/044, SSA 916.**
- **En especial a los miembros de mi Comité Tutoral por guiarme en este proceso de formación:**  
**Al Dr. Francisco Jesús Arenas Huertero por compartir su conocimiento, su experiencia y sobre todo su amistad y confianza.**  
**Al Dr. José Luis Reyes Taboada y la Dra. María del Carmen Leticia Calderón Ezquerro por los comentarios y sugerencias realizadas a lo largo de este estudio.**

## **AGRADECIMIENTOS**

- **Agradezco al Dr. José Mario PérezPeña DíazConti por su apoyo y amistad durante el transcurso de los estudios de pos-grado.**
- **Este trabajo fue desarrollado en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica y Experimental del Hospital Infantil de México Federico Gómez a cargo del Dr. Stanislaw Sadowinki Pine y actualmente del Dr. José Mario PérezPeña DíazConti.**

***DEDICATORIA***

*A Emilio y Sofía gracias por inspirarme y ser lo más valioso en mi vida.*

*A Gabriel agradezco su paciencia y apoyo durante el tiempo de los estudios de Doctorado.*

*A mis padres, por haberme dado la vida y ser un ejemplo de constancia, esfuerzo y honradez.*

*A Paty, mis sobrinos y mi tío por formar parte de mi vida.*



## Contenido

<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	1
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	2
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	5
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	6
<b>1.1. Clasificación de astrocitomas</b> .....	7
<b>1.2. Importancia de los microRNAs</b> .....	10
<b>1.3. Biogénesis</b> .....	10
<b>1.4. Complejo miR/RISC-RNA</b> .....	13
<b>1.5. Expresión de microRNAs en cerebro</b> .....	15
<b>1.6. MicroRNAs y su relación con cáncer</b> .....	15
<b>1.8.1. MiR-9</b> .....	18
<b>1.8.2. MiR-21</b> .....	19
<b>1.8.3. MiR-221/222</b> .....	21
<b>1.9. MicroRNAs supresores de tumor: diferenciación neural y proliferación</b> .....	22
<b>1.9.1. MiR-15b</b> .....	22
<b>1.9.2. MiR-124</b> .....	23
<b>1.9.3. MiR-128</b> .....	24
<b>1.9.4. MiR-137</b> .....	25
<b>1.9.5. MiR-181</b> .....	26
<b>1.10. Expresión de microRNAs en suero</b> .....	28
<b>2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	31

<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	32
<b>4. HIPÓTESIS</b> .....	32
<b>5. OBJETIVOS</b> .....	33
<b>6. METODOLOGÍA</b> .....	34
<b>6.1. Tipo de estudio y características de las muestras.</b> .....	34
<b>6.2. Tamaño de muestra.</b> .....	34
<b>6.3. Extracción de RNA total</b> .....	35
<b>6.4. Líneas celulares</b> .....	35
<b>6.5. RT-PCR de punto final</b> .....	36
<b>6.6. Valores de expresión de miRNAs (semicuantitativo):</b> .....	37
<b>6.7. RT-qPCR en astrocitomas GI-GIV</b> .....	37
<b>6.8. Registro de datos clínico-patológicos</b> .....	39
<b>6.9. Análisis estadístico</b> .....	39
<b>7. RESULTADOS</b> .....	40
<b>7.1. Expresión semicuantitativa de microRNAs en cerebro normal.</b> .....	40
<b>7.2. Expresión semicuantitativa de microRNAs en astrocitomas de GI y IV.</b> .....	42
<b>7.3. Expresión de miR -124-3p, -128-3p y -221-3p en astrocitomas GI a GIV.</b> .....	43
<b>7.4. Expresión de pre-miR-128 y pre-miR-221 en astrocitomas GI y GIV.</b> .....	44
<b>7.5. RT-qPCR de miR-124-3p, -128-3p y 221-3p y su correlación con parámetros clínico-patológicos.</b> .....	46
<b>7.5.1. Expresión en astrocitomas de bajo y alto grado.</b> .....	46
<b>7.5.2. Expresión de acuerdo a localización infra y supratentorial.</b> .....	47
<b>7.5.3. Expresión en pacientes con recurrencia tumoral.</b> .....	48
<b>7.9. Expresión de microRNAs en suero de pacientes con astrocitomas.</b> .....	49
<b>7.9.1. PCR punto final</b> .....	49

<b>7.9.2. RT-qPCR.....</b>	<b>50</b>
<b>7.10. Expresión de microRNAs en líneas celulares de astrocitoma.....</b>	<b>52</b>
<b>8. DISCUSIÓN.....</b>	<b>53</b>
<b>9. CONCLUSIONES.....</b>	<b>60</b>
<b>10. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>61</b>
<b>11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>62</b>
<b>12. ANEXO.....</b>	<b>70</b>
<b>12.1. Artículo de Investigación.....</b>	<b>70</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Patrón histológico de astrocitomas. _____	8
<b>Figura 2.</b> Biogénesis y función de miRNAs. _____	12
<b>Figura 3.</b> Biogénesis del microRNA dentro del núcleo y almacenamiento en cuerpos-p. ____	14
<b>Figura 4.</b> Alteración de los microRNAs en el desarrollo del tumor. _____	16
<b>Figura 5.</b> MiR-21. _____	20
<b>Figura 6.</b> MiR-221. _____	22
<b>Figura 7.</b> MiR-15b. _____	23
<b>Figura 8.</b> MiR. 124 y miR-137. _____	24
<b>Figura 9.</b> MiR-128. _____	25
<b>Figura 10.</b> Posible ruta de transporte de los miRNAs en el suero. _____	30
<b>Figura 11.</b> Esquema de iniciadores para la RT-qPCR. _____	39
<b>Figura 12.</b> RT-PCR punto final de miRNAs en cerebro normal en diferentes ciclos de amplificación _____	40
<b>Figura 13.</b> RT-PCR punto final de U6sn y microRNAs en cerebro normal. _____	41
<b>Figura 14.</b> Expresión de microRNAs en GI y GIV mediante RT-qPCR. _____	44
<b>Figura 15.</b> Expresión de pre-miRs en GI y GIV. _____	45
<b>Figura 16.</b> Expresión de microRNAs en astrocitomas de bajo y alto grado. _____	47
<b>Figura 17.</b> Expresión de microRNAs por localización del tumor. _____	48
<b>Figura 18.</b> Expresión de microRNAs por recurrencia tumoral. _____	49
<b>Figura 19.</b> Expresión de miRNAs en muestras de suero. _____	50
<b>Figura 20.</b> Expresión en líneas celulares de astrocitoma. _____	52

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de astrocitomas según la OMS.	7
<b>Tabla 2.</b> Expresión de microRNAs en cerebro normal y en astrocitomas.	27
<b>Tabla 3.</b> Tamaño de muestra.	35
<b>Tabla 4.</b> Secuencia de iniciadores utilizados para el ensayo RT.	36
<b>Tabla 5.</b> Secuencia de iniciadores para PCR.	37
<b>Tabla 6.</b> Expresión semicuantitativa de miRNAs en C.N, GI y GIV.	42
<b>Tabla 7.</b> Datos clínico-patológicos de los pacientes estudiados.	46
<b>Tabla 8.</b> Valores de expresión de miRNAs en suero	51

### RESUMEN

En niños, los astrocitomas ocupan el segundo lugar de incidencia después de las leucemias y linfomas. La OMS los clasifica en cuatro grados: grado I astrocitoma pilocítico, grado II astrocitoma difuso, grado III astrocitoma anaplásico y grado IV glioblastoma multiforme (GBM). Recientemente se ha comprobado el papel de los microRNAs (miRNAs) en el desarrollo de diferentes tipos de cáncer. Las alteraciones moleculares observadas en los astrocitomas de adultos son distintas a las descritas en población pediátrica, en adultos se presentan con mayor frecuencia los tumores de alto grado y en niños los de bajo grado. En los astrocitomas de adulto hay un amplio grupo de microRNAs descritos, pero en los tumores de niños no hay mucha información al respecto lo que nos orilla a preguntarnos si la expresión de los microRNAs puede caracterizar a los distintos grados de astrocitomas pediátricos (GI-GIV)?. De manera inicial se analizó la expresión de ocho miRNAs maduros en astrocitomas GI y GIV pediátricos. Posteriormente se eligieron tres microRNAs, miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p y se cuantificaron los niveles de expresión de las formas precursoras y maduras en los cuatro grados de astrocitomas pediátricos. Los casos fueron tomados del banco de biopsias del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Como testigo se incluyeron 13 muestras de corteza cerebral de autopsias sin lesiones tumorales. Los datos clínicos de los pacientes se utilizaron para comparar los niveles de expresión de los miRNAs en los cuatro grados de astrocitoma. Se incluyeron muestras de suero de siete pacientes con astrocitomas con la finalidad de cuantificar la expresión de los tres microRNAs. Las diferencias en la relación de expresión se analizaron mediante la prueba estadística t-student y ANOVA y fueron significativas cuando el valor de p fue  $< 0.05$ . Los resultados mostraron que en GIV la expresión de miR-124-3p y -128-3p descendió de manera significativa, 407 y 1469 veces, respectivamente ( $p < 0.05$  en ambos casos). El miR-221-3p tuvo una disminución en su expresión estadísticamente significativa en GIV. En cuanto a la expresión de las formas precursoras de miR-128 y -221 se observó que en GIV su expresión fue mayor (3.5 veces) en comparación con GI. De

manera general en los casos recurrentes que fallecieron y en los de bajo grado que recurrieron, los miR-124-3p y miR-128-3p siempre disminuyeron su expresión a la mitad con respecto a los niveles observados en los que no recurrieron y que siguen vivos. En suero la expresión de miR-221 disminuyó en todos los casos con respecto a pacientes sin cáncer; miR-128 fue el más abundante en comparación con los otros dos microRNAs. Con estos resultados podemos concluir lo siguiente: la baja expresión de los tres microRNAs caracteriza a los astrocitomas de GIV y su alta expresión puede constituirse como un factor pronóstico favorable para el paciente.

## ABSTRACT

In children, astrocytomas occupy the second malignant tumor, only after acute leukemia's. The WHO classifies astrocytomas in four grades: I pilocytic astrocytoma, II diffuse astrocytoma, III anaplastic astrocytoma and IV glioblastoma multiforme (GBM). Recently there has been knowledge of the involvement of microRNAs (miRNAs) in the development of certain kinds of cancers. There are few data regarding the expression of miRNAs that involve astrocytomas of low and high grade in children. Initially we analyzed the expression of eight mature miRNAs in pediatric astrocytomas G1 and IV. Afterward only three microRNAs were selected, miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p and were determined the level of expression of mature and precursor forms of the miRNAs present in high and low grade astrocytomas, from the biopsy bank at the Pathology Department in the Hospital Infantil de México Federico Gómez. For control cases 13 samples of cerebral cortex without tumor were selected. The expression level of mature forms was performed for miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p in all astrocytomas. The differences in the relation of expression of the microRNAs were analyzed with the T student and ANOVA having a significative value when  $p$  was  $< 0.05$ . The results show that the RT-qPCR when compared between normal brain and the groups GI, II, III and IV and the expression of miR-124-3p and -128-3p diminished significantly, 407 and 1469 times respectively ( $p < 0.05$  in both cases). MiRNA-221-3p had a decrease statistically significative in GIV. When seeing the expression of the precursor form of the miR-128-1 and 221 it was seen that in GIV the expression was higher 3.5 times in comparison with GI. In general, in patients that had recurrent tumors that died and in low grade that had recurrence, the miR-124-3-p and miR128-3p always decreased their expression at half when compared to those patients that had no recurrence and that are still alive. In blood serum the expression of miR-221 was low in all cases with respect to patient's serum without cancer; miR-128 was the most expressed compared with miR-124 and -221. In conclusion de low expression of this microRNAs characterize to the GIV astrocytomas and the high expression can be a favourable prognostic factor for the patients.



## 1. INTRODUCCIÓN

En niños los tumores de sistema nervioso ocupan el segundo lugar de incidencia después de las leucemias. En México, los astrocitomas constituyen el 30% de los tumores del SNC, de acuerdo a un estudio realizado en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (Chico-Ponce de León et al, 2006). De todos los tumores intracraneanos que se presentan en los niños, aproximadamente el 60 % son de origen neuroglial (gliomas) y dentro de estos los astrocitomas se presentan con mayor frecuencia (Graham y Lantos, 2002).

En los últimos años los estudios moleculares en los gliomas han permitido la identificación de varias alteraciones moleculares que pueden tener implicaciones diagnósticas y/o pronósticas. Dentro de los astrocitomas la variedad pilocítica es la más frecuente y es considerada de bajo grado. Este tumor muestra de manera constante la duplicación de 7q34 que no se observa en otros tumores del sistema nervioso. La activación anormal de la vía MAPK/ERK (quinasas reguladas por señales extracelulares) es considerada como una de las principales rutas relacionadas con el desarrollo del astrocitoma pilocítico (Jones, 2008).

Los astrocitomas malignos o de alto grado son tumores altamente infiltrativos e invasivos por lo que la búsqueda de mecanismos moleculares relacionados con su fenotipo agresivo y pobre pronóstico es fundamental. Actualmente los marcadores moleculares más importantes en la neuro-oncología son las mutaciones en los genes IDH1/2 (deshidrogenasa del isocitrato) en los astrocitomas difusos y anaplásicos (Hartman, 2009), la metilación del promotor del gen MGMT (metiltransferasa O<sup>6</sup>-metilguanina-DNA) en el GBM (glioblastoma multiforme) (Heigi et al, 2005; Labussiere et al, 2010) y las alteraciones del gen BRAF en el astrocitoma pilocítico (Jones, 2008). Algunos de estos marcadores pueden ser usados en el diagnóstico y pronóstico del paciente, así como en predecir la respuesta al tratamiento. La participación de los microRNAs dentro de estas vías moleculares ha sido el centro de

investigaciones en los últimos años. Varios estudios han analizado el perfil de expresión de microRNAs en el cerebro normal y en los tumores y se ha demostrado su participación en el desarrollo del tumor.

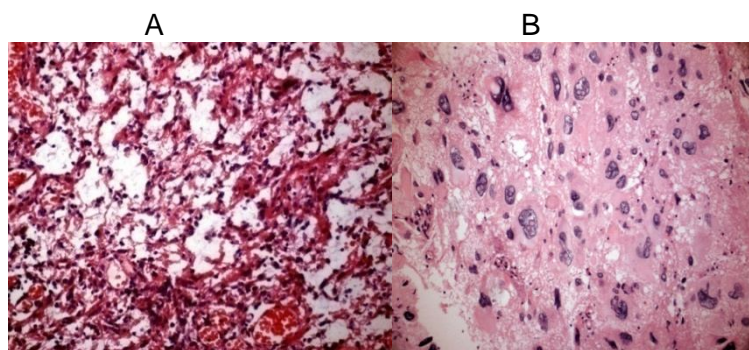
### 1.1. Clasificación de astrocitomas.

El cerebro de los mamíferos está compuesto principalmente por dos tipos de células: las neuronas y las células gliales. Las células gliales forman el principal constituyente del sistema nervioso central (SNC), se clasifican en varios subtipos como astrocitos, oligodendrocitos y microglia. Aproximadamente la mitad de todos los tumores cerebrales primarios surgen de las células gliales y se les denomina gliomas. Los gliomas se nombran de acuerdo al tipo específico de célula que les dio origen. Así tenemos que los astrocitomas derivan de los astrocitos. Los astrocitos presentan cuerpos celulares pequeños con prolongaciones que se ramifican y extienden en todas direcciones. Existen dos tipos de astrocitos, los fibrosos y los protoplasmáticos, ambos proporcionan sostén, son aislantes eléctricos, limitan la diseminación de los neurotransmisores, captan iones de  $K^+$ , almacenan glucógeno y tienen función fagocítica, ocupando el lugar de las neuronas muertas (gliosis de reemplazo) (Graham y Lantos, 2002). La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica por grados a los tumores de SNC estableciendo una escala para determinar la malignidad según las características histológicas del tumor (Tabla 1). De esta forma los astrocitomas se clasifican en cuatro grados:

Tabla 1. Clasificación de astrocitomas en grados, según criterios histológicos establecidos por la OMS (Perry, 2005).

Grado	Designación	Características principales
I	Astrocitoma pilocítico	- Tumor bifásico - Componente quístico y sólido
II	Astrocitoma difuso	- Hiper celular - Núcleos hipercromáticos con atipia moderada
III	Astrocitoma anaplásico	- Aumento en el número de mitosis - Pleomorfismo nuclear
IV	Glioblastoma multiforme	- Necrosis con palizada nuclear - Hiperplasia endotelial

Los astrocitomas que se denominan de bajo grado son el I y II y los de alto grado el III y IV (Kleihues y Cavenee,2000). El astrocitoma grado I ó pilocítico es el glioma más común en niños y adolescentes (más del 75%), disminuyendo su incidencia conforme aumenta la edad del paciente; son lesiones de bajo potencial proliferativo y posibilidad de curación total después de la resección quirúrgica (Fig.1). La lesión por lo general no es fatal, sin embargo existen pocos estudios a largo plazo sobre el seguimiento en el desarrollo de estos tumores en los pacientes pediátricos. El astrocitoma grado II ó difuso: incluye lesiones que por lo general son infiltrantes (de bordes irregulares) y de bajo índice mitótico, pero que recurren y tienden a avanzar a altos grados de malignidad. El astrocitoma grado III ó anaplásico presenta actividad mitótica incrementada, alta capacidad de infiltración y anaplasia (falta de diferenciación). El astrocitoma grado IV ó GBM incluye lesiones con capacidad mitótica elevada que los hace propensos a necrosis (Fig.1). Este tumor puede tener un origen *de novo* en el 95% de los casos o bien evolucionar de un GII ó GIII en el 5% de los casos. Los grados II, III y IV se presentan en niños con una menor frecuencia que en adultos. En estos, aproximadamente el 60% ocurre entre los 20 y 45 años de edad, 30% en mayores de 45 años y 10% en menores de 20 años (Kleihues y Cavenee, 2000; Louis et al, 2007).



**Figura 1.** Patrón histológico de A) astrocitoma de bajo grado (G1) donde las células se arreglan con un patrón microquístico y B) astrocitoma de alto grado con células pleomórficas y áreas de necrosis (G4). Tinción H y E. 260X.

Existe un gran número de alteraciones genéticas y moleculares que han sido correlacionadas con la tumorigénesis de los astrocitomas. En el astrocitoma pilocítico se ha reportado la amplificación de 7q34 (66%). En el astrocitoma difuso y astrocitoma anaplásico la alteración más frecuente es la mutación de p53. En el GBM la alteración más frecuente es la pérdida de heterocidad en 10q (Germano et al, 2010). Sin embargo, la comprensión de las bases moleculares aún se encuentra en proceso y la investigación de nuevos indicadores moleculares pronósticos (vida libre de enfermedad) y predictivos (respuesta al tratamiento) es la meta primaria para mejorar el manejo clínico de este tipo de tumor. Una de las líneas de investigación actuales va encaminada a determinar el origen de las células tumorales a través de dos mecanismos celulares principales: la pérdida de diferenciación de astrocitos maduros; o la transformación de la población de células troncales neurales (Germano et al, 2010).

En años recientes se ha reconocido el papel de los microRNAs (miRNAs) en la fisiopatología de varios tipos de tumores entre ellos los glioblastomas (Chan et al, 2005). Mediante estudios de microarreglos se reportó un número importante de microRNAs que pueden participar en la formación y propagación de los gliomas (Turner et al, 2010). Así también, se reconoce que el perfil de expresión de algunos microRNAs puede funcionar como un marcador diagnóstico y pronóstico potencial de los pacientes con cáncer (Nicoloso y Calin, 2007; Cho, 2007; Zhi et al, 2010).

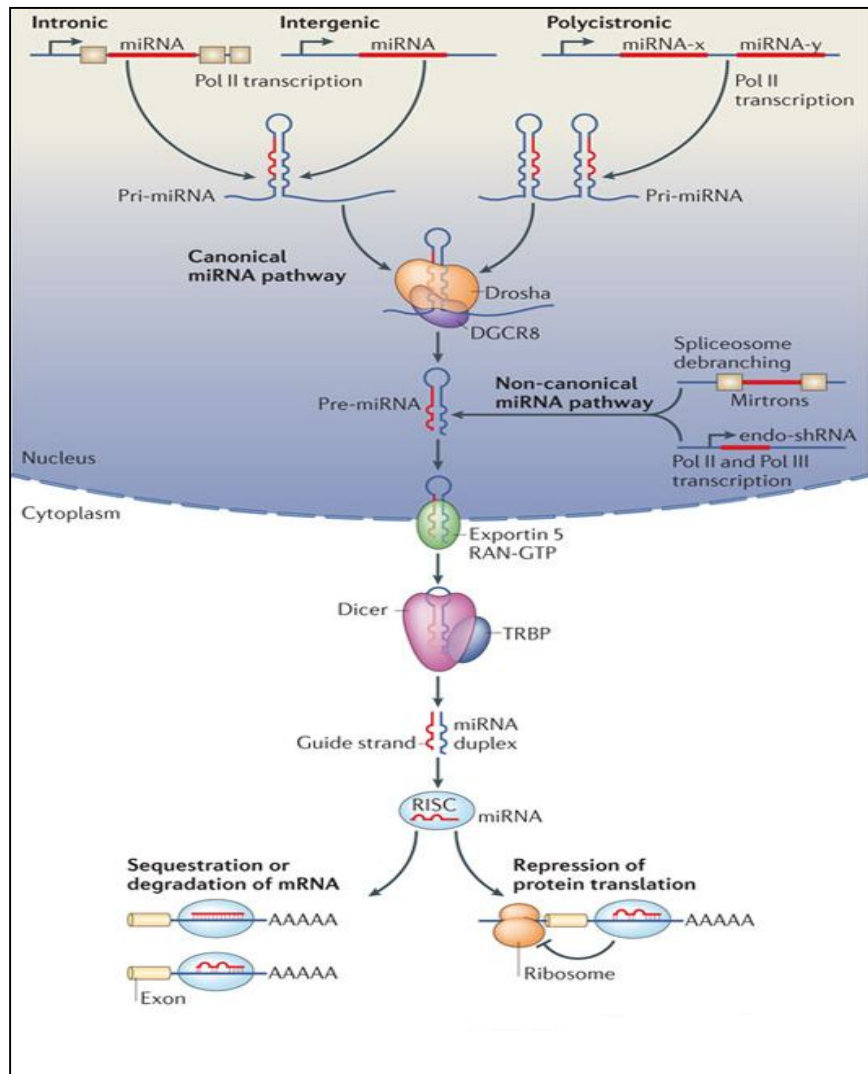
## 1.2. Importancia de los microRNAs

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de 18 a 24 nucleótidos que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Se expresan en un amplio número de organismos como animales, plantas y virus y en cada tipo celular (Mendell, 2005; Zeng, 2009). Se estima que el genoma de los vertebrados codifica más de 1,000 miRNAs diferentes, los cuales regulan la expresión de al menos el 30% de genes (Lewis et al, 2005). La baja astringencia necesaria para una interacción funcional entre miRNA/RNAm da la capacidad a los miRNAs de regular varios mensajeros, además de que la región 3'UTR del RNAm blanco frecuentemente alberga varios sitios de reconocimiento de microRNAs (Huse et al, 2010). Cerca de 1872 miRNAs se han identificado en el genoma humano (<http://microRNA.sanger.ac.uk> versión 20). Este número se ha incrementado rápidamente en los últimos años, sin embargo, poco se conoce acerca de sus blancos específicos y las funciones biológicas que desempeñan en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades. (Cho, 2007; MacFarlane y Murphy, 2010).

## 1.3. Biogénesis

Los miRNAs se transcriben inicialmente como transcritos largos conocidos como miRNAs primarios (pri-miRNA) cuya longitud va de 3 a 4 kilo bases (kb), aunque algunas moléculas pueden medir hasta 10 kb (Saini et al, 2007). Los pri-miRNAs son reconocidos en el núcleo por el complejo compuesto por la enzima RNAsa III Drosha y DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region gene 8, proteína con un dominio de unión a RNA de doble cadena). Este complejo corta la estructura en horquilla denominándose ahora miRNA precursor (pre-miRNA) con una longitud de 60 a 80 nucleótidos. El pre-miRNA es reconocido por la exportina 5 (factor de exportación nuclear) y la proteína nuclear Ran-GTP, ambas transportan el pre-miRNA hacia el citoplasma. La enzima Dicer y TRBP (proteína con dominio de unión a RNA) realizan un segundo corte en la base del tallo-asa y se genera una molécula de RNA de doble cadena de 18 a 24 nucleótidos (Lynam-Lennon et al, 2009). Un complejo

multiproteínico conocido como complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) se asocia con el RNA duplex y separa ambas cadenas. RISC es un complejo compuesto principalmente por Dicer, TRBP (*trans-activating response RNA binding protein 10*, proteína con un dominio de unión a RNA), PACT (proteína de activación) y Ago2 (proteína de la familia Argonauta) (MacFarlane y Murphy, 2010). Ago2 identifica el RNAm blanco basándose en la complementariedad con el microRNA de una sola cadena asociado. Las secuencias reconocidas del RNAm blanco se ubican principalmente en la región 3' no traducida (3'UTR). El miRNA guía a RISC hacia el mensajero blanco inhibiendo su traducción (Fig. 2) (Chang et al, 2009; Zeng, 2009).



**Figura 2.** Biogénesis y función de miRNAs. Los microRNAs pueden localizarse policistónicos, en regiones intergénicas e intrónicos. En la ruta canónica los microRNAs son transcritos por la polimerasa II (Pol II) generando un transcrito de RNA primario (pri-miRNA) dentro del núcleo. La estructura tallo-asa del pri-miRNA es reconocida y cortada por un complejo microprocesador compuesto por Droscha y DGCR8, para producir un microRNA precursor de 60 a 70 nucleótidos de longitud. En la ruta no-canónica, los microRNAs son transcritos directamente como RNAs de horquilla corta (endogenous short hairpin RNAs, endo-shRNAs) o derivan de la edición de los intrones que pueden replegarse dentro de horquillas (mirtrons). El pre-miRNA generado en ambas rutas es exportado al citoplasma a través del poro nuclear por la exportina-5 y RAN-GTP. En el citoplasma es procesado por el complejo formado por Dicer-TRBP (*trans*-activation-response RNA binding protein) generando una molécula de RNA de doble cadena, la cual es separada por una helicasa de RNA. Una de las cadenas del dúplex miRNA/miRNA\* (la cadena guía o antisentido) es incorporada preferencialmente dentro de RISC y guiará el complejo miR-RISC hacia el RNA mensajero que alberga una secuencia complementaria al miRNA. Una vez que el RNAm es reconocido, RISC puede regular la traducción inhibiendo el paso de inicio o elongación o bien degradando el RNAm cuando la complementariedad es completa (Tomado de Rottiers y Näär, 2012).

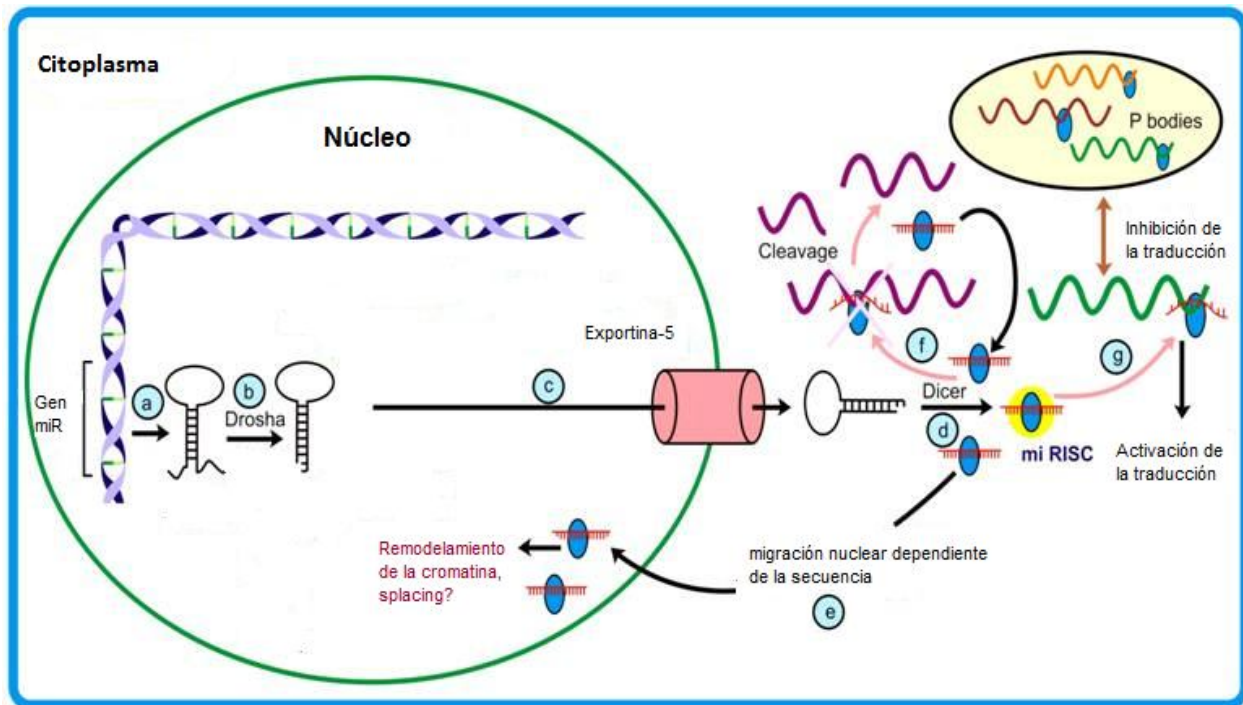
#### 1.4. Complejo miR/RISC-RNAm

El reconocimiento del RNAm blanco se da por la complementariedad de la secuencia denominada "semilla" (nucleótidos del 2 al 8) ubicada en el extremo 5' del microRNA con la secuencia del RNAm blanco. Las secuencias reconocidas del RNAm blanco se ubican en la región 3' no traducida (3'UTR) (60%), en secuencias codificantes (25%), en secuencias de RNA no codificante y en 5'UTR (Rigoutsos, 2009; Chi et al, 2009; Almeida et al, 2011). El grado de complementariedad entre el microRNA y el RNAm determina el mecanismo de silenciamiento. Cuando la complementariedad es del 100% se degrada el RNAm blanco, esto sucede principalmente en plantas. En animales la complementariedad es del 100 % en la región semilla, pero no a lo largo del microRNA (es parcial de manera global), de tal manera que se da un mecanismo de inhibición de la traducción del mensajero blanco (MacFarlane y Murphy, 2010).

El complejo efector encabezado por la proteína Argonauta probablemente interactúa con la maquinaria traduccional para inhibir la síntesis de proteínas al inicio o en el paso de elongación dependiendo posiblemente de la naturaleza del miRNA y del transcrito blanco (Chang et al, 2009; Zeng, 2009). La mayoría de los microRNAs descritos en el humano ejercen su efecto inhibitor en el citoplasma, sin embargo existen algunos microRNAs como miR-29b que posee una secuencia terminal de hexanucleótidos que le permite regresar al núcleo donde posiblemente lleva a cabo sus funciones (Hwang et al, 2007).

Los complejos formados por el microRNA/RISC-RNAm no permanecen indefinidamente en el citoplasma si no que son transportados hacia estructuras de procesamiento citoplásmicas denominadas cuerpos P donde puede ocurrir la degradación del RNAm por desadenilación y corte ("decapping") del 5', o bien es almacenado y posteriormente se separa del complejo represor y del cuerpo P y retorna a la maquinaria traduccional (Fig. 3) (Liu et al, 2005).





**Figura 3.** Biogénesis del microRNA dentro del núcleo (a,b,c), maduración en el citoplasma (e), formación del complejo microRNA-RISC que dependiendo de la secuencia regresará al núcleo (e) o bien se unirá a su RNAm blanco para inhibir la traducción (f) y finalmente los complejos microRNA/RISC-RNAm serán almacenados en los cuerpos-p (p-bodies) donde serán degradados o retornarán a la traducción (g). (Modificado de Liu et al, 2005)

Los microRNAs participan en procesos celulares fundamentales como determinación del linaje celular, apoptosis, proliferación, migración y regulación del ciclo celular, en los que la traducción de genes específicos es altamente precisa y coordinada. Los microRNAs forman redes regulatorias complejas con sus genes blanco, representando mecanismos comunes que han evolucionado en los mamíferos fortaleciendo la regulación genética (Santarpia et al, 2010). A su vez los microRNAs son regulados por oncogenes, genes supresores de tumor, factores de transcripción y mecanismos epigenéticos. En el cáncer estos mecanismos se ven alterados e influenciados además por metilación del promotor, mutaciones genéticas (en el promotor y su secuencia) y defectos en la maquinaria de biogénesis de los miRNAs (Deng et al, 2008; Davis-Dusenbery y Hata, 2010). Cada uno de estos

mecanismos pueden contribuir solos o más probablemente en conjunto para alterar la expresión de los miRNAs en el cáncer (Wu et al, 2007; Deng et al, 2008).

### **1.5. Expresión de microRNAs en cerebro.**

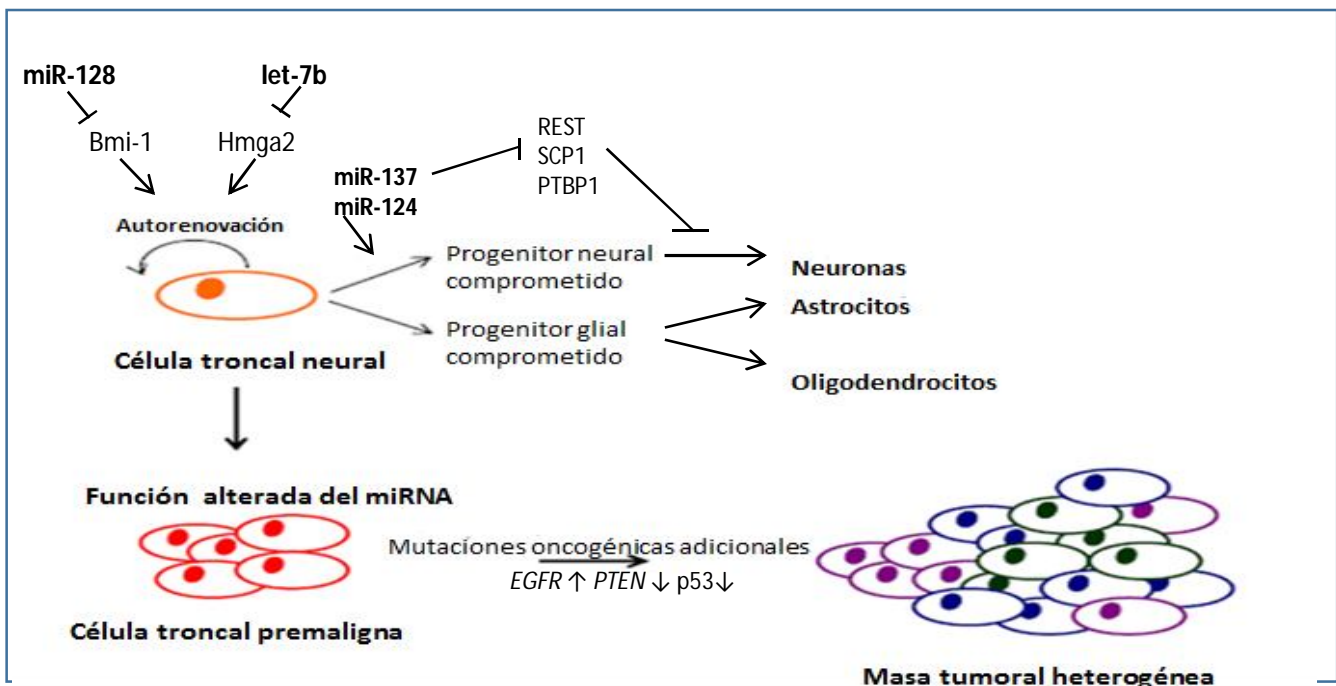
El sistema nervioso central de los mamíferos está controlado de forma importante por mecanismos de regulación genética. Los microRNAs contribuyen a esta regulación, aproximadamente el 70% de los miRNAs identificados hasta el momento son expresados en el cerebro y algunos de ellos son específicos (De Smaele et al, 2010). En estudios recientes se determinó el patrón de expresión de los microRNAs y se mostró que regulan tanto el desarrollo como la función del sistema nervioso (Fernandez et al, 2009; Zeng, 2009).

Una amplia variedad de microRNAs se localizan en subtipos neuronales con el mayor número en la corteza cerebral y cerebelo (Krichevsky et al, 2003; Mehler y Mattick, 2007). En el sistema nervioso central existe una gran cantidad de genes que dan origen a miRNAs y su expresión es diferente según la región anatómica. Los microRNAs específicos de cerebro definidos hasta ahora son: miR-9, miR-124, miR-125, miR-128 y miR-129 (Landgraft et al, 2008). MiR-124 y miR-128 se expresan principalmente en neuronas (Smith et al, 2010). De igual manera el perfil de expresión de los miRNAs en el desarrollo y diferenciación del sistema nervioso de mamíferos es fundamental, ya que se han documentado cambios en su expresión cuando las células troncales embrionarias desarrollan neurogénesis y gliogénesis, lo que sugiere que tienen un importante papel en la diferenciación o determinación del linaje celular (Zeng, 2009).

### **1.6. MicroRNAs y su relación con cáncer**

Calin y colaboradores (2002) fueron los primeros en encontrar evidencia acerca de la relación entre los miRNAs y el cáncer, demostrando que los miR-15 y miR-16 están localizados en una región

mutada, en más de la mitad de las leucemias linfocíticas crónicas de células B (Calin et al, 2002). Estudios posteriores han mostrado que los perfiles de expresión de varios miRNAs están alterados en diversos tipos de tumores como el glioblastoma, adenoma pituitario, cáncer de próstata, carcinoma de mama, carcinoma hepatocelular, carcinoma de pulmón, carcinoma colorectal, de ovario, de tiroides, cervical, linfoma y leucemia linfocítica crónica (Volinia et al, 2006; Nicoloso y Calin, 2007). Los eventos genéticos que guían al desarrollo de tumores en cerebro son desconocidos, sin embargo hay evidencia que sugiere que los gliomas pueden surgir a partir de una subpoblación de células dentro de la masa tumoral, a estas células se les ha denominado “células troncales tumorales” que mantienen su capacidad de renovación y multipotencialidad. Los microRNAs son importantes reguladores del proceso de diferenciación y de la proliferación de las células troncales (Fig. 4) (Wang et al, 2007).



**Figura 4.** Modelo que muestra los efectos de la desregulación de los miRNAs en el desarrollo del glioma. Bajo condiciones fisiológicas normales la expresión de los miRNAs es importante para la inducción de diferenciación en el SNC y evitar la autorenovación de la célula troncal. La pérdida de expresión de los miRNAs puede participar en la formación de células troncales pre-malignas, hiperproliferativas y no diferenciadas, que pueden progresar de un glioma de bajo a alto grado. Mutaciones oncogénicas adicionales pueden facilitar el fenotipo maligno (Modificado de Silber et al, 2009).

## 1.7. Perfil de expresión de miRNAs en astrocitomas

Distintos patrones de expresión de miRNAs se han descrito en astrocitomas de bajo y alto grado incluyendo astrocitoma pilocítico, difuso, anaplásico y glioblastoma multiforme de adultos. En estos tumores los miRNAs participan en la proliferación celular, invasión, angiogénesis y diferenciación (Godlewski et al, 2010; Zhi et al, 2010). Los primeros reportes son muy recientes e iniciaron con la identificación de miRNAs en el GBM en el año 2005. En este tipo de tumor, se describió la sobre-expresión del miR-221 y se propuso como un posible marcador específico; mientras que los miR-128, miR-181a, miR181b y miR-181c se encontraron con baja expresión, lo que probablemente refleja pérdida de expresión asociada a falta de diferenciación en las células tumorales (Ciafrè et al, 2005). En ese mismo año se reportó sobre-expresión de miR-21 en el GBM y en líneas celulares, en comparación con tejido normal. Estos efectos se relacionaron con una disminución de la apoptosis y fenotipo maligno. Por el contrario, la baja expresión de miR-21 promovió la activación de caspasas y la apoptosis (Chan et al, 2005). Posteriormente en otro estudio se identificaron los miR-124 y miR-137 relacionados con la diferenciación neuronal en células troncales, derivadas de un oligodendroglioma de ratón y de un GBM humano. Además, en una línea celular de GBM se observó arresto en el ciclo celular después de transfectar miR-124 y miR-137. Lo que sugiere que miR-124 y miR-137 pueden ser moléculas blanco para el tratamiento de esta enfermedad (Silber et al, 2008). Estos estudios sugieren que los miRNAs participan en múltiples procesos biológicos característicos del GBM como diferenciación celular, proliferación, invasión, apoptosis y angiogénesis. Debido a que los miRNAs pueden promover o limitar el desarrollo del tumor se pueden considerar con potencial oncogénico o con actividad supresora de tumor. En el origen de los astrocitomas, como en el de varios tipos tumorales, los procesos de diferenciación y proliferación se encuentran muy alterados, razón por la que se eligió un grupo de microRNAs que participan en estos procesos. Los miRNAs analizados en este estudio y que son considerados en la literatura con potencial oncogénico son miR-9, -15b, -21, -221 y los que tienen

actividad supresora de tumor son miR-124, -128, -137 y -181. A continuación se describe cada uno de ellos.

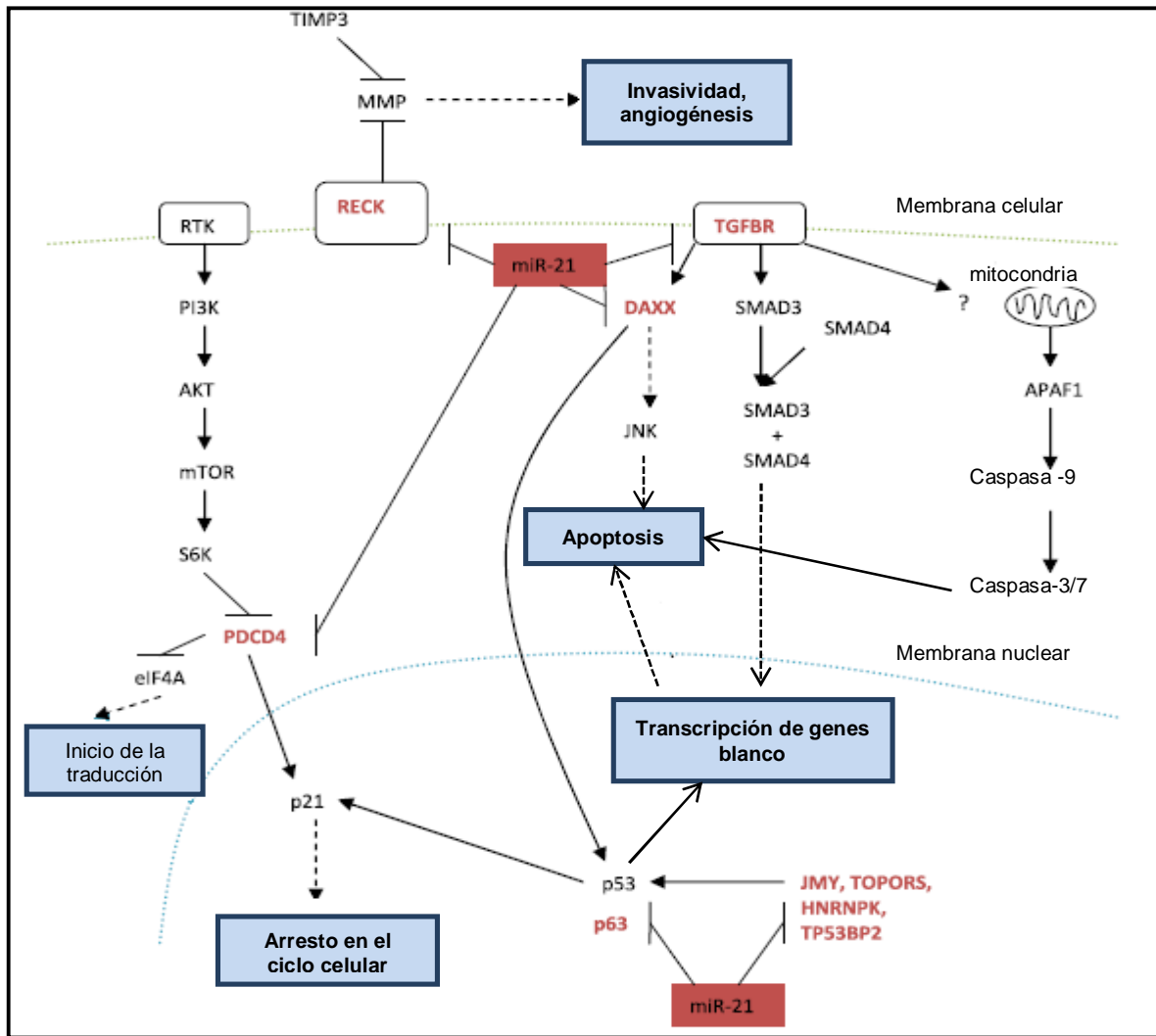
## **1.8. MicroRNAs con potencial oncogénico: función antiapoptótica y proliferativa**

### **1.8.1. MiR-9**

El gen que codifica a miR-9 se localiza en el genoma en tres regiones diferentes, miR-9-1 se localiza en el cromosoma 1q22, miR-9-2 en 5q14.3 y miR-9-3 en 15q26.1. Este miRNA se expresa casi exclusivamente en cerebro y es un mediador de la neurogénesis, en cerebro fetal está altamente expresado en comparación con cerebro de adulto (Godlewski et al, 2010). Nass y colaboradores estudiaron la expresión de varios miRNAs en tumores primarios de cerebro y tumores de cerebro metastásicos mediante microarreglos y qRT-PCR, y observaron que el miR-9/9\* se encontraba sobreexpresado principalmente en tumores primarios de cerebro, en comparación con tumores metastásicos de cerebro y concluyen que es posible distinguir entre ambos tipos de tumores con alta confiabilidad (Nass et al, 2008). Hasta el momento sólo se ha descrito como uno de sus blancos al factor de transcripción REST (Packer et al, 2008).

### 1.8.2. MiR-21

El gen que codifica para el miR-21 se encuentra localizado en el cromosoma 17q23.1. La sobre-expresión de este miRNA se describió por primera vez en el GBM y posteriormente en otros tipos de tumores sólidos (Chan et al, 2005; Volinia et al, 2006). Chan y colaboradores estudiaron la expresión de miR-21 en pacientes con GBM y en líneas celulares de glioma y observaron que en los tejidos la expresión de miR-21 se encontraba incrementada de 5 a 100 veces en comparación con tejido cerebral no neoplásico. Existen varios blancos importantes que contribuyen a su acción antiapoptótica y proliferativa y que participan en las rutas supresoras de tumor de p53, TGF- $\beta$  (factor de crecimiento transformante  $\beta$ ) y ruta apoptótica mitocondrial (Papagiannakopoulos et al, 2008; Novakova et al, 2009; Silber et al, 2009). En un estudio reciente desarrollado con 124 muestras de astrocitomas de alto y bajo grado, encontraron que miR-21 es más sensible para predecir el desarrollo clínico de astrocitomas de alto grado, debido a que observaron una mayor expresión en tumores de alto grado y una menor supervivencia en comparación con astrocitomas de bajo grado (Zhi et al, 2010). Es evidente que la sobre-expresión de miR-21 en astrocitomas está relacionada con la activación de múltiples rutas oncogénicas (Zhou et al, 2010). Muchos otros estudios han confirmado la sobre-expresión de este miRNA en los cuatro grados de astrocitomas y en otros tumores del SNC como oligoastrocitoma, oligodendroglioma y meduloblastomas siendo mayor su expresión en el glioblastoma multiforme (Ciafrè et al, 2005; Gabriely et al, 2008; Malzkorn et al, 2009) (Fig. 5).

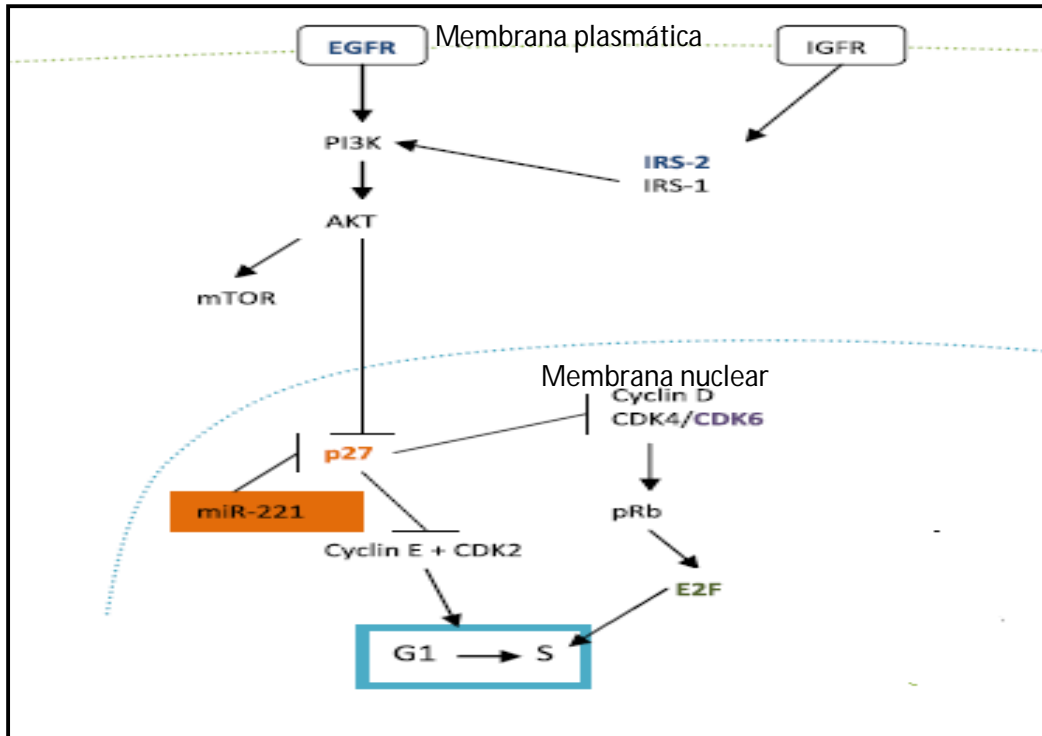


**Figura 5.** Rutas de señalización influenciadas por miR-21 en células de glioblastoma. MiR-21 inhibe la traducción de RECK, TGFBR, DAXX, PDCD4, p63, JMY, TOPORS, HNRNPK y TP53BP2. De esta forma miR-21 regula diversos procesos como apoptosis y ciclo celular. (Modificado de Novakova et al, 2009).

### 1.8.3. MiR-221/222

MiR-221/222 se localizan en el cromosoma Xp11.3 y se encuentran sobre-expresados en astrocitomas, su expresión es co-regulada y tienen la misma especificidad de blancos debido a que la región denominada “semilla” es la misma en ambos casos (Lewis et al, 2005). Ciafrè y colaboradores mediante microarreglos de expresión y northern blot analizaron 9 muestras de pacientes con GBM y 10 líneas celulares de glioma e identificaron al miR-221 como uno de los miRNAs con mayor sobre-expresión en comparación con valores obtenidos en cerebro normal y muestras de tejido sano adyacentes al tumor (Ciafrè et al, 2005). Gillies y colaboradores describieron a p27<sup>kip1</sup> como un blanco directo de miR-221/miR-222. P27<sup>kip1</sup> es una proteína reguladora del ciclo celular, su función es inhibir a la cinasa dependiente de ciclina (CDK), de tal forma que hay un arresto en el ciclo celular en la fase G1, evitando la proliferación celular (Gillies y Lorimer, 2007) (Figura 5). Medina y colaboradores estudiaron la participación de varios microRNAs en la regulación del ciclo celular y observaron que la expresión de miR-221 y miR-222 se incrementó en células humanas quiescentes que son estimuladas para proliferar. Predijeron y comprobaron dos blancos: p27 y p57, ambos suprimen el crecimiento celular porque inhiben cinasas dependientes de ciclina. La sobre-expresión de estos miRs está estrechamente relacionada con el control del ciclo celular, que asegura la supervivencia de la célula por una competencia coordinada entre la entrada en la fase S y rutas de señalización del factor de crecimiento que estimula la proliferación celular (Medina et al, 2008). La alta expresión de miR-221 en astrocitomas de alto grado y en líneas celulares, fuertemente lo implican como un probable candidato de marcador tumoral específico (Conti et al, 2009) (Fig. 6).





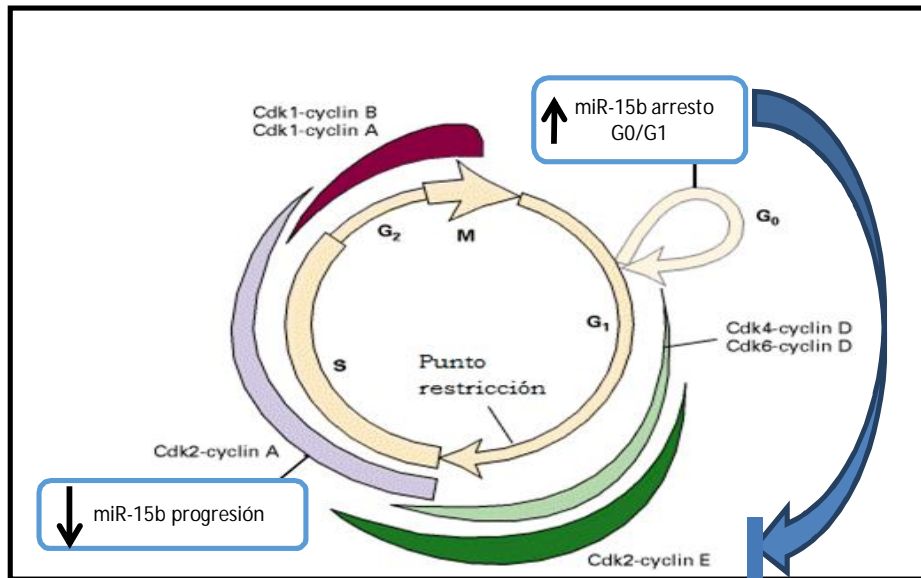
**Figura 6.** El oncogén miR-221 promueve la progresión del ciclo celular debido a que inhibe la traducción del supresor de tumor p27<sup>kip1</sup>, cuya disminución ocasiona la expresión de CDK y con ello la progresión del ciclo celular. (Modificado de Novakova et al, 2009).

## 1.9. MicroRNAs supresores de tumor: diferenciación neural y proliferación

### 1.9.1. MiR-15b

Se localiza en el cromosoma 3q25.33. Xia y colaboradores identificaron un panel de miRNAs expresados diferencialmente en tejidos de glioma. Uno de los miRNAs desregulados fue miR-15b. Posteriormente identificaron sus blancos potenciales siendo CCNE1 (proteína relacionada con la transición del ciclo celular de G1/S) uno de ellos. Se analizaron los niveles de expresión del RNAm de CCNE1 en las líneas celulares después de la transfección con miR-15b exógeno y el antisentido de miR-15b, y observaron que los niveles permanecieron sin cambios. Sin embargo, los niveles de proteína de CCNE1 fueron marcadamente reducidos después de la transfección con el miR-15b

exógeno y se incrementaron después de transfectar el antisentido de miR-15b, estos resultados sugirieron que CCNE1 es un blanco potencial. La sobre-expresión de este miRNA causa arresto en el



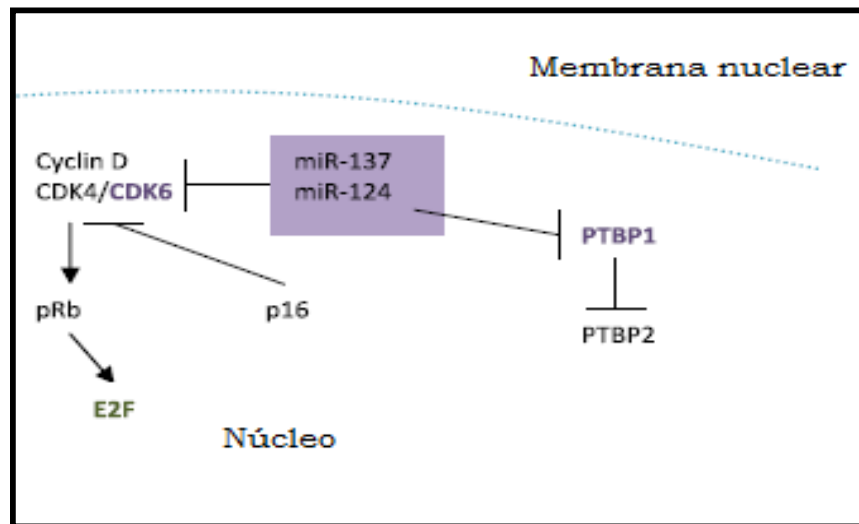
ciclo celular en la fase G0/G1, mientras que su inhibición induce disminución de la población celular en G0/G1 y por consiguiente un aumento en la fase S (Xia et al, 2009) (Fig.7).

**Figura 7.** MiR-15b regula la progresión del ciclo celular porque tiene como blanco a la ciclin E. La sobre-expresión de miR-15b causa arresto del ciclo celular en la fase G0/G1, mientras que la baja expresión causa disminución en la población de células en G0/G1 y aumento en la fase S.

### 1.9.2. MiR-124

Existen tres genes que codifican para el miR-124 y se localizan en diferentes regiones: miR-124-1 se localiza en el cromosoma 8p23.1, miR-124-2 que se localiza en el 8q12.3 y miR-124-3 en el 20q13.33. Es el miRNA más abundante y específico de cerebro, durante la diferenciación neural se expresa principalmente en neuronas (Godlewski et al, 2010). Se considera como un supresor de tumor débilmente expresado en astrocitomas anaplásicos y GBM, en relación al tejido cerebral no neoplásico. A este respecto, Silber y colaboradores estudiaron la expresión de varios miRNAs durante la diferenciación de células troncales neurales de adulto, y observaron que miR-124 incrementó su

expresión 8 veces, a diferencia de lo que ocurre en tumores de alto grado, donde su expresión disminuye. En este mismo estudio determinaron también que miR-124 puede inducir diferenciación e inhibir la proliferación de células troncales de glioblastoma al inhibir a CDK6 (ciclina 6 dependiente de cinasas) la cual tiene como función promover el progreso del ciclo celular (Silber et al, 2008) (Fig.8).

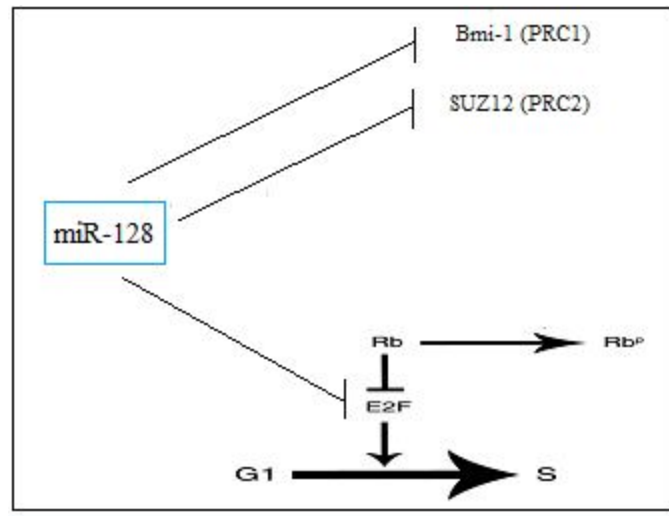


**Figura 8.** MiR-124 y miR-137 tienen como blanco a CDK6 el cual es un regulador del ciclo celular y la diferenciación. PTBP1 también es uno de sus blancos y está relacionado con el “splicing” alternativo (Modificado de Novakova et al, 2009).

### 1.9.3. MiR-128

MiR-128-1 se localiza en el cromosoma 2q21.3 y miR-128-2 en 3p22.3. Es un miRNA específico de cerebro en donde se encuentra enriquecido. En cambio en gliomas y líneas celulares de glioma su expresión disminuye (Ciafré et al, 2005, Godlewski et al, 2008; Zhang et al, 2009; Conti et al, 2009). Zhang y colaboradores estudiaron la expresión de miR-128 en astrocitomas GII, GIII y GIV y en líneas celulares; y observaron que disminuye progresivamente conforme aumenta el grado de tumor. Sus características supresoras de tumor fueron evidenciadas al transfectar miR-128 en líneas celulares de glioma observando inhibición en la proliferación celular (Zhang et al, 2009). Godlewski y colaboradores comprobaron la baja expresión de miR-128 en gliomas y en las líneas celulares y validaron a Bmi-1

como uno de sus blancos relacionado con diferenciación celular y auto renovación. MiR-128 constituye un blanco biológico importante contra las “células troncales tumorales” que son características y parte del origen del glioma (Godlewski et al, 2008) (Fig 9).



**Figura 9.** MiR-128 tiene como blancos principales a Bmi, SUZ12 y E2F. PRC1 y PRC2 codifican componentes del Complejo de Represión Polycomb (PRC2) como son Bmi-1 y SUZ2 los cuales reprimen la transcripción a través de modificaciones de la cromatina. MiR-128 también inhibe al factor de transcripción E2F el cual activa genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Modificado de Germano et al, 2010).

#### 1.9.4. MiR-137

Se localiza en el cromosoma 1p21.3. Silber y colaboradores estudiaron la expresión de varios miRNAs durante la diferenciación de células troncales neurales de adulto y observaron un incremento de 24 veces de miR-137. Este miRNA se considera como un potente factor antiproliferativo y pro-diferenciador celular, con actividad supresora de tumor en los gliomas, y puede ser de relevancia terapéutica (Godlewski et al, 2010). En astrocitomas de alto grado, la expresión de miR-137 disminuye. Uno de sus blancos validados mediante el sistema reportero luciferasa es CDK6, el cual regula la progresión del ciclo celular y la diferenciación, sugiriendo que miR-137 media la inhibición de CDK6, lo

que puede en parte provocar la disminución de sus niveles la proliferación y diferenciación de células de GBM (Silber et al, 2008) (Fig.8).

### **1.9.5. MiR-181**

La familia miR-181 está conformada por miR-181a localizado en 9q33.3, miR-181b en 1q32.1 y miR-181c localizado en 19p13.13; miR-181a y miR-181b se encuentran enriquecidos en cerebro normal. Ciafrè y colaboradores, estudiaron el perfil de expresión en pacientes con glioblastoma encontrando una baja expresión de miR-181a, miR-181b y miR-181c en el 20 al 30 % de los casos. En líneas celulares también se observó una baja expresión siendo miR-181a el que tuvo la más baja, seguido de miR-181b. En este caso la baja expresión se correlacionó con la falta de diferenciación de las células tumorales. De igual forma Shi y colaboradores estudiaron una pequeña serie de gliomas grado II, III y IV y observaron baja expresión de miR-181a y miR-181b asociada con el grado de tumor. También transfectaron líneas celulares de glioma con ambos miRNAs y observaron inhibición del crecimiento, inducción de apoptosis e inhibición de la invasión, dichos efectos fueron más evidentes con miR-181b (Shi et al, 2008). Conti y colaboradores estudiaron la expresión de miR-181 en diferentes grados de astrocitoma, desde astrocitoma difuso grado II hasta el GBM GIV y observaron la baja expresión de miR-181b en todos los grados, sin embargo los niveles de expresión de miR-181a y miR-181c fueron similares al cerebro normal (Conti et al, 2009). Zhi y colaboradores, estudiaron un total de 124 astrocitomas desde GI a GIV y encontraron bajos niveles de miR181b que se asociaron con baja supervivencia. Los autores también mencionan que miR-181b es más sensible para predecir el pronóstico clínico de pacientes con astrocitomas de bajo grado. Estos resultados sugieren que miR-181 puede mantener el estado de diferenciación en células de cerebro normal por lo que su disminución induciría la pérdida de diferenciación de las células tumorales. La identificación de las moléculas blanco puede proporcionar información sobre los mecanismos moleculares mediante los cuales estos miRs

participan en la gliomagénesis (Zhi et al, 2010). En la tabla 2 se describen algunos microRNAs de relevancia en astrocitomas de adulto y que fueron estudiados en este trabajo.

**Tabla 2.** Expresión de microRNAs en cerebro normal y en astrocitomas de adulto, sus funciones y blancos predichos.

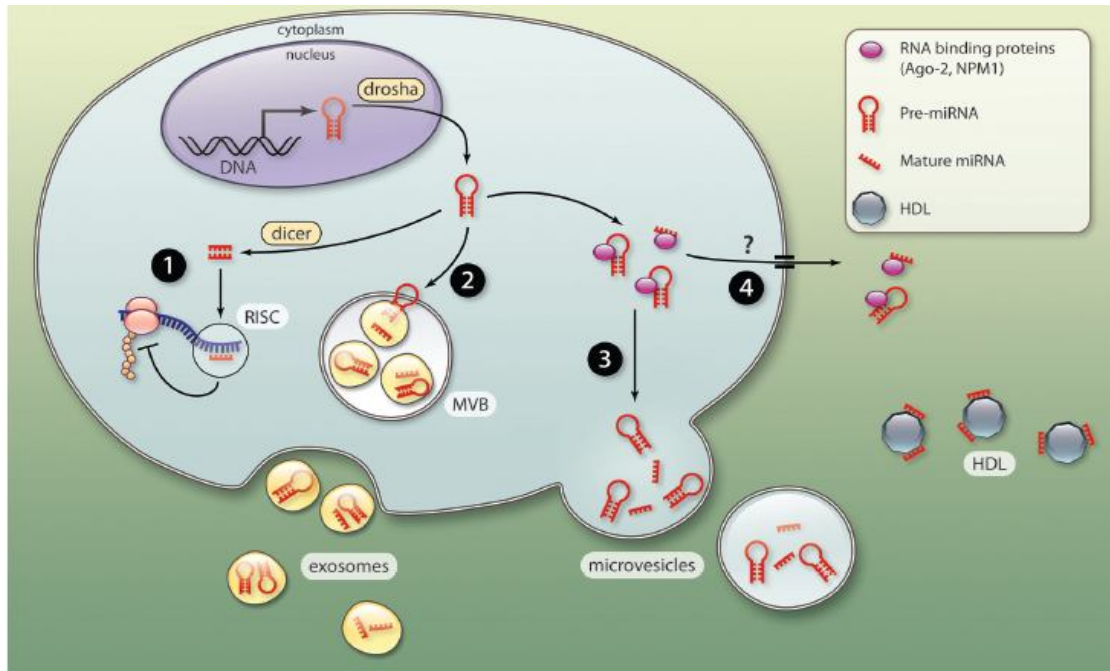
miRNA	Cerebro normal	Tipo de glioma y expresión	Función biológica Oncogén/supresor tumor	Número blancos posibles
miR-9	Abundante	GIV alta	Diferenciación <b>Oncogén</b>	683
miR-21	Basal	G II, III, IV alta	Proliferación y anti-apoptosis <b>Oncogén</b>	210
miR-221	Basal	G II,III, IV alta	Proliferación: ciclo celular <b>Oncogén</b>	307
miR-15b	Basal	GIV baja	Regula progresión de ciclo celular (arresto en G0/G1) <b>Supresor de tumor</b>	968
miR-124	Abundante, específico	G III, IV baja	Diferenciación, proliferación: ciclo celular <b>Supresor tumor</b>	1299
miR-128	Abundante, específico	G II, III, IV baja	Proliferación: ciclo celular <b>Supresor de tumor</b>	785
miR-137	Abundante	Grado III y IV baja	Induce diferenciación, inhibe proliferación <b>Supresor de tumor</b>	468
miR-181a	Abundante	G II, III, IV, baja	Induce apoptosis, inhibe invasión y crecimiento <b>Supresor de tumor</b>	892

### 1.10. Expresión de microRNAs en suero

Una de las metas dentro del estudio del cáncer es el desarrollo de pruebas no invasivas para el diagnóstico y seguimiento de los pacientes, por tal motivo existe un gran interés en la detección de ácidos nucleicos circulantes en suero y plasma. El suero y el plasma contienen una gran cantidad de miRNAs estables, pese al alto contenido de ribonucleasas en el plasma. Esta estabilidad puede estar dada por encontrarse dentro de los exosomas, organelos derivados de los endosomas, por modificaciones químicas o por asociarse con complejos de proteínas como RISC (Lodes et al, 2009; Cortez y Calin, 2009). Lawrie y colaboradores en el 2008 reportaron el primer estudio sobre miRNAs en suero de pacientes con linfoma y encontraron que los niveles de miR-155, miR-210 y miR-21 fueron más altos que los encontrados en sueros control de pacientes sin linfoma. Además, asociaron la alta expresión de miR-21 con un mejor pronóstico. Estos resultados fueron consistentes con resultados previos en material de biopsias de pacientes con linfoma, en donde los niveles altos de miR-21 se asociaron con mejor pronóstico (Lawrie et al, 2008). Chen y colaboradores detectaron y secuenciaron 100 miRNAs en suero de sujetos sanos, de igual forma detectaron miRNAs en pacientes con cáncer, reportando patrones de expresión específicos del tipo tumoral. Las neoplasias estudiadas fueron cáncer de pulmón, cáncer colorectal y una enfermedad no tumoral como la diabetes. En este estudio distinguieron los miRNAs en suero de otras especies de nucleótidos pequeños como tRNA o fragmentos de RNA degradados, concluyendo que los miRNAs son la principal fracción presente en el suero (Chen 2008). Uno de los primeros estudios realizados en suero de pacientes con astrocitomas, es el de Skog y colaboradores (2008) en el que reportan que las células tumorales del glioblastoma, liberan microvesículas conteniendo microRNA, RNAm y proteínas angiogénicas. Las células tienen la capacidad de encapsular algunos de sus constituyentes moleculares en estructuras esféricas rodeados por la membrana plasmática denominadas microvesículas. Este estudio lo realizaron a partir de cultivos primarios del tejido tumoral del paciente, y determinaron que las microvesículas liberadas por una célula tumoral, son incorporadas dentro de una célula normal y el RNAm recibido por la célula es traducido

generando una proteína funcional. Un total de 11 miRNAs maduros característicos de los gliomas fueron detectados en la célula donadora. De igual forma, en las muestras de suero de los pacientes, se detectaron microvesículas conteniendo miRNAs, siendo el miR-21 el más abundante (Skog et al, 2008). Lodes y colaboradores mencionan que es importante considerar que el perfil de expresión de miRNAs en suero no corresponde directamente con los perfiles encontrados en los tejidos, debido a los posibles mecanismos de liberación de miRNAs dentro de la circulación (lisis de células o liberación de exosomas), por lo que es importante su comparación con los niveles de expresión de suero de individuos sin cáncer (Lodes et al, 2009). Estos resultados indican que los pacientes con cáncer presentan niveles elevados de exosomas en el plasma, derivados del tumor en comparación con los controles. Aunque las células normales pueden contribuir a la población de exosomas en la circulación periférica, la fuente primaria de exosomas circulantes en pacientes con cáncer se origina del tumor. Además, el RNA y miRNAs contenidos en los exosomas pueden afectar procesos biológicos en la célula receptora. Sin embargo, se conoce poco acerca del mecanismo por el cual los miRNAs son generados en el plasma y el impacto biológico de estas moléculas en sitios distantes del cuerpo. En la figura 10 se ejemplifican las posibles rutas que utilizan los miRNAs para entrar a la circulación sanguínea, así como su entrada a otras células (Cortez y Calin, 2009). Kroh y colaboradores analizaron los miRNAs circulantes en suero y plasma a través de la técnica de RT-qPCR y hacen énfasis en la importancia que tiene la preparación de la muestra, el diseño experimental, el control de calidad de RNA y controles de normalización (Kroh et al, 2010). El descubrimiento de los miRNAs en suero abre la posibilidad de utilizarlos como biomarcadores en diversas enfermedades.





**Figura 10.** Posible ruta de transporte de los miRNAs en el suero. **1.** El pre-miRNA es procesado en el citoplasma por Dicer y la molécula de RNA de doble cadena es separada por una helicasa de RNA. Una de las bandas del dúplex miRNA/miRNA\* es incorporada dentro de RISC y guiará el complejo miR-RISC hacia el RNAm. **2.** Los pre-miRNAs o los microRNAs maduros pueden incorporarse dentro de exosomas (estructuras que se originan del endosoma) y liberarse cuando los cuerpos multivesiculares (MVB) se fusionan con la membrana plasmática. **3.** Pueden liberarse dentro de microvesículas y **4.** Pueden atravesar la membrana y encontrarse libres en la circulación asociados con lipoproteínas de alta densidad (HDL) o bien unidos a proteínas de unión a RNA como Ago-2. El mecanismo de liberación de los complejos microRNA-proteínas no es bien conocido, así como la proporción de pre-miRNAs y miRNAs maduros en los diferentes compartimentos extracelulares (Tomado de Creemers et al, 2012).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tumores de sistema nervioso representan una enfermedad tumoral especial no solo por su agresividad, sino también por su localización que hace más difícil cualquier tipo de diagnóstico e intervención terapéutica. A nivel mundial el astrocitoma es el tumor intracraneano más frecuente en la edad pediátrica, en nuestro país se mantiene esta tendencia con una prevalencia del 32 %, seguido por los meduloblastomas con el 19 % y craneofaringiomas con el 11 % (Chico-Ponce de León et al, 2007). Los astrocitomas de bajo grado son los más comunes y tienen una sobrevida a cinco años cercana a 90 %, en cambio los astrocitomas de alto grado se presentan en estadios clínicos avanzados con una sobrevida a 5 años de 15 al 35 % (Qaddoumi et al, 2009). La necesidad de proporcionar un tratamiento efectivo a los pacientes pediátricos con este tipo de tumores, aunado al desarrollo de la medicina genómica y epigenómica ha permitido describir vías moleculares en los diferentes tipos de gliomas pediátricos. Un mecanismo de regulación post-transcripcional poco explorado y que participa en el desarrollo de estos tumores es el ejercido por los microRNAs. En tumores de adulto hay una gran cantidad de estudios al respecto, pero en pacientes pediátricos los estudios son escasos.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La biología molecular de los gliomas pediátricos ha sido poco estudiada a diferencia de lo que se ha evidenciado en los gliomas de adultos, las características moleculares y los mecanismos biológicos que originan estas neoplasias son distintos entre ambos grupos (Antonelli et al, 2010; Navis et al, 2010). Los hallazgos encontrados en la literatura hasta el momento dejan claro que la expresión desregulada de miRNAs participa en la tumorigénesis en varios tipos de tumores como el GBM en adultos. En tumores de pacientes pediátricos la información es escasa, pero relevante, por un lado está el estudio de Ho y colaboradores quienes identificaron un grupo de miRNAs expresados de manera diferencial entre astrocitomas pilocíticos y cerebro normal (Ho et al, 2013). En astrocitomas de alto grado, Miele y colaboradores describieron un grupo de miRNAs (miR-17-92) que se encuentran sobre-expresados en pacientes pediátricos en comparación con adultos (Miele et al, '2013). Por otro lado, en el suero de pacientes con GBM, se han detectado microvesículas con miRNAs y proteínas. En tumores de bajo grado pediátricos no se ha evaluado en suero la presencia de microRNAs. La posible cuantificación de microRNAs en suero los convierte en marcadores tumorales potenciales (Skog et al, 2008). Con métodos de biología molecular y celular, es posible generar información sobre la relación que tienen los miRNAs en estos tumores, contribuyendo a entender los procesos celulares que se alteran en estas patologías y distinguir otras características de malignidad en tumores de bajo y alto grado.

### 4. HIPÓTESIS

En astrocitomas pediátricos el nivel de expresión de los microRNAs bajo estudio permitirá diferenciar los tumores en bajo y alto grado.

## 5. OBJETIVOS

### General

Determinar el perfil de expresión de un grupo de miRNAs presentes en astrocitomas de bajo grado (G I, II) y en astrocitomas de alto grado (G III, IV) en tumores de pacientes pediátricos.

### Particulares

1. Identificar el perfil de expresión de los miRNAs miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p en tejido de pacientes con astrocitomas de alto y bajo grado.
2. Identificar el perfil de expresión de los pre-miRs-128-1 y 221 en tejido de pacientes con astrocitomas de GI y GIV.
3. Identificar la presencia de los miRNAs miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p en muestras de suero de pacientes con astrocitomas de bajo y alto grado.
4. Analizar la expresión de los miRNAs miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p en líneas celulares de glioma de alto grado.

## 6. METODOLOGÍA.

### 6.1. Tipo de estudio y características de las muestras.

Estudio bidireccional, longitudinal, comparativo y observacional. Se incluyeron:

- a) muestras tumorales de tejido fijado en formol e incluido en parafina con lesión representativa (70%).
- b) muestras de suero con un volumen mínimo de 0.5 ml.
- c) líneas celulares de astrocitoma.

### 6.2. Tamaño de muestra.

Las muestras fueron tomadas del banco de tejidos del Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) y abarcaron, del año 1994 al 2007. Se integraron los siguientes grupos que también pueden visualizarse en la tabla 3.

- a) 57 muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFIP) de los diferentes grados de astrocitoma (GI-GIV).
- b) Como testigo se incluyeron 13 muestras de cerebro normal (CN) de autopsias de pacientes libres de cualquier tipo de tumor.
- c) Se obtuvieron nueve muestras de suero de siete pacientes con astrocitoma, correspondiendo a cuatro astrocitomas pilocíticos, dos astrocitomas anaplásicos y un GBM. Sólo en dos pacientes con astrocitoma pilocítico se colectó una segunda muestra a los tres meses de resección tumoral.
- d) En el caso de las muestras testigo se incluyeron 10 muestras de suero de pacientes sin cáncer.
- e) cinco líneas celulares: una de astrocitos inmortalizados SVGp12, y cuatro de astrocitomas de alto grado: U373-MG (GIII), T98G (GIII), D54-MG (GIV) y A172-MG (GIV).

**Tabla 3.** Distribución del número de casos estudiados en tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFIP) de pacientes con astrocitomas y en muestras de suero. En el caso de las líneas celulares se incluyeron cuatro de alto grado y una línea control.

Grado	GI	GII	GIII	GIV	Control
FFIP	17	9	16	15	13
Suero	4	0	2	1	10
Líneas celulares	----	----	T98 G U373-MG	A172-MG D54-MG	SVGp12

### 6.3. Extracción de RNA total

La extracción de RNA de las muestras de tejido FFIP se realizó con el kit Recover all FFPE (Ambion, Austin, Texas). A partir de 500 µl de suero se realizó la extracción de RNA total. En las muestras de suero y en las líneas celulares se extrajo el RNA utilizando el reactivo de Trizol (Invitrogen, Carlsbad CA).

### 6.4. Líneas celulares

Las líneas celulares fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, USA). Se utilizaron cuatro líneas de astrocitoma: A172-MG, D54-MG, T98-G y U373-MG mantenidas en medio DMEM/F12 (Invitrogen, Carlsbad CA), suplementado con SFB al 10%, aminoácidos no esenciales al 1% y antibiótico-antimicótico al 1%. La línea de astrocitos inmortalizados SVGp12 se mantuvo en medio MEM, SFB al 10 %, L-Glutamina al 1% y antibiótico-antimicótico. Se mantuvieron en incubación a 37 °C y atmósfera con 5% de CO<sub>2</sub>.

## 6.5. RT-PCR de punto final

De manera inicial se determinó la expresión de los ocho microRNAs en 17 muestras de Grado I y en 15 de GIV. En las muestras de cerebro normal provenientes de autopsias se valoró la expresión de cada miRNA por triplicado. En los astrocitomas y en las líneas celulares se utilizó el U6sn RNA como control constitutivo. En el caso de las muestras de suero se utilizó como control constitutivo el miR-223. La secuencia de los miRNAs fue obtenida utilizando la base de datos miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/>). Los iniciadores se diseñaron usando la fórmula  $T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$ ; y la estrategia para analizarlos por RT-PCR fue según Chen y colaboradores (2005), (Figura 11). Para la retro-transcripción se utilizó un iniciador tallo-asa, agregando en la terminación 3' seis nucleótidos específicos de cada microRNA, los cuales son el complemento reverso de la terminación 3' de cada miRNA. El iniciador en sentido para la PCR es la secuencia específica del miRNA, pero excluye los últimos seis nucleótidos de la terminación 3'. En el extremo 5' se agregó una extensión de 4 a 5 nucleótidos (GC) para aumentar la temperatura de alineamiento. El iniciador antisentido es la secuencia inversa del oligonucleótido tallo-asa. El tamaño del amplificado fue de 60 pb (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Secuencia de iniciadores utilizados para el ensayo RT. Los últimos seis nucleótidos (negritas) representan la secuencia complementaria y reversa de cada microRNA en 3'.

microRNA	Secuencia iniciador tallo-asa
miR-9-1	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACT <b>CATAC</b> 3'
miR-15b	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACT <b>GTAAA</b> 3'
miR-21	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACT <b>CAACA</b> 3'
miR-221-3p	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <b>GAAACC</b> 3'
miR-124-3p	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <b>GGCATT</b> 3'
miR-128-3p	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <b>AAAGAG</b> 3'
miR-137	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <b>CTACGC</b> 3'
miR-181a-1	5' GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGAC <b>ACTCAC</b> 3'
U6 snRNA	5' GTCGTATCC <b>AGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACTGGATACGACAAAATA</b> 3'

**Tabla 5.** Secuencia de iniciadores para PCR. El oligonucleótido sentido (sen) representa la secuencia específica de cada microRNA. El oligonucleótido antisentido (antisen) es la secuencia inversa del oligonucleótido tallo-asa.

microRNA	Secuencia iniciadores
miR-9-1 sen	5'-CGCGCTCTTTGGTTATCTAG-3'
miR-15b-5p sen	5'-CGCGCTAGCAGCACATCATG-3'
miR-21-5p sen	5'-CGCGCTAGCTTATCAGACTG-3'
miR-221-3p sen	5'-CGCGAGCTACATTGTCTGC-3'
miR-124-3p sen	5'-CGCGTAAGGCACGCGGTGA-3'
miR-128-3p sen	5'-CGCGTCACAGTGAACCGGT-3'
miR-137 sen	5'-CGCGCTTATTGCTTAAGAATAC-3'
miR-181a-5p sen	5'-CGCGCAACATTCAACGCTGT-3'
U6 snRNA sen	5'-GCGCGTCGTGAAGCGTTC-3'
antisen	5'-CAGTGCAGGGTCCGAGGTA-3'

## 6.6. Valores de expresión de miRNAs (semicuantitativo):

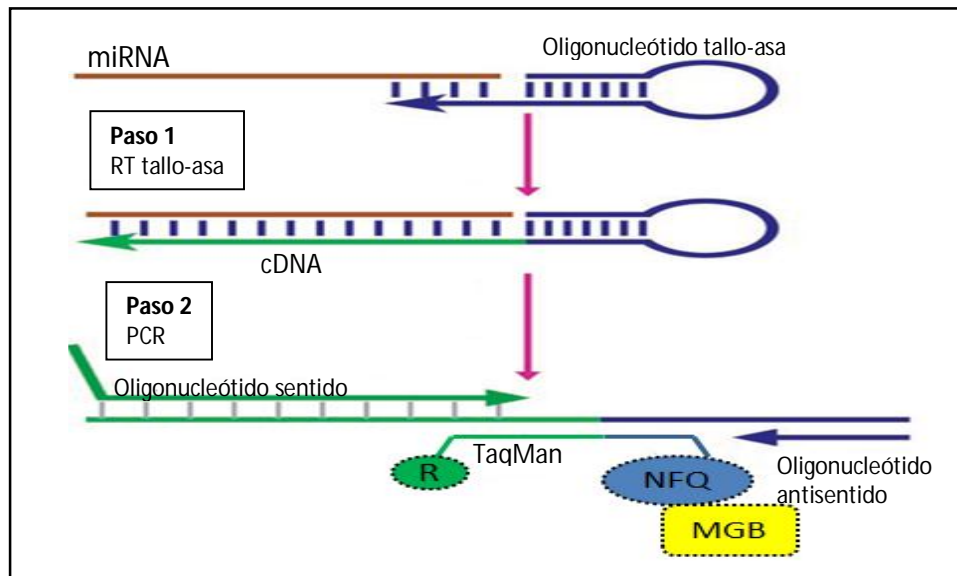
Los productos de la PCR fueron analizados en gel de agarosa al 4 % y teñidos con bromuro de etidio. Se utilizó un marcador de peso molecular de 50 pb (Thermo Scientific, Lafayette CO). Se cuantificó la expresión de cada amplificación mediante el programa computacional Image J, a los 35 ciclos. Previamente, se hicieron evaluaciones desde los 20 hasta los 40 ciclos, de esta manera se determinó 35 como “punto de corte” para el análisis. La expresión de cada miRNA en los tumores se comparó con los valores obtenidos en el cerebro normal. Con estos valores se determinó la media de expresión, la desviación estándar así como el error estándar.

## 6.7. RT-qPCR en astrocitomas GI-GIV

Se determinó la concentración y pureza del RNA total de cada muestra en un Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) y la integridad en un bioanalizador Agilent (Agilent, Palo Alto, CA). Se realizó tratamiento con DNAsa I en todas las muestras y se incluyeron aquellas que tuvieron una



relación de  $A_{260}/A_{280}$  de 1.7 a 2.1. Se utilizaron sondas de hidrólisis (TaqMan) para amplificar los microRNAs miR-124-3p, -128-3p, -221-3p y el gen de referencia RNU48 y U6 snRNA (Fig. 11). Estas determinaciones se llevaron a cabo en 13 muestras de cerebro normal, 17 muestras de tumores de GI, 9 muestras de GII, 16 muestras de GIII y 15 muestras GIV. En el caso de las líneas celulares también se determinó la expresión de miR-124-3p, -128-3p y -221-3p en cuatro líneas de astrocitoma, A172-MG, D54-MG, T98-G y U373-MG, y en la línea SVGp12 de astrocitos inmortalizados. Para la reacción de RT se utilizaron 40 ng de RNA total. Se cuantificaron también las formas precursoras de los microRNAs miR-128-1, miR-128-2 y miR-221, usando SYBR Green en los tumores de GI y GIV exclusivamente. En estos casos se utilizaron 300 ng de RNA total para la reacción de RT. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador ABI 7500 con el siguiente programa de amplificación: 50°C 2min, 95 °C 10 min, posteriormente 40 ciclos a 95 °C 15 segundos (desnaturalización) y 60 °C 1 min (alineamiento/extensión). Se realizó una cuantificación relativa mediante el método Ct comparativo (Delta Ct). La fórmula utilizada fue:  $2^{-\Delta Ct}$ . En el caso de las líneas celulares se utilizó  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .



**Figura 11.** Descripción de la reacción de RT-qPCR. En el paso 1 a partir del oligonucleótido tallo asa se sintetiza el cDNA e incluye en su terminación 3' la secuencia específica de cada microRNA. En el paso 2 se lleva a cabo la reacción de qPCR, donde la sonda TaqMan, secuencia específica del microRNA, hibrida en una región intermedia del producto de cDNA. La sonda incluye en 5' un fluoróforo reportero y en 3' un apagador no fluorescente (NFQ). Reportero (R), non-fluorescent quencher (NFQ), and minor groove binder (MGB).

## 6.8. Registro de datos clínico-patológicos

Se revisaron los expedientes de cada paciente localizados en el Archivo General del HIMFG y se registraron los datos clínico-patológicos como edad, sexo, tipo de tumor, localización, tiempo de supervivencia y porcentaje de resección tumoral. Los datos de expresión fueron analizados agrupando los datos por grado, localización del tumor, recurrencia y supervivencia.

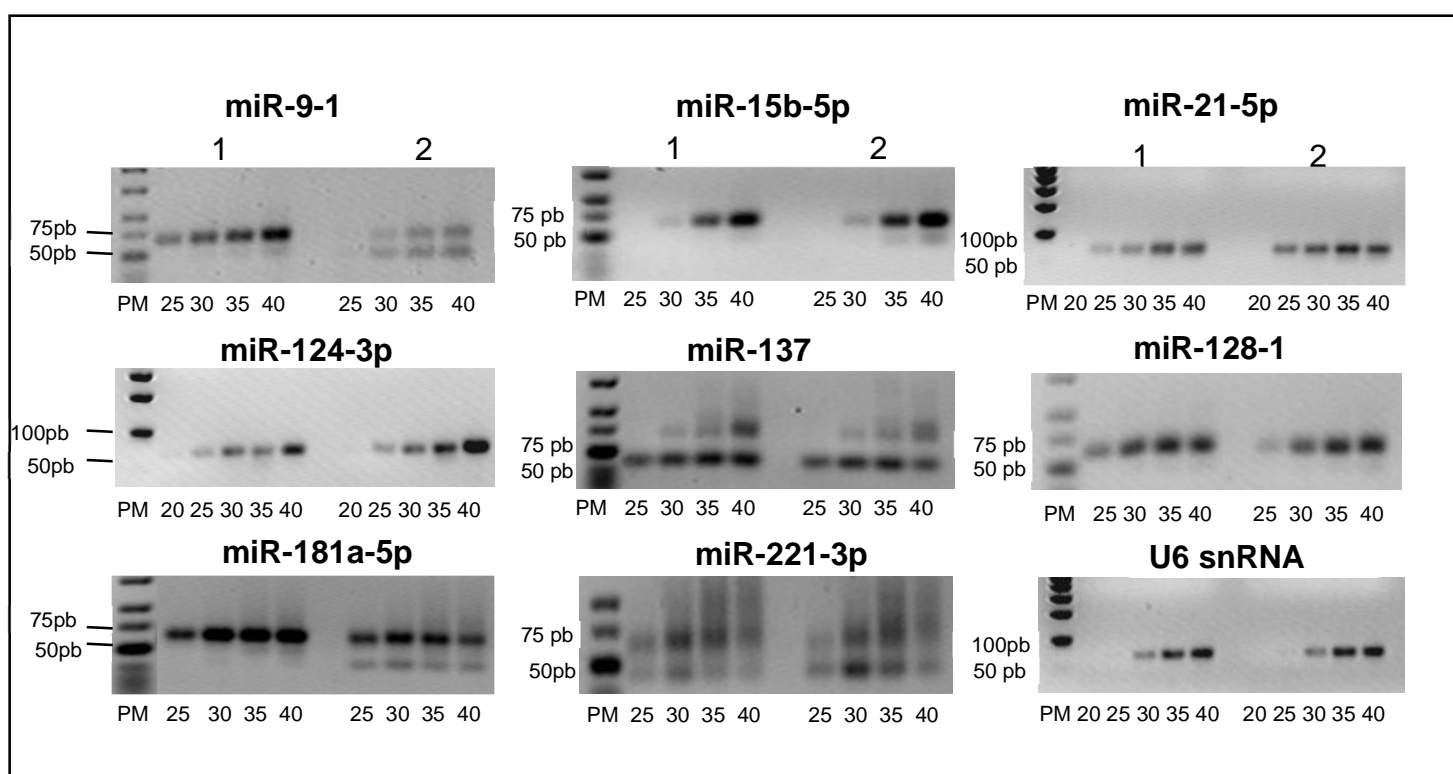
## 6.9. Análisis estadístico

Las diferencias en la medias de la relación de expresión de miR-124-3p, miR-128-1 y miR-221-3p, entre cerebro normal, y entre los diferentes grupos de acuerdo a los datos clínico-patológicos fueron evaluadas mediante la prueba t de Student y ANOVA. Las diferencias fueron significativas cuando el valor de  $p < 0.05$ .

## 7. RESULTADOS

### 7.1. Expresión semicuantitativa de microRNAs en cerebro normal.

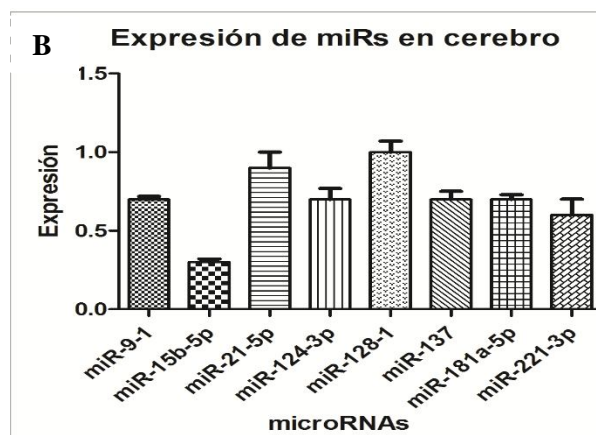
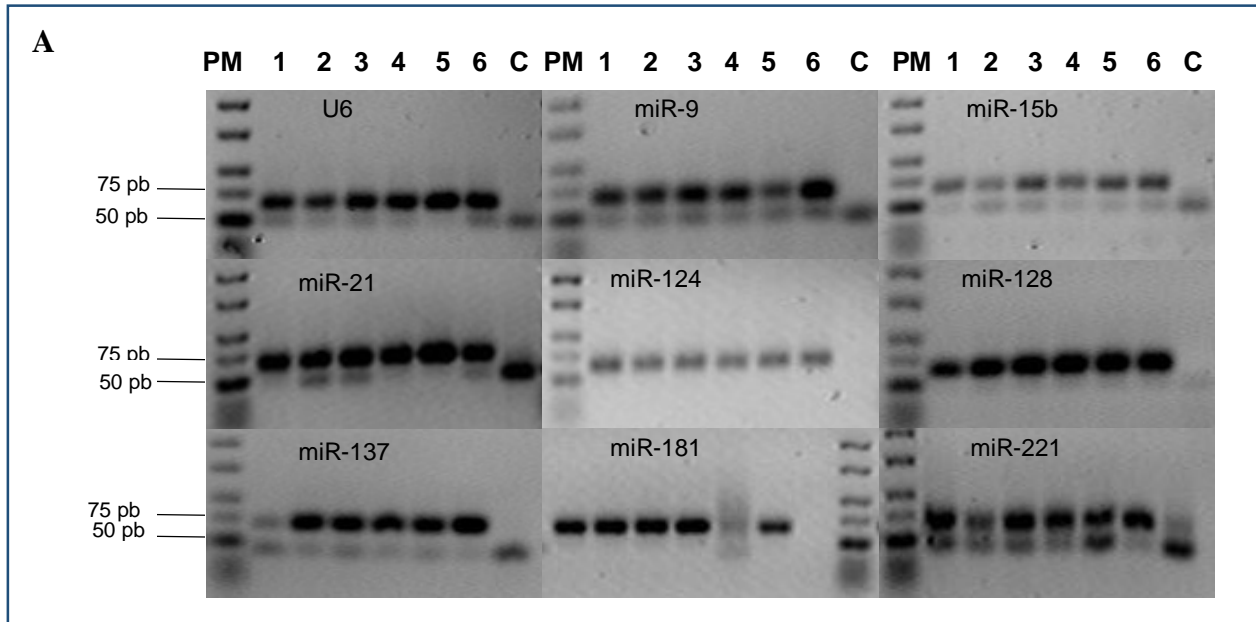
Se determinó la expresión de los microRNAs miR-9-1, miR-15b-5p, miR-21-5p, miR-221-3p, miR-124-3p, miR-128-1, miR-137 y miR-181a-5p en los ciclos 20, 25, 30, 35 y 40 en 6 muestras de cerebro normal. Se determinó el punto de corte el ciclo 35 de amplificación, ciclo en el que se pueden apreciar los cambios en la expresión entre las distintas muestra (Fig. 12).



**Figura 12.** Expresión de miR-9-1, miR-15b-5p, miR-21-5p, miR-124-3p, miR-128-3p, miR-137, miR-181a-5p, miR-221-3p y U6 snRNA en dos muestras de tejido de cerebro normal(CN) en diferentes ciclos de amplificación. Las amplificaciones obtenidas en las cuatro muestras restantes de CN no son presentadas.

Se determinó el ciclo 35 de amplificación como el idóneo para realizar la PCR de tal manera que se realizaron determinaciones por triplicado de los microRNAs antes mencionados en 6 muestras de tejido fijado en formol e incluido en parafina de cerebro normal. En cada repetición se midió por densitometría la intensidad de la banda amplificada y se obtuvo promedio y desviación estándar. Dichos

valores fueron normalizados con el control endógeno U6 snRNA, esto es, se dividió el valor de expresión de cada miRNA entre el valor de U6 snRNA. En el cerebro normal se observó que todos los miRNAs evaluados se encontraron con una expresión menor a 1. El miRNA con mayor expresión fue miR-128-3p ( $1.0 \pm 0.07$ ) y con menor expresión miR-15b ( $0.3 \pm 0.02$ ) (Fig. 13).



**Figura 13. A.** RT-PCR de U6 snRNA y microRNAs en cerebro normal. Se observan los ensayos realizados en seis muestras de cerebro normal (carriles 1-6). PM, peso molecular de 20 pb. C, control negativo. El tamaño del producto amplificado es de 70 pb. Gel de agarosa al 4% y tinción con bromuro de etidio. **B.** Valores de expresión en los microRNAs estudiados en cerebro normal.

## 7.2. Expresión semicuantitativa de microRNAs en astrocitomas de grado I y IV.

La expresión de los ocho miRNAs descrita para cerebro normal, fue analizada mediante PCR de punto final en los ciclos de amplificación 25, 30, 35 y 40. El ciclo 35 se consideró también para determinar su expresión en los astrocitomas GI y GIV. Las comparaciones en la relación de expresión entre el grupo de cerebro normal y los tumores de GI tuvieron una diferencia significativa en los miR-9, miR-15b, miR-21, **miR-124**, **miR-128** y miR-137 (Tabla 5). La comparación de la relación de expresión del grupo de cerebro normal contra GIV tuvo una diferencia significativa con miR-9, miR-124 y **miR-221**. Por último, comparando la relación de expresión del grupo GI contra GIV las diferencias de expresión sólo fueron significativas para el caso del **miR-124**, siendo mayor la expresión en tumores Grado I (Tabla 6).

**Tabla 6.** Expresión de los microRNAs en C.N, GI y GIV. La expresión de cada miRNA se normalizó con respecto

	miR-9	miR-15b	miR-21	miR-124	miR-128	miR-137	miR-181	miR-221
<b>CN</b>	0.7 ± 0.2	0.3±0.02	0.9 ± 0.1	0.7± 0.07	1.0 ±0.07	0.7± 0.05	0.7±0.03	0.6±0.1
<b>GI</b>	<b>*1.5 ±0.6</b>	<b>*1.6 ±0.8</b>	<b>*1.9 ±0.9</b>	<b>*1.8± 0.9</b>	<b>*2.9 ±1.5</b>	1.1 ±0.4	1.3 ±0.6	0.8±0.6
<b>GIV</b>	<b>*1.9±1.5</b>	1.7±0.7	2.2±1.1	<b>**1.1±0.5</b>	1.3±0.4	<b>*1.5±0.8</b>	1.6±0.6	<b>*1.1±.3</b>

a U6 snRNA.

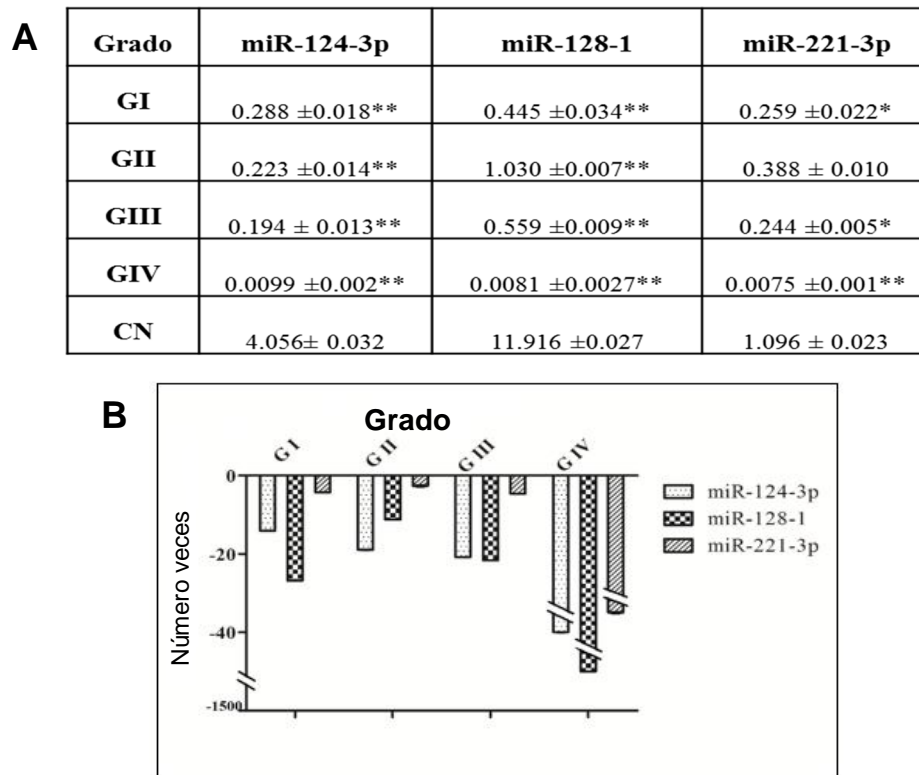
\* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre CN, GI y GIV, \*\*diferencia significativa entre GI y GIV.

A partir de estos resultados se eligieron los tres microRNAs siguientes: miR-124-3p, miR-128-3p y miR-221-3p, y se cuantificó su expresión mediante RT-qPCR en los astrocitomas de los cuatro grados. MiR-124-3p se eligió porque su expresión fue significativamente diferente entre los tumores de GI y GIV, disminuyendo su expresión en GIV, además se considera como un microRNA específico de cerebro, se ha encontrado metilado en células tumorales y puede ser un marcador de transformación inicial de los astrocitos. MiR-128-3p fue el microRNA con mayor abundancia en CN y en GI. En el caso

de miR-221 su expresión aumentó gradualmente de CN hasta GIV y en varios estudios, en diferentes tipos tumorales se ha reportado con una expresión alterada y ambivalente.

### **7.3. Expresión de miR -124-3p, -128-3p y -221-3p en astrocitomas Grado I a Grado IV.**

Se obtuvieron datos del Ct (número de ciclo donde se detecta el umbral de fluorescencia de cada producto amplificado) de miR-124-3p, -128-1 y -221-3p en las muestras de astrocitoma de los cuatro grados y en cerebro normal. Con estos datos iniciales se realizó una cuantificación relativa utilizando como gen de referencia RNU48 y RNU6B y como calibrador el cerebro normal. Utilizando los dos genes de referencia por separado se observó la misma tendencia en los cuatro grados. En todos los grados la expresión de los microRNAs fue menor en comparación con cerebro normal (Fig. 14). En GIV los microRNAs con el valor de expresión más bajo fueron miR-128-1,  $0.0081 \pm 0.0027$  (1469 veces) y miR-124-3p,  $0.0099 \pm 0.002$  (407 veces) ( $p < 0.0001$ , en ambos casos); mientras que la expresión de miR-221-3p fue  $0.0075 \pm 0.001$  (144 veces menos en tumores GIV) ( $p < 0.0029$ ). En cuanto a los tumores de GI and GIII, miR-221-3p disminuyó  $0.25 \pm 0.022$  and  $0.24 \pm 0.005$  ( $p = 0.0171$ ,  $p = 0.0182$ ), respectivamente (Fig. 14).



**Figura 14. (A)** Se observan los datos de expresión de los microRNAs -124-3p, -128-1 and -221-3p en los cuatro grados de astrocitomas y en cerebro normal ( $\pm$ s.d.). **(B)** En la gráfica se muestra el número de veces que disminuyó la expresión de los microRNAs en comparación con cerebro; miR-128-1 fue el microRNA con la expresión más baja comparado con cerebro normal. El gen RNU-48 se utilizó como control endógeno. \*P<0.05, \*\*P<0.01

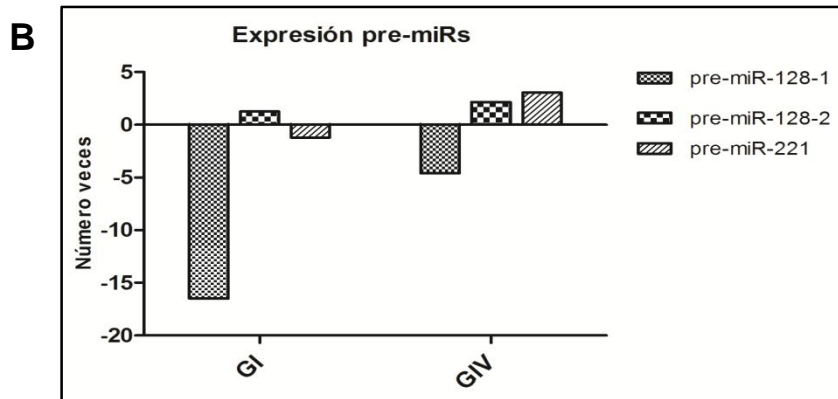
#### 7.4. Expresión de pre-miR-128 y pre-miR-221 en astrocitomas GI y GIV.

La baja expresión de las formas maduras de los miR-128 y miR-221 principalmente en GIV, nos condujo a evaluar la expresión de sus formas precursoras, en un intento por determinar si existen mecanismos relacionados con la biogénesis que se encuentren alterados. La expresión de pre-miR-128-1 fue más abundante en CN ( $0.11 \pm 0.006$ ) que en GI y GIV ( $0.007 \pm 0.006$  y  $0.025 \pm 0.01$  respectivamente) ( $p < 0.05$ ). En GIV pre-miR-128-1 fue 3.5 veces más abundante que en GI, mientras que el pre-miR128-2 y pre-miR-221 fueron también más abundantes en GIV (1.7 and 3.6 veces, respectivamente). En general las formas precursoras fueron más abundantes en los tumores de GIV

en comparación con los niveles observados en GI (Fig.15). Basándonos en estos resultados podemos concluir que la reducción en la expresión de las formas maduras de miR-128-1, miR-128-2 y miR-221 es una característica relevante en los astrocitomas, especialmente los de GIV.

**A**

Grado	pre-miR-128-1	pre-miR-128-2	pre-miR-221
GI	0.0071 ±0.006 *	0.0022 ±0.017	0.0016 ±0.007
GIV	0.0254 ±0.01 *	0.0038 ±0.01	0.0058 ±0.008
CN	0.1188 ±0.006*	0.0017 ±0.002	0.0019 ±0.008



**Figura 15. (A)** Valores de expresión de los pre-miRs -128-1, 128-2 and -221 en astrocitomas grado GI, GIV y CN ( $\pm$ s.d.). **(B)** se muestra el número de veces que la expresión de los pre-miR cambio con respecto a CN. En GI, el pre-miR-128-1 disminuyó 16.5 veces, y en GIV 4.6 veces.\*P<0.05. En GIV, las formas precursoras de los tres microRNAs fueron más abundantes comparados con GI.



## 7.5. RT-qPCR de miR-124-3p, -128-3p y 221-3p y su correlación con parámetros clínico-patológicos.

En los 52 astrocitomas los valores de expresión de miR-124, miR-128 y miR-221 se correlacionaron con parámetros clínicos como edad, supervivencia, localización del tumor y recurrencia, obteniendo diferencias significativas en varios casos. Las determinaciones de los valores de expresión considerando los parámetros clínicos se realizaron normalizando con RNU48 (Tabla 7)

**Tabla 7.** Características clínico-patológicas de los pacientes estudiados, y expresión de miR-124-3p, 128-3p y 221-3p en astrocitomas.

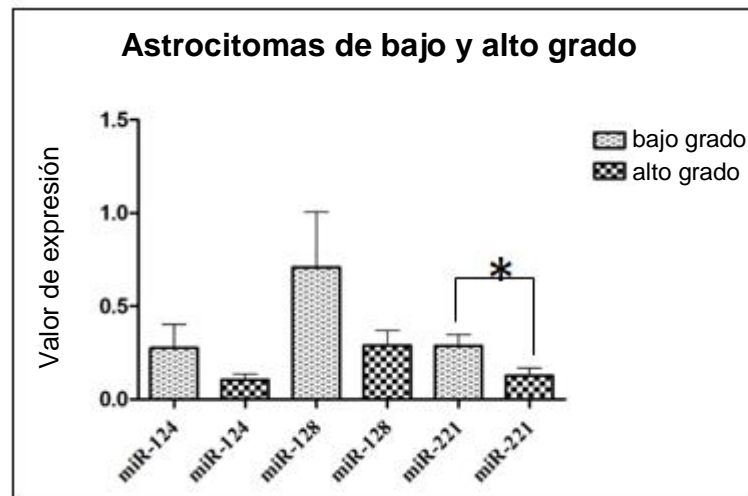
Grado	Pacientes	Sexo F/M	Edad años (rango)	**Resección C/I	*Supervivencia V/F	Seguimiento (rango)	Expresión miRNA por grado		
							124	128	221
GI	17	9/8	5.3 (0.4-13)	8/7	12/3	5.1 (0.4-11)	0.28	0.44	0.25
GII	9	5/4	9.1 (0.6-14)	0/7	3/3	2.1 (0.08-6.6)	0.22	1.03	0.38
GIII	16	8/8	8.8 (2-13)	2/8	0/9	1.1 (0.08-3)	0.19	0.55	0.24
GIV	15	9/6	9 (3-16)	3/9	0/11	2.4 (0.03-7.6)	0.009	0.008	0.007

F, Femenino; M, Masculino. I, infratentorial; S, supratentorial. C, completa; I, incompleta. V, Vivo; F, Fallecido. \* Conocido en algunos pacientes. \*\* Desconocido el porcentaje de resección.

### 7.5.1. Expresión en astrocitomas de bajo y alto grado.

MiR-128-1 fue el miRNA que disminuyó de manera notable en los tumores de GIV ( $0.0081 \pm 0.002$ ) comparado con cerebro normal ( $11.9 \pm 0.027$ ). Sin embargo, después de agrupar y comparar los valores de expresión de los tumores de bajo grado (GI, GII;  $0.7 \pm 0.023$ ) y alto grado (GIII, GIV;  $0.2 \pm 0.018$ ), la reducción en los casos de alto grado no fue significativa ( $p=0.14$ ), aunque éste fue el microRNA que tuvo la más baja expresión en estos dos grados de astrocitoma. En contraste, la expresión de miR-221-3p reveló una diferencia significativa ( $p=0.0321$ ) entre los dos grupos, mostrando más alta expresión en los casos de bajo grado (GI, GII;  $0.28 \pm 0.017$ ) comparado con los de alto grado (GIII, GIV;  $0.12 \pm 0.010$ ). Estos resultados nos conducen a suponer que la reducción en la expresión

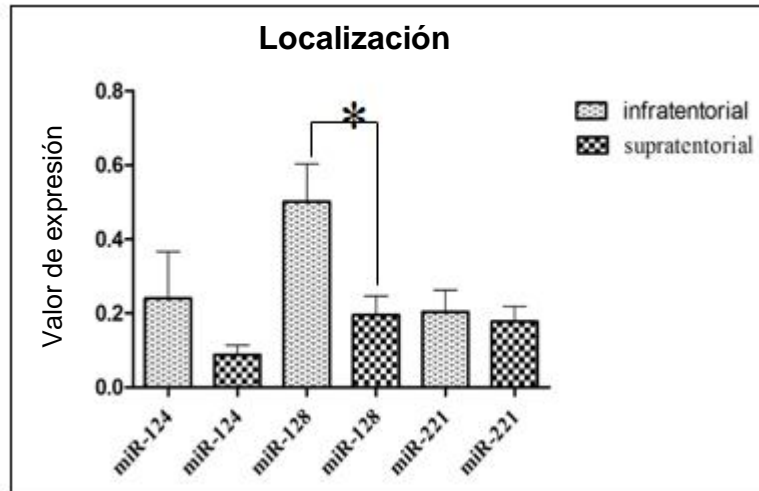
de estos miRNAs es característica de entidades malignas, por su parte miR-221-3p también parece constituir un marcador de progresión tumoral en astrocitomas, especialmente en los de alto grado (Fig. 16).



**Figura 16.** Valor de expresión de miR-124-3p, 128-3p y 221-3p en astrocitomas, agrupando los datos de expresión en bajo (GI, GII) y alto grado (GIII, IV), ( $\pm$  d.e.) \* $P < 0.05$ .

### 7.5.2. Expresión de acuerdo a localización infra y supratentorial.

En niños los astrocitomas de bajo grado e infratentoriales son los más comunes. En los tumores infratentoriales miR-128-3p mostró un valor de expresión de  $0.5 \pm 0.10$ , mientras que los casos supratentoriales tuvieron un valor de  $0.19 \pm 0.05$ , una diferencia que fue significativa ( $p=0.006$ ). De manera similar, miR-124-3p tuvo el valor más alto de expresión en los tumores infratentoriales,  $0.24 \pm 0.12$ , comparado con  $0.08 \pm 0.02$  en los casos supratentoriales, aunque estas diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.18$ ). En el caso de miR-221-3p, no se observaron diferencias significativas entre las dos localizaciones. Estos resultados indican que, similar a lo observado en el análisis por grado tumoral, la expresión de miR-128-3p disminuyó (menos de 0.19) lo que parece caracterizar a los tumores de alto grado con localización supratentorial (Fig. 17).

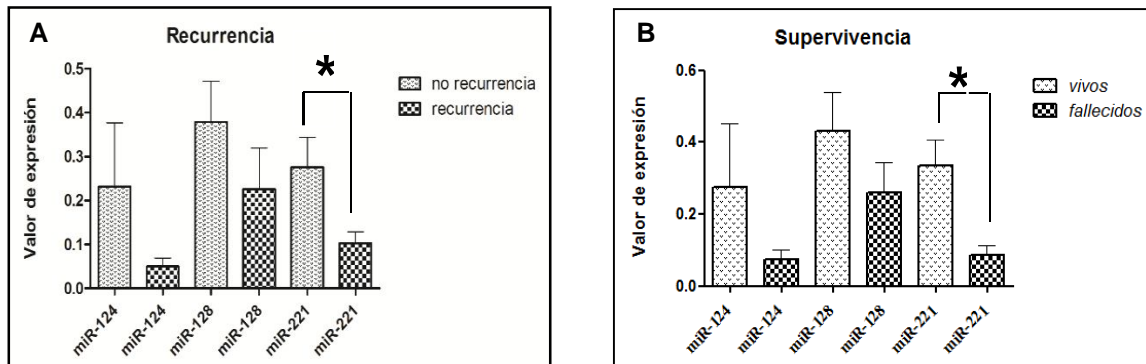


**Figura 17.** Expresión de los microRNAs en astrocitomas con localización infratentorial y supratentorial. El miR-128-3p se observó con una mayor expresión en los astrocitomas infratentoriales. ( $\pm$  d.e.). \* $P < 0.05$

### 7.5.3. Expresión en pacientes con recurrencia tumoral.

La expresión de miR-221-3p reveló una diferencia significativa ( $p=0.0321$ ) entre los grupos de bajo y alto grado ( $0.28 \pm 0.017$  vs.  $0.12 \pm 0.10$ , respectivamente) por lo que la baja expresión de miR-221-3p parece constituir un marcador de progresión en los astrocitomas. Los tumores de alto grado tienen una mayor probabilidad de generar recurrencia por lo que el siguiente paso fue comparar la expresión de miR-221-3p en relación a recurrencia y supervivencia de los pacientes. Como se esperaba los pacientes con tumores no recurrentes y vivos (tiempo promedio de seguimiento 77 meses; rango: tres meses a cinco años) presentaron niveles de miR-221-3p de  $0.27 \pm 0.068$  and  $0.33 \pm 0.07$ , respectivamente; dicha expresión fue mayor que la observada en los pacientes que sufrieron recurrencia  $0.1 \pm 0.026$  y que fallecieron  $0.08 \pm 0.024$  ( $p=0.018$ ,  $p=.0004$ , respectivamente) (Fig. 18). En general, es claro que en los casos de pacientes con tumores recurrentes y aquellos que fallecieron, así como en los tumores de bajo grado recurrentes la expresión de miR-124-3p y miR-128-3p siempre disminuyó a la mitad con respecto a los niveles observados en los casos sin recurrencia y de pacientes

vivos, aunque esta diferencia no fue estadísticamente significativa (Fig. 18). Con estos resultados podemos concluir que la reducción en la expresión de miR-221-3p también caracteriza a los pacientes con tumores recurrentes quienes fallecieron. Por sexo y edad no se observaron diferencias significativas.

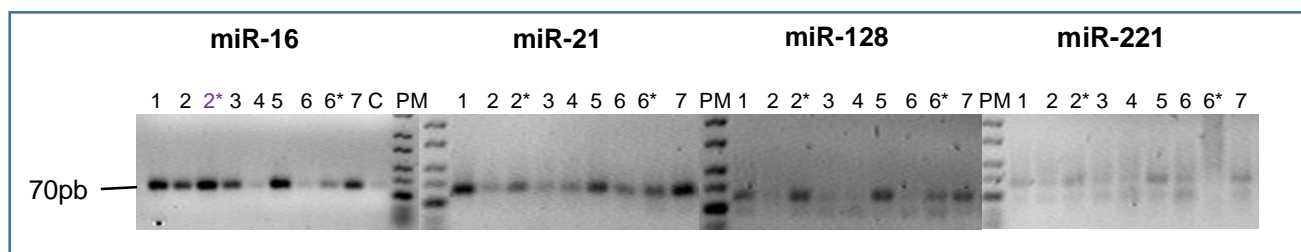


**Figura 18. A)** Se observó una diferencia significativa en la expresión de miR-221-3p siendo mayor en los tumores que no recurrieron. **B)** La expresión de miR-221-3p fue mayor en los pacientes vivos en comparación con los fallecidos. ( $\pm$  d.e.).\*P<0.05

## 7.9. Expresión de microRNAs en suero de pacientes con astrocitomas.

### 7.9.1. PCR punto final

En las muestras de suero se evaluaron tres miRNAs, miR-21 se incluyó debido a que se ha encontrado reiteradamente en muestras de suero de pacientes con GBM; miR-128 y miR-221 fueron los miRNAs elegidos en los tumores sólidos y extrapolados a las muestras de suero. Se utilizó como control endógeno a miR-16. Los resultados mostraron que miR-21 es el más expresado en todos los casos y miR-128 el menos expresado (Fig. 19).



**Figura 19.** Expresión de miRNAs en muestras de suero de siete pacientes. Los asteriscos indican las muestras que fueron tomadas tres meses después del tratamiento. Los carriles del 1-3 y la 6 son sueros de pacientes con a. pilocítico (GI), 4 y 5 sueros de pacientes con a. anaplásico (GIII) y 7 suero de paciente con GBM (G1V).

### 7.9.2. RT-qPCR.

En general en los astrocitomas pilocíticos miR-124 fue el que tuvo una menor expresión y en los dos tumores anaplásicos miR-221 tuvo los niveles más bajos (9 y 13 veces). Se incluyeron dos muestras de suero colectadas tres meses después de la resección quirúrgica con diagnóstico de astrocitoma pilocítico. En estos casos la expresión de los microRNAs aumentó en la segunda muestra con respecto a la primera (antes de la resección quirúrgica), siendo más evidente en el paciente identificado con el número 4, en el que aumentó miR-124-3p (39 veces) y miR-128-3p (5 veces). En la expresión de los tres microRNAs disminuyó con respecto al suero normal, excepto en el paciente 4' en el que miR-124-3p y miR-128-3p tuvieron una mayor expresión (5 y 6.6 veces, respectivamente). En el suero de un paciente con GBM miR-128-3p aumentó 3 veces y miR-221 disminuyó tres veces, en comparación con suero normal. En todos los casos miR-221-3p se observó con baja expresión con respecto a la expresión en suero de pacientes sin tumor. En estos casos el control endógeno fue miR-223 (Tabla 8).

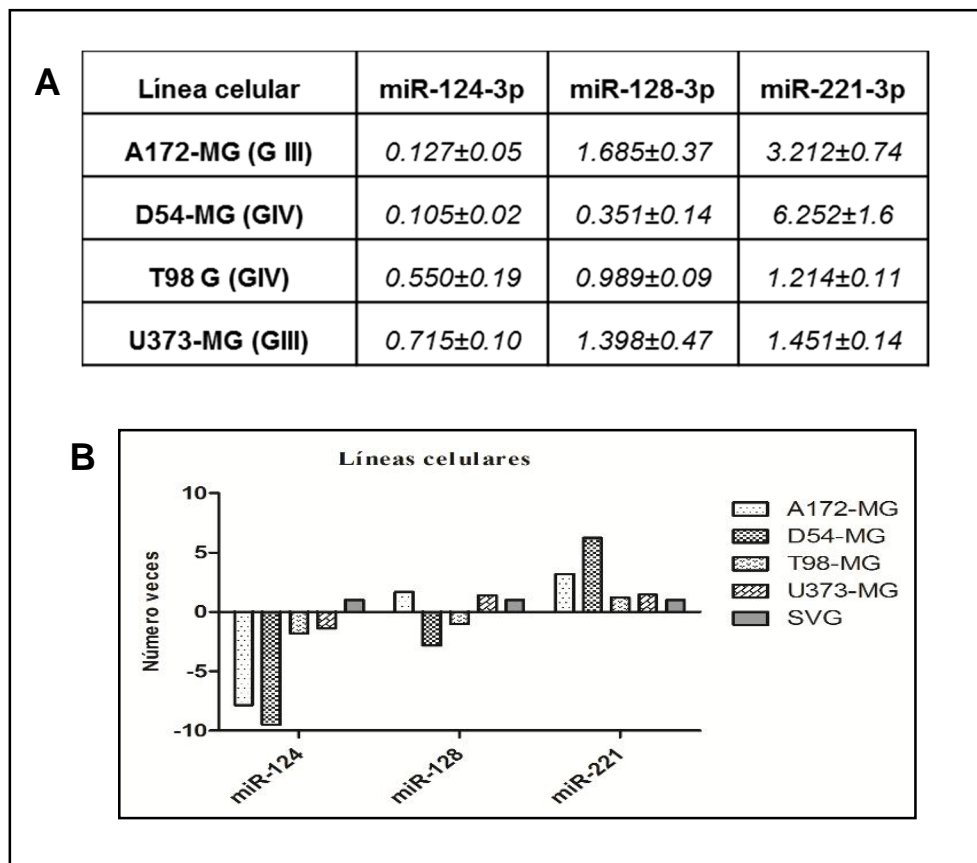
## Perfil de expresión de microRNAs en astrocitomas pediátricos

**Tabla 8.** Valores de expresión y relación del cambio de miR-124-3p, 128-3p y miR-221-3p en suero de cuatro pacientes con astrocitoma pilocítico, dos con astrocitoma anaplásico y un GBM. Comparación con respecto a la expresión en suero de paciente sin tumor. 2' y 4' indican la segunda muestra de suero, posterior a la resección del tumor.

Suero Tumor	MiR-124-3p		MiR-128-3p		MiR-221-3p	
	Valor expresión	No. veces	Valor expresión	No. veces	Valor expresión	No. Veces
Pilocítico 1	0.0063 ±3.1E-05	↓ 6.8	0.0847±0.014	↓ 1.2	0.1240±0.016	↓ 1.3
Pilocítico 2	0.0012±0.0002	↓ 36	0.024±0.005	↓ 4.2	0.0175±3.97E-08	↓ 9.5
Pilocítico 2'	0.0033±0.0007	↓ 13	0.0775±0.031	↓ 1.3	0.0239±0.0005	↓ 7
Pilocítico 3	0.0148±0.006	↓ 2.9	0.0329±0.007	↓ 3	0.0221±0.006	↓ 7.5
Pilocítico 4	0.0056±0.003	↓ 7.7	0.1308±0.042	↑ 1.2	0.0329±0.0042	↓ 5
Pilocítico 4'	0.2230±0.02	↑ 5	0.6727±0.004	↑ 6.6	0.0890±0.042	↓ 1.8
Anaplásico 1	0.0377±0.004	↓ 1.1	0.0925±0.035	↓ 1.1	0.0182±1.97E-05	↓ 9.2
Anaplásico 2	0.0212±0.011	↓ 2	0.0690±0.0006	↓ 1.4	0.0120±0.009	↓ 13.9
GBM	0.0435±0.022	↓ 1	0.3114±0.006	↑ 3	0.0546±0.0001	↓ 3
SN	0.0439±2.8E-05	1	0.1018±0.008	1	0.1678±0.014	1

### 7.10. Expresión de microRNAs en líneas celulares de astrocitoma.

En las líneas celulares A172-MG y D54-MG, miR-124-3p tuvo una baja expresión (7 y 10 veces menos), en T98 G y U373-MG se mantuvo una expresión menor del doble en comparación con la línea de astrocitos inmortalizados SVGp12. En el caso de miR-128-3p sólo se observó una baja expresión en D54-MG (2.8 veces). El miR-221-3p se observó con mayor expresión en las cuatro líneas siendo mayor del doble en A172-MG (3 veces) y en D54-MG (6 veces). En la línea D54-MG se observó la expresión más baja de miR-124 y -128, en cambio miR-221 tuvo la expresión más alta. (Fig. 20).



**Figura 20. A.** Valores de cuantificación relativa de miR-124-3p, -128-3p y -221-3p en cuatro líneas celulares de glioma de alto grado. Los valores de Ct se normalizaron con RNU48 y se compararon con los resultados obtenidos en la línea control SVGp12 mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . **B.** En la gráfica se observa el número de veces que los microRNAs están alterados con respecto a la línea SVGp12. MiR-124 fue el menos expresado en A172-MG y D54-MG y por el contrario miR-221 fue el más expresado en las mismas líneas.

## 8. DISCUSIÓN

Actualmente, ha sido bien documentado que los miRNAs pueden contribuir al desarrollo y progresión del cáncer y su expresión anormal se asocia con el pronóstico del paciente (Chung-sean et al, 2009; Srinivasan et al, 2011; Volinia et al, 2006). Distintos patrones de expresión de miRNAs han sido descritos en astrocitomas de bajo y alto grado incluyendo astrocitoma pilocítico, difuso, anaplásico y glioblastoma multiforme de adultos (Ciafrè et al, 2005; Conti et al, 2009; Jiang et al, 2010; Zhi et al, 2010). En estos tumores los miRNAs participan en la proliferación celular, invasión, angiogénesis y diferenciación (Godlewski et al, 2010; Zhi et al, 2010). En la literatura existen pocos estudios que exploren la expresión de microRNAs en los cuatro grados de astrocitomas en niños, principalmente los de bajo grado (Birks et al, 2011). En este estudio se exploró inicialmente la expresión de ocho microRNAs mediante RT-PCR semicuantitativo, en astrocitomas pilocíticos (GI) y GBM (GIV) pediátricos, ambos representan entidades biológicas muy distintas en cuanto a sus características de malignidad. En los tumores de GI y GIV todos los microRNAs tuvieron una mayor expresión con respecto a la observada en cerebro normal; este resultado contrastó con el obtenido mediante RT-qPCR que se presentará más adelante. En el caso de los astrocitomas de GI se observó una diferencia significativa con miR-9, miR-15b, miR-21, miR-124, miR-128 y miR-137. Entre cerebro normal y GIV se observó diferencia significativa con miR-9, miR-124 y miR-221; sin embargo comparando la expresión entre GI y GIV sólo se observó diferencia significativa con miR-124 que tuvo una expresión más alta en GI y disminuyó progresivamente. Los miR-124, -128 y 137 son considerados como supresores de tumor y están altamente expresados en el cerebro donde promueven la diferenciación neural, pero en los glioblastomas se encuentran poco expresados disminuyendo por lo tanto la diferenciación (Silber et al, 2008; Godlewski et al, 2010). A diferencia de lo que se reporta en la literatura, en este estudio miR-137 se encontró más expresado en los gliomas de alto grado y pudiera promover la diferenciación neural, sin embargo su función en el desarrollo neural normal no se conoce. Es un microRNA que se regula de



manera importante por mecanismos epigenéticos (Silber et al, 2008; Bier et al, 2013), por lo que en este caso, su alta expresión en los GBM puede deberse a que los pacientes analizados en este estudio probablemente fueron tratados con agentes desmetilantes, sin embargo no se puede confirmar esta información. Por otro lado miR-9, considerado como un oncogen tuvo una mayor expresión en casos con tumores de GIV. En la literatura se ha reportado que miR-9 se expresa casi exclusivamente en cerebro y es un mediador de la neurogénesis en cerebro fetal y está altamente expresado en comparación con cerebro de adulto (Godlewski et al, 2010). Nass y colaboradores por su parte mencionan que en el GBM también se encuentra sobre-expresado, sin embargo en los gliomas su función no es conocida (Nass et al, 2009). Se conoce poco del papel de los miRNAs como indicadores pronósticos, sin embargo, en los astrocitomas miR-137 se asoció con una fase clínica más avanzada. La baja expresión de miR-181b o la alta expresión de miR-21 fueron asociados con baja supervivencia del paciente (Zhi et al, 2010).

Los gliomas pueden surgir de una sub-población de células dentro de la masa tumoral, a estas células se les denomina “células troncales tumorales” que mantienen su capacidad de renovación y multipotencialidad. En estas células tumorales los programas de diferenciación están afectados, dentro de este proceso tienen un papel fundamental los miRs-124, -128 y -221 (Kim et al, 2011). En este estudio estos microRNAs mostraron expresión diferencial por PCR de punto final por lo que se eligieron para validar su expresión por qPCR. A la fecha existe una gran cantidad de microRNAs descritos en gliomas de adulto, sin embargo su abundancia en el cerebro normal principalmente miR-124 y -128 indica que participan en diversas funciones del cerebro. Aunado al cambio en su expresión, la relevancia que han tomado en los gliomas de adulto observado en este estudio. En este análisis todos estos miRNAs presentaron disminución en su expresión lo cual contrastó con el análisis previo realizado mediante RT-PCR semicuantitativa. Parte de la razón para explicar esta discrepancia puede radicar en el hecho de que la PCR de punto final a 35 ciclos puede estar en un momento de saturación y tiene muy poca sensibilidad para realmente revelar las diferencias entre distintas muestras. Por eso,

se realizaron los ensayos mediante RT-qPCR. A este respecto se sabe que el miR-124 promueve diferenciación de células troncales neurales de adulto e inhibe la proliferación de células troncales de glioblastoma, mientras que miR-128 inhibe proliferación celular y promueve la autorenovación de la célula troncal (Godlewski et al, 2008; Silber et al, 2008). En el caso de miR-221, en los tumores de adulto tiene una función ambivalente: por un lado aumenta la proliferación celular debido a que inhibe a p<sup>27kip1</sup> (un regulador negativo del ciclo celular) (Gillies y Lorimer, 2007) y por otro lado inhibe el crecimiento celular (Lee y Dutta, 2009). Dada la importancia de las funciones celulares de estos miRNAs, el propósito de este estudio fue analizar la expresión de tres miRNAs específicos (124-3p, 128-3p y 221-3p) en astrocitomas pediátricos y su relación con ciertas características clínico-patológicas. Los resultados de la RT-qPCR demostraron que la baja expresión de estos miRNAs se asocia con el grado tumoral y define grupos clínicos importantes. Específicamente, miR-124-3p, 128-3p y 221-3p tuvieron una baja expresión en los tumores de GIV, lo que sugiere una posible función supresora de tumor en astrocitomas pediátricos. La baja expresión de estos miRNAs puede deberse a diversos factores, como alteraciones en la biogénesis. De tal manera que para evaluar dichos cambios se exploraron los niveles de expresión de las formas precursoras de miR-128-1, miR-128-2 y miR-221. En general las formas precursoras fueron más abundantes en tumores GIV comparado con los niveles expresados en tejido cerebral normal y en GI. Esto resultados sugieren que conforme se incrementa el grado tumoral también se van acumulando cambios genéticos o epigenéticos que pueden, a su vez afectar complejos de proteínas encargados de la maduración de los microRNAs. A este respecto, Moore y colaboradores estudiaron la proporción entre formas maduras y precursoras en un grupo de gliomas y su relación con genes involucrados en diferentes pasos de la biogénesis de los microRNAs y concluyeron que la proporción entre ambas formas es modulada en parte por cambios en la expresión de una amplia red de genes que participan en dicho proceso. En este estudio describen un grupo de microRNAs en los que el proceso de maduración esta disminuido encontrándose en menor proporción que las formas precursoras y por el contrario otro grupo en el que las formas maduras están en mayor

proporción en comparación con cerebro normal (Moore et al, 2013). La expresión de pre-miR-128 fue abundante en el tejido cerebral normal, pero disminuyó de manera importante en GI (16.5 veces). Pocas alteraciones genéticas se han descrito en astrocitomas pilocíticos, pero su reducción puede ser debida a cambios genéticos y/o epigenéticos muy sutiles, que aún no han sido descritos. En relación a esto Ho y colaboradores consideran que la regulación post-transcripcional y epigenética puede participar de manera importante en la patogénesis del astrocitoma pilocítico (Ho et al, 2013). Ciafrè, y colaboradores usando un microarreglo de expresión describieron una baja expresión de miR-128 y alta expresión de miR-221, pero en GBM (Ciafrè et al, 2005). En otro estudio realizado en tumores de adulto, Silber y colaboradores reportaron una reducción de miR-124 en el astrocitoma anaplásico y GBM y también baja expresión de miR-128 pero sólo en el GBM (Silber et al, 2008). Recientemente Ho y colaboradores reportaron que un astrocitoma pilocítico mostró reducción en la expresión de miR-124 comparado con tejido cerebral normal y sugirió que la activación de la vía MAPK (una de las rutas principales alterada en estos tumores) puede modificar la expresión de los microRNAs (Ho et al, 2013). En el caso de miR-221 en concordancia con lo obtenido por Lakomy y colaboradores y Rao y colaboradores obtuvieron bajos niveles de expresión en muestras de los cuatro grados de astrocitoma (Lakomy et al, 2011; Rao et al, 2010). En este estudio, específicamente en los tumores de GIV o GBM la expresión de miR-221 se abate de manera importante sugiriendo una función como supresor de tumor. Srinivasan en un grupo de GBM también obtuvo bajos niveles de expresión de este microRNA (Srinivasan et al, 2011). En contraste con estos reportes en la literatura se describe como un oncogén con expresión elevada en astrocitomas de alto grado en adultos (Ciafrè et al, 2005; Conti et al; 2009; Gillies y Lorimer 2007; Lee y Dutta, 2009). Esta discrepancia se puede explicar si se considera que en adultos se han reportado subgrupos de GBM con comportamientos biológicos diferentes. A este respecto Antonelly y colaboradores mencionan que en los GBM pediátricos primarios se observa la mutación de TP53 con alta frecuencia y no se observa amplificación de EGFR (factor de crecimiento epidermal). En los adultos en contraste, los GBM primarios tienen como principal alteración la amplificación de EGFR (Antonelly

et al, 2010). Así también dentro del mismo grupo de GBM pediátricos existen diferencias en la expresión de moléculas relacionadas con el crecimiento del tumor, como lo reportó Faury y colaboradores, que identificaron dos subtipos, en uno de ellos la vía Ras/Akt es activa y los pacientes tienen mal pronóstico, en el otro subtipo no hay activación de esta vía y el pronóstico es favorable (Faury et al, 2007). En el caso de las líneas celulares, la expresión de miR-221 fue mayor en D54-MG (GIV) y en A172-MG (GIII) en comparación con la línea SVGp12 de astrocitos inmortalizados, sin embargo éste no es un modelo adecuado para comparar debido a que son líneas comerciales aisladas de gliomas de adulto, por lo que un modelo más adecuado sería utilizar líneas celulares derivadas de gliomas pediátricos. Desafortunadamente este tipo de líneas celulares no están disponibles comercialmente. La expresión de miR-124 y miR-128 fue evidente a lo largo de los cuatro grados y se observaron con mayor expresión en astrocitomas de bajo grado. En el análisis de los resultados considerando los parámetros clínicos se observó mayor expresión de miR-124, miR-128 y miR-221 en los pacientes vivos obteniéndose una diferencia significativa sólo en el caso de miR-221, grupo representado principalmente por los pacientes con tumores de bajo grado. En los pacientes que no recurrieron y vivos, el miR-221 se encontró con mayor expresión siendo significativa la diferencia.

Por su parte Ciafrè y colaboradores reportaron mayor expresión de miR-221 en GBM de adultos, mientras que los miR-128, miR-181a, miR181b y miR-181c se encontraron con baja expresión, lo que probablemente reflejó pérdida de expresión asociada a falta de diferenciación en las células tumorales (Ciafrè et al, 2005). Por su parte Conti y colaboradores reportaron en el caso de miR-221 mayor expresión en GBM de adultos (Conti et al, 2009). Los datos obtenidos en este trabajo indican que miR-124 y miR-128 probablemente participan limitando el desarrollo del tumor. La disminución de estos microRNAs puede favorecer la pérdida de diferenciación de las células tumorales. Silber y colaboradores demostraron que miR-124 es un supresor de tumor que además de inducir diferenciación inhibe la proliferación de células troncales de glioblastoma (Silber et al, 2008).

Zhang y colaboradores estudiaron la expresión de miR-128 en astrocitomas GII, GIII y GIV y en líneas celulares y observaron que disminuye progresivamente conforme aumentaba el grado de tumor. Entre sus moléculas blanco se encuentra el factor de transcripción E2F3a, que es un activador del ciclo celular y participa en los procesos de proliferación celular y apoptosis. De igual forma Godlewski y colaboradores comprobaron la baja expresión de miR-128 en gliomas y encontraron como blanco a Bmi-1 el cual promueve la auto-renovación de células troncales (Godlewski et al, 2008). En este caso la baja expresión de miR-124 y miR-128 observada en los tumores, coincidió con los bajos niveles vistos en las cuatro líneas celulares de glioma de alto grado, en todos los casos los valores fueron menores del doble.

Los miRNAs que participan en el desarrollo neural, también se han encontrado desregulados en el GBM, lo que implica que ciertos miRNAs permiten el crecimiento del tumor a través de suprimir la diferenciación y mantener características de células troncales. Varios miRNAs han sido identificados con importancia funcional en el desarrollo neural. En particular miR-7 y miR-124 participan en la diferenciación neural y se encuentran poco expresados en el GBM. MiR-128 también está alterado, pero su función en las células normales no es conocida. En GBM, la supresión de miR-128 puede tener efectos severos debido a que puede mantener la auto-renovación de células troncales de glioma (Godlewski et al, 2010).

En el caso de las muestras de suero se observó expresión alterada de los tres microRNAs predominando la disminución de miR-124 y miR-221 en los sueros de los pacientes con astrocitoma pilocítico y anaplásico. Con respecto a miR-221 su expresión disminuyó en todos los casos con respecto a suero de pacientes sin cáncer. En el caso de un paciente con astrocitoma pilocítico, en el que se tomó una segunda muestra de suero tres meses después de la resección del tumor, los niveles de miR-124 y miR-128 se elevaron (39 y 5 veces, respectivamente) con respecto a la muestra inicial, lo que puede explicarse por la eliminación de las células tumorales con la resección quirúrgica. Lawrie y colaboradores, en pacientes con linfoma encontraron que los niveles de miR-21 fueron más altos que

los encontrados en sueros control de pacientes sanos y encontraron una asociación en la alta expresión de miR-21 con un mejor pronóstico. Estos resultados fueron consistentes con resultados previos en material de biopsias de pacientes con linfoma, en donde los altos niveles de miR-21 se asociaron con mejor pronóstico (Lawrie et al, 2008). En muestras de suero de pacientes con GBM, Skog y colaboradores detectaron microvesículas conteniendo miRNAs, siendo miR-21 el más expresado (Skog et al, 2008). Por su parte Lodes y colaboradores mencionan que las células normales contribuyen a la población de exosomas en la circulación periférica, pero la fuente primaria de exosomas circulantes en pacientes con cáncer se origina del tumor. Es de esperar que los niveles de expresión de miRNAs en suero no correspondan directamente con los perfiles encontrados en los tejidos, debido a los mecanismos de liberación de miRNAs dentro de la circulación (lisis de células o liberación de exosomas), por lo que es importante su comparación con los niveles de expresión de suero de individuos sin tumor (Lodes et al, 2009).

## 9. CONCLUSIONES

En el cerebro normal miR-128-3p fue el microRNA más abundante y miR-15b el menos abundante. MiR-124, -128 y -221 fueron menos expresados de manera importante en los casos de GBM con respecto a cerebro normal. En los pacientes vivos con tumores que no recurrieron, grupo representado principalmente por pacientes con tumores de bajo grado (a. pilocítico), los miR-124, -128 y -221 mostraron mayor expresión que los cerebros normales. Las formas precursoras de miR-128 y -221 fueron más abundantes en tumores GIV. En suero la expresión de miR-221 fue menor en todos los casos con respecto a suero de pacientes sin cáncer. En dos casos con astrocitoma pilocítico los niveles de los tres microRNAs (miR-124, -128 y -221) fueron mayores en la segunda muestra de suero, posterior a la resección quirúrgica, lo que sugiere que las células tumorales afectan la expresión de los miRNAs y su eliminación permite restablecer sus niveles. En las cuatro líneas celulares de astrocitoma, el miR-124-3p y -128-3p mostraron baja expresión y la línea de miR-221 expresión alta, pero sólo en A172-MG y D54-MG.

## 10. PERSPECTIVAS

En este trabajo se describió la expresión de tres microRNAs que mostraron diferentes niveles de expresión en los tumores de alto y bajo grado. En estudios futuros es importante explorar las vías moleculares en las que participan estos microRNAs y mediante análisis bioinformático identificar y validar blancos que puedan tener un papel preponderante en el desarrollo tumoral. El miR-128 destaca porque es un regulador epigenético de las células troncales de glioma, una ruta importante en el desarrollo de estos tumores, la búsqueda de moléculas blanco es fundamental para contribuir a la biología tumoral. En el caso de las muestras de suero es conveniente aumentar el número de casos para lograr correlacionar con lo observado en el tumor. El perfil de expresión en suero representa un diagnóstico no invasivo y permitirá utilizarlos para complementar y correlacionar con el desarrollo clínico. Por último la finalidad de definir un perfil de expresión es que contribuya a lograr una mayor precisión a la hora de definir entidades, orientar el pronóstico y determinar tratamientos específicos dentro de una misma categoría diagnóstica, evitando terapias neurotóxicas en tumores con factores pronósticos favorables.



## 11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- $\pi$  Almeida, M. Reis R, Calin G. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mut Res* 2011; 717:1-8.
- $\pi$  Antonelli M, Buttarelli F, Arcella A, Nobusawa S, Donofrio V, Oghaki H, Giangaspero F. Prognostic significance of histological grading, p53 status, YKL-40 expression, and IDH1 mutations in pediatric high-grade gliomas. *J Neuro-Oncol* 2010; 99:209-15.
- $\pi$  Bier A, Giladi N, Kronfeld N, Kyung H, Cazacu S, Finniss S, Xiang C, Poisson L, de Carvalho A, Slavin S, Jacoby E, Yalon M, Toren A, Mikkelsen T, Chaya Brodie C. MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Oncotarget* 2013; 4: 665-676.
- $\pi$  Birks D, Barton V, Donson A, Handler M, Vibhakar R, Foreman N. Survey of microRNA expression in pediatric brain tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2011; 56:211-216.
- $\pi$  Calin G, Dumitru C, Shimizu M, Bichi R et al. Frequent deletions and down regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99:15524-9.
- $\pi$  Chan J, Krichevsky A, Kosik K. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65: 6029-6033.
- $\pi$  Chang S, Wen S, Chen D, Jin P. Small regulatory RNAs in neurodevelopmental disorders. *Human Mol. Genetics* 2009; 18: R18-R26.
- $\pi$  Chen C, Ridzon D, Broomer A, Zhou Z, Lee D, Nguyen J, Barbisin M, Xu N, Mahuvakar V, Andersen M, Lao K, Livak K, Guegler K. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nuc Acids Res* 2005; 33: 1-9.

- $\pi$  Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, Guo J, Zhang Y, Chen J, Guo X, Li Q, Li X, Wang W, Zhang Y, Wang J, Jiang X, Xu C. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997-1006.
- $\pi$  Chi S, Zang J, Mele A, Darnell R. Ago HITS-CLIP decodes miRNA-mRNA interactions maps. *Nature* 2009; 460: 479-486.
- $\pi$  Chico-Ponce de León F, Castro-Sierra E, Pérezpeña-Díazconti M, Gordillo-Domínguez L. Tumores intracraneanos del niño. *Bol Med Hosp Infan Mex* 2006; 63:367-381.
- $\pi$  Cho W. OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 2007; 6:60.
- $\pi$  Chung-sean J, Kei W, Chen Z, Ng H. Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol* 2009; 117:599-611.
- $\pi$  Ciafre S, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu G, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce C, Farace M. Extensive modulation of a set microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem and Biophys Res Commun* 2005; 334:1351-1358.
- $\pi$  Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri F, Maio F, Cama A, Germano A, Vita G, Tomasello F. miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. *J Neuro-Oncol* 2009; 93: 325-332.
- $\pi$  Cortez M and Calin A. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to diagnose and monitor diseases. *Expert Opinion* 2009; 9: 703-711.
- $\pi$  Creemers E, Tijssen A, Pinto Y. Circulating MicroRNAs: Novel Biomarkers and Extracellular Communicators in Cardiovascular Disease? *Circ Res*. 2012;110:483-495.
- $\pi$  Davis-Dusenbery and Hata A. MicroRNA in cancer: the involvement of aberrant microRNA biogenesis regulatory pathways. *Genes & Cancer* 2010; 1: 1100-1114.
- $\pi$  De Smaele E, Ferretti E and Gulino A. MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. *Brain Res* 2010; 1338: 100-111.

- $\pi$  Deng S, Calin G, Croce C, Coukos G, Zhang L. Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 2008; 7: 2643-2646.
- $\pi$  Fernandez A, Northcott P, Taylor M and Kenney M. Normal and oncogenic roles microRNAs in the developing brain. *Cell Cycle* 2009; 8: 4049-4054.
- $\pi$  Faury D, Nantel A, Dunn S, Guiot M, Haque T, Hauser P, et al. Molecular profiling identifies prognostic subgroups of pediatric glioblastoma and shows increased YB-1 expression in tumors. *J Clinic Oncol* 2007; 25:1196-1208.
- $\pi$  Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Essau C, Burchard J, Linsley P, Krichevsky A. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 2008; 28:5369-5380.
- $\pi$  Germano I, Swiss W and Casaccia P. Primary brain tumors, neural stem cell and brain tumor cancer cells: Where is the link? *Neuropharmacol* 2009; 58:903-910.
- $\pi$  Gillies J and Lorimer I. Regulation of p27<sup>kip1</sup> by miRNA 221/222 in Glioblastoma. *Cell Cycle* 2007; 6: 2005-2009.
- $\pi$  Godlewski J, Nowicki M, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, Raychaudhury A, Newton H, Chiocca E and Lawler S. Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008; 68:9125-9130.
- $\pi$  Godlewski J, Newton H, Chiocca E and Lawler S. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death Differen* 2010; 17:221-228.
- $\pi$  Graham D & Lantos P. *Greenfield's Neuropathology*. 7a. U.S.A: Arnold; 2002. p. 1140.
- $\pi$  Hartman C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, Felsberg J, Wolter M, Mawrin C, Wick W, Weller M, Herold-Mende C, Unterberg A, Jeuken J, Wesseling P, Reifenberger G, von Deimling A. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and

- oligodendroglial differentiation and age: a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol* 2009; 118:469-474.
- $\pi$  Hegi M, Diserens A, Gorlia T, Hamou M, Tribolet N, Weller M et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* 2005; 352: 997-1003.
- $\pi$  Ho C, Bar E, Giannini C. MicroRNA profiling in pediatric pilocytic astrocytoma reveals biologically relevant targets, including PBX3, NFIB, and METAP2. *Neuro-Oncol* 2013; 15:69-82.
- $\pi$  Huse J, Brennan C, Hambarzumyan D, Wee B, Pena J, Rouhanifard S, Sohn-Lee C, le Sage C, Agami R, Tuschl T, Holland E. The PTEN-regulation microRNA miR-26a is amplified in high-grade glioma and facilitates gliomagenesis in vivo. *Genes and Develop* 2010; 23:1327-1337.
- $\pi$  Hwang H, Wentzel A, Mendell T. A hexanucleotide element directs microRNA nuclear import. *Science* 2007; 315: 97-100.
- $\pi$  Jiang L, Mao P, Song L. MiR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patients survival. *Am J Pathol* 2010; 177: 29-37.
- $\pi$  Jones D, Kocialkowski S, Liu L, Pearson D, Bäcklund L, Ichimura K, Collins P. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer Res* 2008; 68: 8673-8677.
- $\pi$  Kim T, Huang W, Park R, Park P, Johnson M. A Developmental taxonomy of glioblastoma defined and maintained by microRNAs. *Cancer Res* 2011; 71: 3387-3399.
- $\pi$  Kleihues P & Cavenee W. Astrocytic Tumors. En: *Pathology & Genetics of Tumours of the Nervous System*. IARC Press. 2000. p. 9-51.
- $\pi$  Krichevsky A, King K, Donahue C, Khrapko K, Kosik K. A microRNA array reveals extensive regulation of microRNAs during brain development. *RNA* 2003; 9: 1274-1281.
- $\pi$  Kroh E, Parkin R, Mitchell P and Tewari M. Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR). *Methods* 2010; 50: 298-301.

- $\pi$  Labussiere M, Wang X, Idbaih A, Ducray F, Sanson M. Prognostic markers in gliomas. *Future Oncol* 2010;6:733-739.
- $\pi$  Lakomy R, Sana J, Hankeova S. MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci* 2011; 102: 2186-2190.
- $\pi$  Landgraf P, Rusu M, Sheridan R et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007; 129:1401-1414.
- $\pi$  Lawrie C, Gal S, Dunlop H, Pushkaran B, Liggins A, Pulford K, Banham A, Pezzella F, Boultonwood J, Wainscoat J, Hatton C, Harris A. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *British J. Hematol* 2008; 141:672-675.
- $\pi$  Lee Y, Dutta A. MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 199-227.
- $\pi$  Lewis B, Burge C, Bartel D. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120: 15-20.
- $\pi$  Liu J, Valencia-Sánchez M, Hannon G, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat. Cell Biol* 2005; 7: 719-723.
- $\pi$  Lodes M, Carballo M, Suciú D, Munro S, Kumar A, Anderson B. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS One* 2009; 4: 1-10.
- $\pi$  Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P. The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathol* 2007; 114: 97-109.
- $\pi$  Lynam-Lennon N, Maher S, Reynolds J. The roles microRNA in cancer and apoptosis. *Biol. Rev* 2009; 84: 55-71.
- $\pi$  MacFarlane L and Murphy P. MicroRNA: Biogenesis, function and role in cancer. *Current Genomics* 2010; 11:537-561.

- $\pi$  Malzkorn B, Wolter M, Liesenberg F, Grzendowski M, Meyer H y Reifenberger G. Identification and functional characterization of miRNAs involved in the malignant progression of gliomas 2009; Brain Pathol ISSN 1015-6305.
- $\pi$  Medina R, Zaidi S, Liu C, Stein J, Wijnen A, Croce C, Stein G. MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. Cancer Res 2008; 68:2773-2780.
- $\pi$  Mehler M, Mattick J. Noncoding RNAs and RNA editing in brain development, functional diversification, and neurological disease. Physiol Rev 2007; 87: 799-823.
- $\pi$  Mendell J. Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. Cell Cycle 2005; 4:1179-1184.
- $\pi$  Miele E, Romana F, Arcella A, Begalli F, Garg N, Silvano M et al. High-throughput microRNA profiling of pediatric high-grade gliomas. Neuro-Oncol 2013; 0:1-13.
- $\pi$  MiR-Base: the microRNA database <http://microna.sanger.ac.uk/>
- $\pi$  Moore L, Kivinen V, Liu Y, Annala M, Cogdell D, Liu X, Chang-Gong L, Sawaya R, Yli-Harja O, Shmulevich I, Fulleer G, Zhang W and Nykter M. Transcriptome and small RNA deep sequencing reveals deregulation of miRNA biogenesis in human glioma. J. Pathol 2013; 229:449-459.
- $\pi$  Nass D, Rosenwald S, Meiri E, Gilad S, Tabibian-Keissar, Schlosberg A, Kuker H and Sion-Vardy N. Mir-92b and miR-9/9\* are specifically expressed in brain primary tumors and can be used to differentiate primary from metastatic brain tumors. Brain Pathol 2009; 19: 375-383.
- $\pi$  Navis A, Van Den M, Schepens J, Van Huijsduijnen R, Wesseling P, Hendriks W. Protein tyrosine phosphatases in glioma biology. Acta Neuropathol 2010;119:157-75.
- $\pi$  Nicoloso M, Calin G. MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. Brain Pathol ISSN 2007; 1015-6305.
- $\pi$  Novakova J, Slaby O, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. Biochem. Biophys. Res. Commun 2009; 386:1-5.

- $\pi$  Packer A, Xing Y, Harper S, Jones L, Davidson B. The bifunctional microRNA miR-9/ miR-9\* regulates REST and CoREST and is downregulated in Huntington's disease. *J Neurosci* 2008; 28: 14341–14346.
- $\pi$  Papagiannakopoulos T, Shapiro A y Kosik K. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2008; 68:8164-8171.
- $\pi$  Perry A. Glial and Glioneural Tumors. En: *Neuropathology*, Elsevier 2005, p. 605.
- $\pi$  Qaddoumi I, Sultan I y Gajjar A. Outcome and prognostic features in pediatric gliomas: a review of 6212 cases from the surveillance, epidemiology and end results (seer) database. *Cancer* 2009; 115: 5761-5770.
- $\pi$  Rao S, Santosh V, Somasundaram K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod Pathol* 2010; 23: 1404-1417.
- $\pi$  Rigoutsos, I. New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites. *Cancer Res* 2009; 69:3245-3248.
- $\pi$  Rottiers V, Näär A. MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Mol Cell Biol* 2012; 13: 239-250.
- $\pi$  Saini H, Griffiths-Jones S, Enright A. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 17719-17724.
- $\pi$  Santarpia L, Nicoloso M, Calin G. MicroRNAs: a complex regulatory network drives the acquisition of malignant cell phenotype. *Endocrine-Related Cancer* 2010; 17: F51-F75.
- $\pi$  Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y. has-mir-181a and has-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 2008; 1236: 185-193.
- $\pi$  Silber J, Lim D, Petrisch C, Persson A, Yu M et al. MiR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Medicine* 2008; 6: 1-17.

- $\pi$  Silber J, James D. and Hodgson G. microRNAs in gliomas: small regulators of a big problem. *Neuromol Med* 2009; 11:208-222.
- $\pi$  Skog J, Würdinger T, Rijn S, Meijer D, Gainche L, Sena-Esteves M, Curry W, Carter B, Krichevsky A y Breakefield X. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* 2008; 10:1470-6.
- $\pi$  Smith B, Treadwell J, Zhang D, Ly D, Mckinnell I, Walker R, Sikorska M. Large-scale expression analysis reveals distinct microRNA profiles at different stages of human neurodevelopment. *PLoS One* 2010; 5: 1-17.
- $\pi$  Srinivasan S, Pia I, Somasundaram K. A Ten-microRNA Expression Signature Predicts Survival in Glioblastoma. *PLoS One* 2011; 6:1-7.
- $\pi$  Turner J, Williamson R, Almefty K, Nakaji P, Porter R, Tse V, Kalani Y. The many roles of microRNAs in brain tumor biology. *Neurosurg Focus* 2010; 28:1-6.
- $\pi$  Volinia S, Calin G, Chang-Gong L, Ambs S et al. A microRNA expresión signatura of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad SciUSA* 2006; 103:2257-2261.
- $\pi$  Wang Y, Medvid R, Melton C, Jaenish, R, Billeloch R. DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nature Genetics* 2007; 39: 380-385.
- $\pi$  Wu W, Sun M, Zou G, Chen J. MicroRNA and cancer: Current status and prospective. *Int. J. Cancer* 2006; 120: 953–960.
- $\pi$  Xia H, Qi Y, Ng S, Chen X, Chen S, Fang M, Li D, Zhao Y, Ge R, Li G, Chen Y, He M, Kung H, Lai L, Lin M. MicroRNA 15b regulates cell cycle progression by targeting cyclins in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 380: 305-310.
- $\pi$  Zeng Y. Regulation of the mammalian nervous system by microRNAs. *Mol. Pharmacol* 2009; 75: 259-263.



- $\pi$  Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, Gong Y, Yin B, Liu W, Qiang B, Zhao J, Yuan J and Peng X. MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med* 2009; 87:43-51.
- $\pi$  Zhi F, Chen X, Wang S, Xia X, Shi Y, Guan W, Shao N, Qu H, Zhang Y, Wang Q, Wang R, Zen K, Zhang C, Zhang J, Yang Y. The use of has-miR-21, has-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma. *European J. Cancer* 2010; 46: 1640-1649.
- $\pi$  Zhou X, Ren Y, Moore L, Mei M, You Y, Xu P, Wang G, Jia Z, Pu P, Zhang B, Wang G, Jia Z, Pu P, Zhang W, Kang C. Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab. Invest* 2010; 90: 144-155.

## 12. ANEXO

### 12.1. Artículo de Investigación

# Reductions in the expression of miR-124-3p, miR-128-1, and miR-221-3p in pediatric astrocytomas are related to high-grade supratentorial, and recurrent tumors in Mexican children

Pilar Eguía-Aguilar · Mario Pérezpeña-Díazconti · Eduardo Benadón-Darszon · Fernando Chico-Ponce de León · Luis Gordillo-Domínguez · Samuel Torres-García · Stanislaw Sadowinski-Pine · Francisco Arenas-Huertero

Received: 8 February 2014 / Accepted: 27 March 2014  
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2014

## Abstract

**Purpose** Astrocytomas are the most frequent type of tumor of the central nervous system in children. Hence, it is important to describe markers that may improve our understanding of their behavior. Mature microRNAs (miRNAs) may be such biological markers. They are small molecules of RNA that regulate gene expression post-transcriptionally. Due to their importance in cancer, the objective of the present study was to determine the profile of expression of precursor and mature forms of miR-124-3p, miR-128-1, and miR-221-3p using RT-qPCR in pediatric samples.

P. Eguía-Aguilar · M. Pérezpeña-Díazconti · S. Sadowinski-Pine · F. Arenas-Huertero (✉)  
Laboratory of Molecular Biology, Department of Pathology, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, 06720 Del. Cuauhtémoc, D.F., Mexico  
e-mail: farenashuertero@yahoo.com.mx

E. Benadón-Darszon  
Ambulatory Pediatrics, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, 06720 Del. Cuauhtémoc, D.F., Mexico

F. Chico-Ponce de León · L. Gordillo-Domínguez · S. Torres-García  
Department of Neurosurgery, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, 06720 Del. Cuauhtémoc, D.F., Mexico

F. Arenas-Huertero  
Laboratory of Experimental Pathology, Hospital Infantil de México Federico Gómez, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, CP 06720 Del. Cuauhtémoc, D.F., Mexico

P. Eguía-Aguilar  
Graduate Program in Biological Sciences, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Ciudad Universitaria 3000, 04360 Coyoacán, D.F., Mexico

**Methods** A total of 57 astrocytomas embedded in paraffin were selected. As controls, the study included 13 samples of normal brain tissue.

**Results** Three of eight miRNAs were selected after a preliminary screening. All the miRNAs showed higher levels of expression in normal brain tissue. The expression of miR-124-3p and miR-128-1 decreased in astrocytomas than in normal brain tissue in all grades ( $p < 0.05$  in both cases), and this reduction was most evident in GIV (407- and 1,469-fold, respectively); however, the expression of the precursor forms pre-miR-128-1 and pre-miR-221 was higher in GIV (3.5-fold) than in GI. The levels of miR-128-1 were higher in infratentorial tumors than in supratentorial cases ( $p = 0.006$ ). Finally, the expression of miR-221-3p was higher in non-recurrent tumors and live patients ( $p = 0.0185$  and  $p = 0.0004$ , respectively).

**Conclusions** The low expression of these miRNAs may constitute a potential marker of astrocytomas that correlates with localization, possibly due to alterations in the maturation processes of these miRNAs that produced low mature forms in patients with recurrent pediatric astrocytomas.

**Keywords** Central nervous system tumors · Pediatric glioma · Pediatric astrocytoma · microRNA · miRNA

## Introduction

Tumors of the central nervous system (CNS) are the second most common kind seen in children, after leukemias [18]. In Mexico, astrocytomas represent 30 % of all CNS tumors [4]. The World Health Organization (WHO) classifies four grades of astrocytomas as

follows: pilocytic (Grade I), diffuse (Grade II), anaplastic (Grade III), and glioblastoma multiforme (Grade IV). Grades I and II are low-grade astrocytomas, while grades III and IV represent high-grade tumors [16]. The Grade I, or pilocytic, astrocytoma is the most common glioma in children and adolescents (over 75 %). Grade II, III, and IV tumors can occur in children, but are less frequent in this population than among adults. In the latter, approximately 60 % occur between 20 and 45 years of age, 30 % in adults over 45 years, and 10 % in those under 20 years [16, 20]. Research into new biological markers is important in cancer research because they allow us to describe new or unique characteristics of cancers and so distinguish cancerous growths from normal tissues. In addition, these new biological markers can be prognostic (disease-free life) and/or predictive (response to treatment) molecular indicators with the potential to improve the clinical management of these tumors. Thus, recent years have witnessed an increase in the number of reports of different kinds of molecular markers in cancer research, including microRNAs (miRNAs), which have been proposed as potential diagnostic and prognostic markers capable of predicting patient's post-operative evolution [5, 24, 37].

Mature miRNAs are molecules of non-coding RNA with 18 to 24 nucleotides that regulate gene expression by inhibiting a target messenger RNA (mRNA) and thus preventing the synthesis of the protein [6, 22, 34]. The international convention is to use the term miRNAs to refer to the mature form that is biologically active. Distinct patterns of expression of miRNAs have been described in low- and high-grade astrocytomas, including the pilocytic, diffuse, and anaplastic types, as well as in glioblastoma multiforme in adults [3, 7, 8, 11], but information is scarce for pediatric patients [2, 13]. Accordingly, the objective of the present study was to describe the levels of expression of the miRs -124-3p, -128-1, and 221-3p and their relation to the following patient data: tumor grade, tumor location, and recurrence. These particular miRNAs were selected after a previous analysis of a set of eight miRNAs that were selected and evaluated because of their role in these specific forms of cancer.

## Methods

### Human tissue samples

Samples were selected from the tissue bank at the Pathology Department of the *Hospital Infantil de México* and dated from the period 1994 to 2007. A total of 260 tumors were carefully analyzed on the basis of the following inclusion criteria: the

fragments of tumor lesions that represented at least 70 % of the tumor. This process led to the selection of 57 tumor samples, which were then fixed in 10 % formalin and embedded in paraffin (FFPE). The samples selected included all four grades of astrocytoma (GI–GIV), distributed as follows: Grade I, 17 cases; GII, 9 cases; GIII, 16 cases; and GIV, 15 cases. Thirteen samples of normal brain tissue (NB) from pediatric patients were included as controls. They were obtained from autopsies of patients who were free of any type of tumor. In order to compare the expression values of the miRNAs between FFPE tissues and fresh samples, we included seven frozen tissues: five pilocytic astrocytomas and two anaplastic astrocytomas. The study was approved by the Ethics Committee of the *Hospital Infantil de México Federico Gomez*.

### Cell line analysis

The human cell line SVGp12 from immortalized astrocytes and four glioma cell lines, A172-MG, D54-MG, T98G, and U373-MG, were purchased from American Type Culture Collection (ATCC) and cultured in a minimum essential medium supplemented with 10 % fetal bovine serum, 1× antibiotic mix (penicillin G-streptomycin), and 1× L-glutamine. All cells were maintained at 37 °C under an atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>.

### Extraction of total RNA from the samples: tissues and cell lines

Total RNA was extracted from the FFPE samples using the RecoverAll FFPE kit (Ambion, Austin, TX), whereas extraction from the cell lines involved the Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), following the manufacturer's instructions. The concentration and quality of the RNA from each sample was verified using a Nanodrop, ND-1000 (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) and 2100 Bioanalyzer (Agilent, Palo Alto, CA). All samples received treatment with DNase, and those that showed an  $A_{260}/A_{280}$  ratio of 1.7:2.1 were included in this study. A total of 57 astrocytomas and 13 samples of normal brain tissue showed this absorbance relation.

### Conventional RT-PCR

We performed initial screening by conventional RT-PCR on the expression of eight miRNAs: miR-9-1, miR-15b, miR-21, miR-124-3p, miR-128-1, miR-137, miR-181a-1, and miR-221-3p, using both normal brain tissue and GI and GIV gliomas. Upon comparing the expression levels of the miRNAs in GI and GIV with those in NB tissues, we observed an important reduction in the expression of the three: miR-124-3p, miR-128-1, and 221-3p (data not shown). A detailed



these miRNAs were selected, and their expression was quantified in both the tissues and cell lines by RT-qPCR.

Real time quantification of miR-124-3p, -128-1, and -221-3p by the reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-qPCR)

For mature microRNAs, the complement DNA (cDNA) was synthesized from 40 ng of the total RNA using gene-specific primers and the TaqMan microRNA Reverse Transcription Kit. Real time PCR was performed in an ABI 7500 thermocycler (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) according to the TaqMan MicroRNA Assay protocol. The sequences of the stem-loop RT- and real time PCR primers were synthesized by Applied Biosystems. The expression of the precursor forms of pre-miR-128-1, pre-miR-128-2, and pre-miR-221 in normal brain tissue and the GI and GIV tumors was determined. In all cases, the cDNA was synthesized from 300 ng of total RNA utilizing random hexamer primer. Afterwards, SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) was utilized to perform quantitative PCR. The primers used for qPCR were synthesized by IDT (Coralville, IO, USA). The comparative Ct ( $2^{-\Delta Ct}$ ) method was used to determine the changes in the expression of both the pre-miRNAs and the mature miRNAs in tumor samples relative to those in normal brain tissue [27]. The threshold cycle (Ct) is defined as the fractional cycle number at which fluorescence exceeds the fixed threshold. Expression analysis for miR-124-3p, -128-1, and -221-3p was performed in triplicate using the samples of astrocytoma tumors and normal brain tissues (as with the pre-miRNAs), including the seven frozen tumor samples and the cell lines. The expression of miR-92a-3p was included as a microRNA that is unrelated to tumors and was determined in GI, GIV, and NB. Briefly, the  $\Delta Ct$  of each miRNA was normalized in all cases according to the expression of RNU48 and RNU6B. Finally, the comparisons with tumor grade and tumor location were conducted. RNU48 was considered during this final analysis. The clinical-pathological characteristics of the patients are shown in Table 1. Finally, the average  $2^{-\Delta Ct}$  of the 13 NB were used as the calibrator for the tumor samples; while for the cell lines, the calibrator was the immortalized astrocyte.

### Statistical data analysis

Statistical analysis was performed using an ANOVA to compare the expression levels of both the precursor forms—pre-miR-128-1, pre-miR-128-2, and pre-miR-221—in GI, GIV, and NB and the mature forms of miR-124-3p, -128-1, and

221-3p in the samples of the four grades of astrocytoma and NB. These information were then compared to the clinical-pathological features in Table 1. Data analysis was performed with PRISM, version 5.0 (GraphPad, San Diego, CA, USA).

### Results

RT-qPCR analysis of the expression of the microRNAs -124-3p, -128-1, and -221-3p and variation in the expression between NB and Grade I to Grade IV astrocytomas

Results showed that in all grades of astrocytoma, the expression of the microRNAs was always lower in comparison to that of the normal brain tissue (Fig. 1b). In GIV, the most widely and statistically significant ( $p < 0.0001$ ) down-regulated miRNAs were miR-128-1 with an expression value of  $0.0081 \pm 0.0027$  (1,469-fold) and miR-124-3p at  $0.0099 \pm 0.002$  (407-fold) ( $p < 0.0001$ , in both cases); while the expression of miR-221-3p was  $0.0075 \pm 0.001$  (144 times less in GIV tumors) ( $p < 0.0029$ ). With respect to the GI and GIII tumors, miR-221-3p decreased  $0.25 \pm 0.022$  and  $0.24 \pm 0.005$  ( $p = 0.0171$ ,  $p = 0.0182$ ), respectively, (Fig. 1a). One important result was that the expression values of miR-124-3p and miR-128-1 between FFPE tissue and frozen tissues of GI were similar: for miR-124-3p,  $0.28 \pm 0.018$  vs.  $0.22 \pm 0.0007$ , respectively; and for miR-128-1,  $0.44 \pm 0.034$  vs.  $0.31 \pm 0.06$ , respectively. These results allow for comparisons with other studies that have quantified the expression levels of these microRNAs in both FFPE and fresh tissues. The levels of miR-221-3p were higher in the paraffin-embedded tissue than in the frozen samples:  $0.25 \pm 0.022$  vs.  $0.067 \pm 0.0043$ , a finding which suggests that, at least for this microRNA, it is important to make comparisons with other studies that have processed tissues fixed in paraffin. All of our results were achieved utilizing RNU48 as the reference, but the same tendency was observed upon performing expression analysis with RNU6B. Thus, RNU48 was chosen for use in all later analyses. The low expression of the mature forms of these microRNAs, primarily in GIV tumors, suggested the need to evaluate the expression of their precursor forms in an attempt to determine whether some mechanism during their biogenesis might be found to have been altered. The expression of pre-miR-128-1 was more abundant in NB ( $0.11$ ,  $\pm 0.006$ ) than in GI and GIV ( $0.007$ ,  $\pm 0.006$  and  $0.025$ ,  $\pm 0.01$ ), respectively, ( $p < 0.05$ ). In GIV, pre-miR-128-1 was 3.5 times more abundant than in GI, while pre-miR-128-2 and pre-miR-221 were also more abundant in GIV (1.7 and 3.6 times). In general, the precursor forms of the pre-microRNAs analyzed were more abundant in the GIV tumors compared to the levels expressed in the GI tumors (Fig. 2). On the basis of these results, it can be concluded that the reduction in the expression of the mature forms of miR-128-1, miR-128-2, and miR-221 is an important

# Perfil de expresión de microRNAs en astrocitomas pediátricos

**Table 1** Clinicopathological characteristics of patients studied and expression of miR-124-3p, -128-1, and -221-3p in astrocytomas

Grade	Patients	Sex F/M	Age in years (range)	<sup>b</sup> Type of resection C/I	<sup>a</sup> Patient survival A/D	Follow-up years (range)	miRNA expression for grade		
							124	128	221
GI	17	9/8	5.3 (0.4–13)	8/7	12/3	5.1 (0.4–11)	0.28	0.44	0.25
GII	9	5/4	9.1 (0.6–14)	0/7	3/3	2.1 (0.08–6.6)	0.22	1.03	0.38
GIII	16	8/8	8.8 (2–13)	2/8	0/9	1.1 (0.08–3)	0.19	0.55	0.24
GIV	15	9/6	9 (3–16)	3/9	0/11	2.4 (0.03–7.6)	0.009	0.008	0.007

F female, M male, A alive, D deceased, C complete, I incomplete

<sup>a</sup> Known in some patients

<sup>b</sup> Unknown as to the percentage of resection

characteristic of astrocytic tumors, especially those of Grade IV. The possible mechanisms that might explain this finding are discussed below.

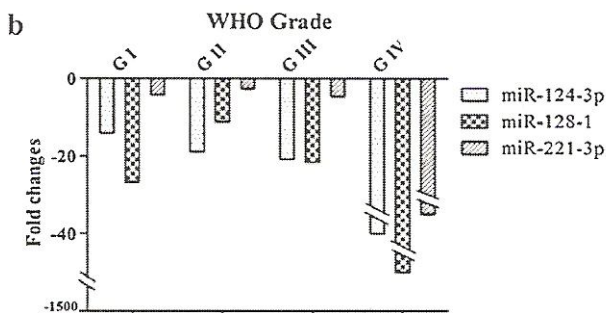
Analysis of the expression of the microRNAs -124-3p, -128-1, and -221-3p by RT-qPCR in low-grade and high-grade tumors

It is clear that miR-128-1 was the miRNA that decreased most significantly in GIV tumors ( $0.0081 \pm 0.002$ ) compared in

normal brain tissue ( $11.9 \pm 0.027$ ). However, after grouping and comparing the expression values from low-grade (GI, GII;  $0.7 \pm 0.023$ ) and high-grade (GIII, GIV;  $0.2 \pm 0.018$ ) types, this reduction in the high-grade cases was found not to be significant ( $p=0.14$ ), though this was the miRNA with the most dramatically low expression in these two grades of astrocytoma. In contrast, the expression of miR-221-3p did reveal a significant difference ( $p=0.0321$ ) between the two groups, as it showed a higher expression in the low-grade cases (GI, GII;  $0.28 \pm 0.017$ ) than in the high-grade ones (GIII, GIV;  $0.12 \pm 0.010$ ) (Fig. 3a). These results lead to the conclusion that the significant reduction in the expression of these miRNAs is the characteristic of malignant entities, as the earlier analysis also showed, and that miR-221-3p appears to constitute a marker of tumor progression in astrocytomas, especially high-grade ones (Fig. 1).

**a**

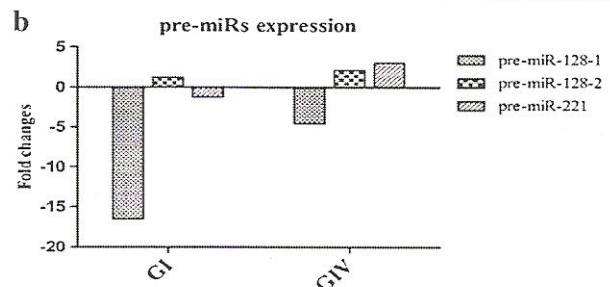
Grado	miR-124-3p	miR-128-1	miR-221-3p
GI	$0.288 \pm 0.018^{**}$	$0.445 \pm 0.034^{**}$	$0.259 \pm 0.022^*$
GII	$0.223 \pm 0.014^{**}$	$1.030 \pm 0.007^{**}$	$0.388 \pm 0.010$
GIII	$0.194 \pm 0.013^{**}$	$0.559 \pm 0.009^{**}$	$0.244 \pm 0.005^*$
GIV	$0.0099 \pm 0.002^{**}$	$0.0081 \pm 0.0027^{**}$	$0.0075 \pm 0.001^{**}$
NB	$4.056 \pm 0.032$	$11.916 \pm 0.027$	$1.096 \pm 0.023$



**Fig. 1** **a** Comparison of the values of the expression of microRNAs -124-3p, -128-1, and -221-3p for the four grades of astrocytoma and normal brain tissue ( $\pm$ s.d.). **b** Shows the fold changes that decreased the miRNAs; miR-128-1 was down-regulated more significantly compared to normal brain tissue.  $^*p<0.05$ ,  $^{**}p<0.01$

**a**

Grado	pre-miR-128-1	pre-miR-128-2	pre-miR-221
GI	$0.0071 \pm 0.006^*$	$0.0022 \pm 0.017$	$0.0016 \pm 0.007$
GIV	$0.0254 \pm 0.01^*$	$0.0038 \pm 0.01$	$0.0058 \pm 0.008$
NB	$0.1188 \pm 0.006^*$	$0.0017 \pm 0.002$	$0.0019 \pm 0.008$



**Fig. 2** **a** Comparison of the values of the expression of pre-microRNAs -128-1, 128-2, and -221-3 for the two grades of astrocytoma and normal brain tissue ( $\pm$ s.d.). **b** Shows the number of times that the expression of the pre-microRNAs changed with respect to NB. In GI, the pre-miR-128-1 declined 16.5 times, and in GIV, 4.6 times.  $^*p<0.05$ . In GIV, the precursor forms of all three microRNAs were more abundant compared to GI



Analysis of the expression of the microRNAs -124-3p, -128-1, and -221-3p by RT-qPCR in cell lines

Finally, the decision was taken to analyze the expression of the microRNAs in four astrocytoma cell lines. In the case of miR-124-3p, results showed a reduction in the four cell lines that were similar to the expression of this miRNA seen in all four grades of astrocytoma (Fig. 4a). However, while in culture, these cell lines underwent, and manifested, some alterations, including a reduced differentiation in the cases of D54-MG and T98G, which were isolated from the tumors of patients with glioblastomas (Grade IV). These lines were the only ones with a reduced expression of miR-128-1 (Fig. 4b). Finally, the expression of miR-221-3p was greater in the four lines of astrocytoma compared to those in the SVGp12 cells. This finding can be explained, in part, because this microRNA is related to cell proliferation under in vitro conditions, and these astrocytoma cell lines were seen to undergo an important process of cell division during the culture period. These results concerning expression in cell lines corroborate the finding that the reduction of miR-124-3p characterizes astrocytic tumors and astrocytoma cell lines and that the reduction in the expression of miR-128-1 also characterizes high-grade tumors and the cell lines isolated from Grade IV tumors. Due to the phenomenon of cell proliferation, miR-221-3p was seen to increase in all four cell lines.

Discussion

Currently, it is well documented that miRNAs can contribute to the development and progression of cancers and that the abnormal expression of miRNAs in human cancers is significantly associated with the patient’s prognosis [33]. The profiling of miRNA expression showed that all of these are down-regulated in tumors than in normal brain tissue [9, 21, 33]. Distinct patterns of the expression of miRNAs have been described in both low- and high-grade astrocytomas, including the pilocytic (GI), diffuse (GII), and anaplastic (GIII) types, as well as in glioblastoma multiforme (or GBM, GIV) in adults [7, 8, 14, 37], but information on pediatric patients is scarce [2, 13]. This study analyzed the expression of eight miRNAs as it relates to differentiation and proliferation and found that their implication in cancer is significant. We then selected three miRNAs that showed especially significant differential expression: miR-124-3p, -128-1, and 221-3p. MiR-124 has been implicated in the differentiation of glioma stem cells in adult tumors, while miR-128-1 is known to promote a pro-survival, undifferentiated, self-renewing state [12, 30]. In adult tumors, miR-221 has been reported to have an ambivalent function; on the one hand, enhanced cell proliferation that inhibits p<sup>27kip1</sup> (a negative regulator of the cell cycle), and, on the other, inhibition of cell growth [10, 19]. Given the importance of the cellular function of these miRNAs, the purpose of this study was to analyze the expression of three specific miRNAs (-124-3p, -128-1, and -221-3p) in pediatric astrocytomas and its relation to the certain characteristics of the tumors and patients. Results of RT-qPCR demonstrate that the down-regulation of these miRNAs correlates significantly with the WHO’s histological grades of glioma and that it distinguishes important groups according to clinical–pathological data as well as their low expression. Specifically, miR-124-3p, -128-1, and -221-3p were significantly down-regulated in the higher-grade GIV, which is an important group, thus suggesting a possible tumor-suppressor function in pediatric astrocytomas. In general, the levels the expression of the precursor forms of the miRNAs were more abundant in the GIV tumors compared to the levels expressed in normal brain tissue and in GI. This could mean that the extent of the alteration of the biogenesis of the mature microRNAs increases in proportion to the increasing severity of the tumor. In this regard, Moore [23] described an increase in the expression of some miRNAs as tumor degree increased, though no changes were seen in the precursor forms [23]. The expression of pre-miR-128-1 was abundant in the normal brain tissue, but declined significantly in GI (16.5 times). Few genetic alterations have been described in pilocytic astrocytomas, but their reduction could be due to very subtle genetic and/or epigenetic changes that have not yet been described. On this point, Ho [13] considered that epigenetic and post-transcriptional regulation may play an important role

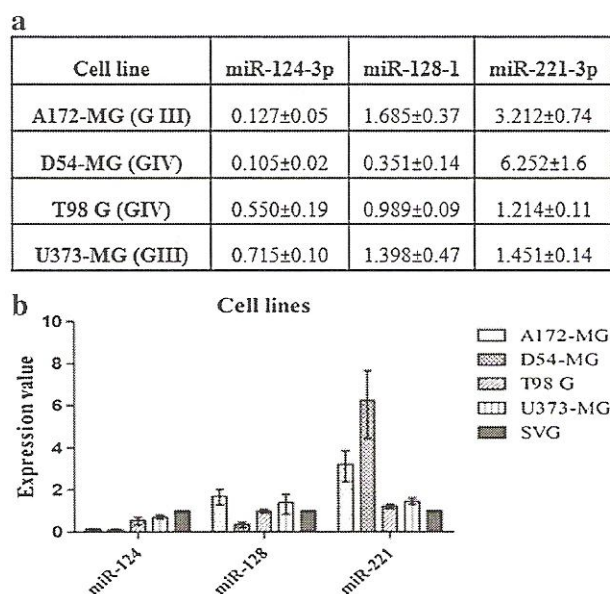


Fig. 4 a Expression level of microRNAs -124-3p, -128-1, and -221-3p analyzed by the 2<sup>-ΔΔCt</sup> method in the four cell lines of astrocytoma. MiR-221-3p was up-regulated in all cell lines. b The expression levels of each miRNA were compared to the SVGp12 cell line of normal astrocytes



in the pathogenesis of pilocytic astrocytomas [13]. Ciafrè et al. [7], meanwhile, used microarray to identify a group of miRNAs whose expression is significantly altered in the adult cases of GBM. They reported the down-regulation of miR-128 and up-regulation of miR-221 [7]. In another study, Silber et al. [30] reported the down-regulation of miR-124 in anaplastic astrocytomas and GBM and down-regulation of miR-128 only in GBM, also in adult cases [30]. Recently, Ho [13] reported that a pilocytic astrocytoma manifested a reduction in the expression of miR-124 compared to normal brain tissue and suggested that the activation of the MAPK route (one of the principle pathways that has been seen to suffer alterations in these astrocytomas) can modify the expression of the microRNAs [13]. In accordance with the findings from Lakomy et al. [17] and Rao et al. [25], we observed significantly lower levels of miR-221-3p in GIV astrocytoma tissue compared to normal brain tissue [17, 25]. Similarly, Srinivasan et al. [32] observed a down-regulated miR-221 in a group of GBM [32]. In contrast to these reports, a literature review shows that miR-221 has been described as an oncogene that is highly expressed in high-grade astrocytomas in adults [7, 8, 10, 19]. In the present study, glioma cell lines expressed high levels of this microRNA; however, they were isolated from gliomas in adults, so a more suitable model for proving this finding *in vitro* would be to conduct an analysis using high-grade cell lines from gliomas in children. Unfortunately, such cell lines are not commercially available, likely because of the difficulty involved in isolating them, as those tumors are characterized by their low proliferation capacity. The disparity in the expression of miR-221 between the Grade IV tumors in adults and children confirms that these two tumor entities are distinct. Analysis *in silico* of the targets of the mature sequence of the miR-221 can reveal the main genes that are differentially regulated in adult and pediatric tumors.

MiR-124-3p and -128-1 are considered tumor suppressors and are highly expressed in the brain, where they promote neural differentiation [11, 30], yet the present study found that their expression was low in all four tumor grades, most evidently in the GIV tumors, a result that may suggest their participation in astrocytic differentiation in children. In addition, our current observations showed that both miR-124-3p and miR-128-1 were also down-regulated in the human glioma cell lines than in the immortalized astrocyte cell lines. These findings agree with those reported by Ciafrè et al. [7], who similarly observed a low level of expression and a lack of differentiation in the tumor cells they analyzed. With respect to GBM, different genetic alterations have been reported that might, in some way, explain the low expression of these microRNAs, as in the case of deletion in the 2q chromosome, where the miR-128-1 is located (2q21.3) [1, 15]. However, gains of 2q31-32 have also been reported, which might indicate that this is a region marked by

genetic instability [26]. For the cases of miR-124-3p (20q13.33) and miR-221 (Xp11.3), no genetic alterations have been reported to date [1, 15, 26, 28].

Little is yet known about the role of miRNAs as prognostic indicators in pediatric tumors; however, in this study, a higher expression of miR-124-3p, miR-128-1, and miR-221-3p was observed in the astrocytomas of live patients with a significant difference only in the case of the expression of miR-221-3p in a group that included principally patients with low-grade tumors. In the live patients and those free of recurrence, a higher expression of miR-221-3p was found. However, recent data from adult patients have shown that miR-221 was up-regulated in GBM and associated with poorer overall survival [35]. Thus, these controversial data require further investigation in order to determine their association with age. Consistent with other glioma miRNA profiling studies [19, 29–31], we also observed the down-regulation of miR-124-3p and miR-128-1, which indicates that miR-124-3p and miR-128-1 are likely acting to limit tumor development. The reduction of these microRNAs may promote the loss of the differentiation of the tumor cells, as in the case of astrocytic cells. A similar response was seen in the cell lines, as those isolated from Grade III tumors, such as A172-MG and U373-MG, presented high levels of miR-128-1. Among its target molecules, we find the transcription factor E2F3a, an activator of the cell cycle that participates in the processes of cell proliferation and apoptosis. This can be explained in part because the reduction of miR-128-1 allows an increase of E2F3a and thus activates cell proliferation [36].

The expression of miR-128 decreased significantly in the supratentorial tumors, probably due to the fact that they are normally high-grade tumors that progressively lose the differentiation markers and, in consequence, expression of this miRNA. MiR-128 promotes neural differentiation and, surely, astrocytic differentiation as well, as this is seen to decrease in these tumors [11, 12].

It can be concluded that the reduction of the microRNAs -124-3p, 128-1, and 221-3p is the characteristic of pediatric astrocytomas, especially low levels of miR-221-3p, which permits the characterization of high-grade astrocytomas and recurrent tumors in patients who died from this disease. Different grades of astrocytomas are characterized by distinct genetic alterations, and several pathways could apply to microRNAs. The main goal to be achieved, then, is to characterize and demonstrate that a set of microRNAs exerts regression effects on astrocytomas and tumor progression. The microRNAs -124-3p and -128-1 could constitute two forms that have potential medical applications. It is important to characterize mRNA and the target proteins that participate in deregulating the processes of astrocyte differentiation because, in the context of pediatric astrocytomas, these microRNAs manifest tumor-suppressor behavior. In fact, fluorescent *in situ* hybridization and alterations of Dicer or other



proteins of the RISC complex are currently being performed in order to prove whether alterations in gene copies and/or the production of mature miRNAs could be altered, especially in cases of high-grade astrocytomas (GIII and GIV).

**Acknowledgments** This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences at the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). M.P Eguía-Aguilar acknowledges the financial support provided by the UNAM.

**Ethical standards** The study was approved by the Ethics Committee of the *Hospital Infantil de México Federico Gómez* and has therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki and its later amendments. All persons gave their informed consent prior to their inclusion in the study.

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflict of interest.

**Funding** Federal Grants to the *Hospital Infantil de México Federico Gómez*, HIM/2010/044; SSA 916; Asociación Gral. y Lic. Aarón Sáenz Garza, A.C. Support for the *Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas*- Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

## References

- Bax D, Mackay A, Little S, Carvalho D, Viana-Pereira M, Tamber N, Grigoriadis A, Ashworth A, Reis R, Ellison D, Al-Sarraj S, Hargrave D, Jones C (2010) A distinct spectrum of copy number aberrations in paediatric high grade gliomas. *Clin Cancer Res* 16:3368–3377. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-0438
- Birks D, Barton V, Donson A, Handler M, Vibhakar R, Foreman N (2011) Survey of microRNA expression in pediatric brain tumors. *Pediatr Blood Cancer* 56:211–216. doi:10.1002/pbc.22723
- Chan J, Krichevsky A, Kosik K (2005) MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 65: 6029–6033. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-0137
- Chico-Ponce de León F, Castro-Sierra E, Pérezpeña-Díazconti M, Gordillo-Domínguez L (2006) Tumores intracraneales del niño. *Bol Med Hosp Infan Mex* 63:367–381
- Cho W (2007) OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Mol Cancer* 6:60. doi:10.1186/1476-4598-6-60
- Chung-sean J, Kei W, Chen Z, Ng H (2009) Oncogenic role of microRNAs in brain tumors. *Acta Neuropathol* 117:599–611. doi: 10.1007/s00401-009-0525-0
- Ciafrè S, Galardi S, Mangiola A, Ferracin M, Liu C, Sabatino G, Negrini M, Maira G, Croce C, Farace M (2005) Extensive modulation of a set microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 334:1351–1358. doi:10.1016/j.bbrc.2005.07.030
- Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello C, Cardali S, Angileri F, Maio F, Cama A, Germano A, Vita G, Tomasello F (2009) MiR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. *J Neurooncol* 93:325–332. doi:10.1007/s11060-009-9797-4
- Deng S, Calin G, Croce C, Coukos G, Zhang L (2008) Mechanisms of microRNA deregulation in human cancer. *Cell Cycle* 7:2643–2646. doi:10.4161/cc.7.17.6597
- Gillies J, Lorimer I (2007) Regulation of p27<sup>kip1</sup> by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle* 6:2005–2009. doi:10.4161/cc.6.16.4526
- Godlewski J, Newton H, Chiocca E, Lawler S (2010) MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death Differ* 17: 221–228. doi:10.1038/cdd.2009.71
- Godlewski J, Nowicki M, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, RayChaudhury A, Newton H, Chiocca A, Lawler S (2008) Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 68:9125–9130. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2629
- Ho C, Bar E, Giannini C (2013) MicroRNA profiling in pediatric pilocytic astrocytoma reveals biologically relevant targets, including PBX3, NFIB, and METAP2. *Neuro Oncol* 15:69–82. doi:10.1093/neuonc/nos269
- Jiang L, Mao P, Song L (2010) MiR-182 as a prognostic marker for glioma progression and patients survival. *Am J Pathol* 177:29–37. doi:10.2353/ajpath.2010.090812
- Jin S, Sun C, Yu S, Wang Q, Wu W, Sun Y, Zhao W, An T (2010) Chromosome DNA imbalances in human astrocytic tumors: a comparative genomic hybridization study of 63 Chinese patients. *Pathol Res Pract* 206:674–681. doi:10.1016/j.prp.2010.05.012
- Kleihues P (2000) Astrocytic tumors. In: Kleihues P, Cavenee W (eds) *Pathology & genetics of tumours of the nervous system*, 3rd edn. IARC Press, Lyon, pp 9–51
- Lakomy R, Sana J, Hankeova S (2011) MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci* 102:2186–2190. doi:10.1111/j.1349-7006.2011.02092.x
- Lantos P, Louis D, Rosenblum M, Kleihues P (2002) Tumours of the nervous system. In: Graham D, Lantos P (eds) *Greenfield's neuropathology*, 3rd edn. Arnold, London, pp 767–1052
- Lee Y, Dutta A (2009) MicroRNAs in cancer. *Annu Rev Pathol* 4: 199–227. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092222
- Louis D, Ohgaki H, Wiestler O, Cavenee W, Burger P, Jouvet A, Scheithauer B, Kleihues P (2007) The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 114:97–109. doi:10.1007/s00401-007-0243-4
- Lu J, Getz G, Miska E, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert B, Mak R, Ferrando A, Downing J, Jacks T, Horvitz R, Golub T (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435:834–838. doi:10.1038/nature03702
- Mendell J (2005) Critical regulators of development, cellular physiology and malignancy. *Cell Cycle* 4:1179–1184. doi:10.4161/cc.4.9.2032
- Moore L, Kivinen V, Liu Y, Annala M, Cogdell D, Liu X, Liu C, Sawaya R, Yli-Harja O, Shumulevich I, Fuller G, Zhang W, Nykter M (2013) Transcriptome and small RNA deep sequencing reveals deregulation of miRNA biogenesis in human glioma. *J Pathol* 229:449–459. doi:10.1002/path.4109
- Nicoloso M, Calin G (2008) MicroRNA involvement in brain tumors: from bench to bedside. *Brain Pathol* 18:122–129. doi:10.1111/j.1750-3639.2007.00119.x
- Rao S, Santosh V, Somasundaram K (2010) Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod Pathol* 23:1404–1417. doi:10.1038/modpathol.2010.135
- Rickert C, Sträter R, Kaatsch P, Wassmann H, Jürgens H, Dockhorn-Dworniczak B, Werner P (2001) Pediatric high-grade astrocytomas show chromosomal imbalances distinct from adult cases. *Am J Pathol* 158:1525–1532
- Schmittgen T, Livak K (2008) Analyzing real time PCR data by the comparative Ct method. *Nat Protocol* 3:1101–1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
- Sharma S, Free A, Mei Y, Peiper C, Wang Z, Cowell K (2010) Distinct molecular signatures in pediatric infratentorial glioblastomas defined by CGH. *Exp Mol Pathol* 89:169–174. doi:10.1016/j.yemp.2010.06.009



29. Shi M, Wang J, Yan Z, You P, Li Y, Qian X, Yin Y, Zhao P, Wang Y, Wang F, Li N, Liu Z, Liu N, Jiang H (2012) MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS ONE* 7:1–10. doi:10.1371/journal.pone.0032709
30. Silber J, Lim D, Petrisch C, Persson I, Maunakea K, Yu M, Vandenberg R, Ginzinger G, James D, Costello F, Bergers G, Weiss A, Alvarez-Buylla A, Hodgson G (2008) MiR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 6:1–17. doi:10.1186/1741-7015-6-14
31. Skalsky R, Cullen B (2011) Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS ONE* 6:1–11. doi:10.1371/journal.pone.0024248
32. Srinivasan S, Pia I, Somasundaram K (2011) A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. *PLoS ONE* 6:1–7. doi:10.1371/journal.pone.0017438
33. Volinia S, Calin G, Liu G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, Visone R, Iorio M, Roldo C, Ferracin M, Prueitt L, Yanaihara N, Lanza G, Scarpa A, Vecchione A, Negrini M, Harris C, Croce M (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *PNAS* 103:2257–2261. doi:10.1073/pnas.0510565103
34. Zeng Y (2009) Regulation of the mammalian nervous system by microRNAs. *Mol Pharmacol* 75:259–263. doi:10.1124/mol.108.052118
35. Zhang C, Zhang J, Hao J (2012) High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *J Transl Med* 10:1–11
36. Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan X, Gong Y, Yin B, Liu W, Qiang B, Zhao J, Yuan J, Peng X (2009) MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med* 87:43–51. doi:10.1007/s00109-008-0403-6
37. Zhi F, Chen X, Wang S, Xia X, Shi Y, Guan W, Shao N, Qu H, Yang C, Zhang Y, Wang Q, Wang R, Zen K, Zhang C, Zhang J, Yang Y (2010) The use of hsa-miR-21, hsa-miR-106a as prognostic indicators of astrocytoma. *Eur J Cancer* 46:1640–1649. doi:10.1016/j.ejca.2010.02.003