



Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Medicina
División de Estudios de Posgrado
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en tumor
Rabdoide/Teratoide Atípico del sistema nervioso central en el
Hospital Infantil de México Federico Gómez

TESIS

Para obtener el título de especialista en:

Patología pediátrica

Presenta

Dr. Luis Humberto Cruz Contreras

Tutores de Tesis: Dra. María del Pilar Eguía Aguilar

Dr. Carlos Alberto Serrano Bello

Ciudad de México, Febrero 2016.





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.

HOJA DE FIRMAS



Dra. María del Pilar Eguía Aguilar

Doctora en ciencias, investigador del Hospital Infantil de México Federico Gómez,
Departamento de patología experimental y molecular

Dr. Carlos Alberto Serrano Bello

Maestro en ciencias, médico adscrito al departamento de patología Hospital
Infantil de México Federico Gómez

A mi esposa,

Por tu incondicional apoyo y paciencia.

*Agradezco a mis tutores, Dra. Eguía y Dr. Serrano,
por su apoyo y paciencia inagotable
por hacer parecer sencillo lo complejo.*

Índice

I. Resumen.....	5
II. Introducción.....	6
III. Marco teórico y antecedentes.....	6
1. MicroRNA	6
1.1. MicroRNA y cáncer	7
2. Tumor Rabdoide Teratoide Atípico	7
2.1. Clasificación	7
2.2. Historia	8
2.3. Epidemiología.....	8
2.4. Características clínicas	8
2.5. Patología.....	9
2.6. Genética	11
2.7. Pronóstico.....	11
3. MicroRNAs en tumores del SNC	12
3.1 miR-100	12
3.2 miR-221	13
IV. Planteamiento del Problema	14
V. Pregunta de investigación:.....	14
VI. Justificación	14
VII. Hipótesis.....	15
VIII. Objetivos.....	15
IX. Material y Métodos.....	15
X. Plan de análisis estadístico.....	18
XI. Descripción de variables.....	18
XII. Resultados	19
XIII. Discusión.....	25
XIV. Conclusiones.....	26
XV. Limitación del estudio.....	27
XVI. Cronograma de actividades	27
XVII. Referencias	27

I. Resumen

Introducción: En niños los tumores de sistema nervioso ocupan el segundo lugar de incidencia después de las leucemias, el tumor Rabdoide/teratoide atípico (TR/TA) representa del 1 a 2 % de todos los tumores pediátricos de sistema nervioso central, es un tumor de comportamiento agresivo y de mal pronóstico a corto plazo. En años recientes numerosas investigaciones se enfocan en determinar la función de los microRNAs en la biología del cáncer, existen escasos estudios que exploran su función en TR/TA.

Objetivos: Determinar el perfil de expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en los casos de TR/TA en nuestro hospital.

Materiales y métodos: Se analizaron muestras tumorales de tejido fijado en formol e incluido en parafina con lesión representativa, se realizó extracción del RNA y amplificación mediante RT-PCR cuantitativa.

Resultados: Se encontraron diferencias significativas en la expresión de ambos microRNAs en TR/TA en comparación con los controles. Hsa-miR-100 se encontró sub-expresado, mientras que hsa-miR-221 se encontró sobre-expresado.

Discusión: La alteración encontrada en la expresión de ambos microRNAs proporciona información importante sobre la progresión tumoral, y abre la posibilidad de aumentar el estudio a un mayor número de muestras que nos permita definir su posible utilización como biomarcadores para la detección de este tumor, además abre la posibilidad a nuevas modalidades terapéuticas.

Conclusiones: Aunque sabemos que la expresión de estos microRNAs está alterada en TR/TA como en otras neoplasias, es necesario poseer mayor entendimiento de los mecanismos por los que ejercen su efecto en el desarrollo, crecimiento y progresión tumoral para poder aplicarlos como biomarcador en cáncer y como blancos terapéuticos

II. Introducción

En niños los tumores de sistema nervioso ocupan el segundo lugar de incidencia después de las leucemias, el tumor Rabdoide teratoide atípico (TR/TA) representa del 1 a 2 % de todos los tumores pediátricos de sistema nervioso central (Ginn & Gajjar, 2012), es un tumor de comportamiento agresivo y de mal pronóstico a corto plazo (Louis et al., 2007). La característica más frecuente de estos tumores es la mutación o pérdida en la expresión del gen INI1 (hSNF5/SMARCB1) localizado en el Cromosoma 22q11.2 (Dang et al., 2003). La participación de los microRNAs dentro de estas vías moleculares ha sido poco explorada, sin embargo es el centro de múltiples 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.

III. Marco teórico y antecedentes

1. MicroRNA

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 (Hayes, Peruzzi, , 2014). 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, se han identificado 2,588 formas maduras de miRNAs en el genoma humano hasta el momento (<http://microRNA.sanger.ac.uk> versión 21, junio 2014). 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 & Murphy, 2010).

Los microRNA se descubrieron en 1993 en estudios con *Caenorhabditis elegans*, tras su descubrimiento se ha reconocido que poseen un gran significado funcional. La función principal es regular la síntesis proteica uniéndose a el RNA mensajero

en la región 3' no traducida (3'-UTR), regulando negativamente su traducción (Hayes et al., 2014).

1.1. MicroRNA y cáncer

Aunque se han hecho enormes avances en los conocimientos disponibles sobre el cáncer, aún encontramos fenómenos en el comportamiento biológico de las neoplasias que no podemos explicar por los medios actuales, por ejemplo casos que histológicamente presentan características de buen pronóstico, pero terminan comportándose de manera agresiva y letal (Bandrés, 2009). En años recientes numerosas investigaciones se enfocan en determinar la función de los microRNAs en la biología del cáncer, algunas han demostraron la importancia de ciertos microRNAs en la regulación de la expresión del RNA mensajero, modificando así el crecimiento tumoral, la capacidad de invasión, la angiogénesis y evasión inmune. Esto ha dado lugar a la creación de perfiles tumorales de microRNAs que permiten la subclasificación en grupos pronósticos y de tratamiento. Se reconoce el papel de los microRNAs (miRNAs) en la fisiopatología de varios tipos de tumores (Cho, 2007; Nicoloso, Kipps, Croce & Calin, 2007), sin embargo cada neoplasia tiene un perfil de miRNA característico que los distingue de sus contrapartes normales (Hayes et al, 2014).

En el año 2002 por primera vez se asoció la alteración de miRNAs en el cáncer, en ese entonces se encontró sub-expresión del miR-15 y miR-16 en leucemia linfocítica crónica, estos miRNAs actúan como inhibidores del factor antiapoptótico bcl-2, por lo tanto, la sub-expresión de estos ocasiona reactivación de bcl-2 e inhibición de la apoptosis (Bandrés, 2009). Además la detección de estos microRNAs asociados a cáncer se puede realizar en distintos fluidos corporales lo cual permite un diagnóstico y monitoreo menos invasivo (Hayes et al, 2014).

2. Tumor Rabdoide Teratoide Atípico

2.1. Clasificación

El tumor Rabdoide Teratoide Atípico (TR/TA) se encuentra en la clasificación de la OMS entre los tumores embrionarios del sistema nervioso central, junto con el meduloblastoma y el tumor neuroectodérmico primitivo. Todas las neoplasias de

este grupo son grado IV en la clasificación de la OMS, es decir son tumores de comportamiento agresivo y de mal pronóstico a corto plazo (Louis et al., 2007).

2.2. Historia

Los tumores Rabdoides son un grupo de neoplasias, que inicialmente fueron descritas en riñón como un subtipo de nefroblastoma por Beckwith y Palmer en 1978 (Shitara & Akiyama, 2014). Posteriormente se describieron en tejidos blandos. Fue hasta 1985 que se reportó el primer caso en SNC. Se han reportado casos en localizaciones poco frecuentes como en el corazón (Bartelheim et al., 2014).

2.3. Epidemiología

Este tumor representa el 1 a 2 % de todos los tumores pediátricos de sistema nervioso central (Ginn & Gajjar, 2012). Se presenta con mayor frecuencia en niños menores de 3 años. En adultos solo se han reportado 42 casos (Shitara & Akiyama, 2014)

2.4. Características clínicas

- **Localización:** El tumor TR/TA se presentan con mayor frecuencia en la región supratentorial. La relación reportada en la literatura de localización supratentorial-infratentorial es 1.3:1. Los tumores supratentoriales se localizan frecuentemente en los hemisferios cerebrales, en el sistema ventricular, en la región supraselar y región pineal. Los tumores infratentoriales se presentan en el ángulo pontocerebeloso y en el tallo cerebral. Se han reportado también casos en la médula espinal. (Adesina & Hunter, 2010) (Fenton & Foreman, 2003)
- **Manifestaciones clínicas:** Las manifestaciones son variables dependiendo de la localización, edad del paciente, y tamaño del tumor. La mayoría de las veces no son específicas y consisten en letargo, vómito y dificultad para la deglución. Puede haber lateralización de la cabeza y parálisis de nervios craneales. (Louis et al., 2007). La diseminación leptomeningea es frecuente, y puede ser la manifestación inicial en algunos pacientes (Adesina & Hunter, 2010)

- **Estudios de Imagen:** Los tumores suelen ser isointensos o hiperintensos en secuencias FLAIR (Fluid attenuated inverse recovery), son de aspecto heterogéneo, pueden mostrar áreas quísticas y zonas de necrosis. La espectroscopía muestra elevación de la colina, también puede haber elevación de lípido y lactato que correlaciona con necrosis tumoral. (Adesina & Hunter, 2010)

2.5. Patología

Macroscópicamente estos tumores son rojo o rosa y de consistencia blanda, se delimitan bien del parénquima adyacente, pueden contener áreas de necrosis y hemorragia.

El diagnóstico microscópico puede ser difícil debido a la variabilidad morfológica que presentan. Lo más característico es la presencia de células rabdoideas las cuales tienen núcleo excéntrico con cromatina vesicular y nucléolo eosinófilo. El citoplasma es amplio y presenta una inclusión eosinófila paranuclear, la cual por estudio ultraestructural está compuesta por haces de filamentos intermedios. El aspecto rabdoide característico sin embargo solo está presente focalmente en algunas de las células neoplásicas, solo el 25% de los tumores están compuestos exclusivamente de células de aspecto rabdoide (Bishop & Ali, 2012). El resto de las células puede presentar citoplasma escaso, y núcleos menos pleomórficos. Las células se disponen en nidos y mantos. De manera adicional la mayoría de los tumores presentan otros componentes, de ahí el término “teratoide” (Bishop & Ali, 2012). Estos componentes consisten en áreas de tumor neuroectodérmico primitivo, áreas de aspecto mesenquimal y áreas de aspecto epitelial, esta última siendo la menos común. Usualmente las mitosis son abundantes y presentan grandes áreas de necrosis geográfica (Louis et al., 2007).

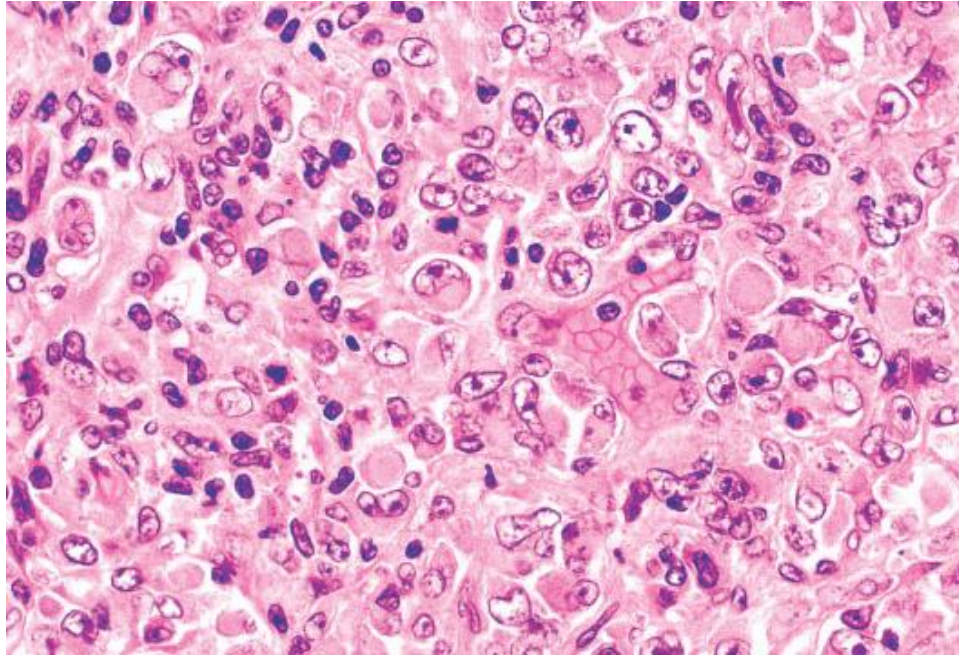


Figura 1. Aspecto histológico característico. Las células de aspecto rabdoide son grandes, con un núcleo excéntrico que muestra un nucléolo grande y una inclusión paranuclear eosinofílica.

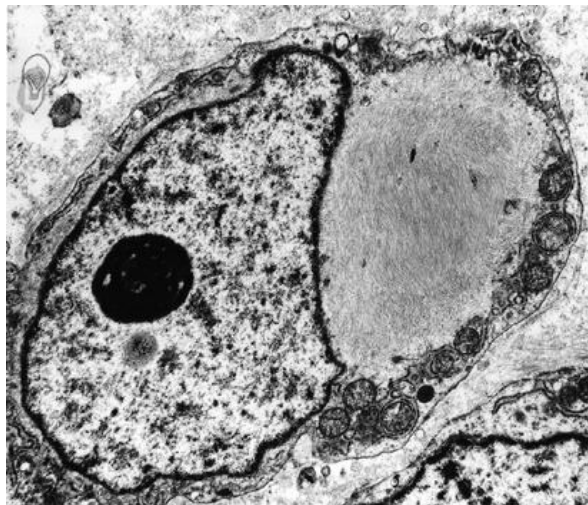


Figura 2. El estudio ultraestructural de los tumores rabdoide muestra que la inclusión citoplásmica paranuclear está compuesta de filamentos intermedios (tomado de Ordóñez, 2006)

Inmunohistoquímica: El marcador que con mayor frecuencia se expresa es la vimentina, seguido de la expresión de antígeno de membrana epitelial (EMA). Otros marcadores que con frecuencia se expresan son actina de músculo liso (SMA), proteína ácido glial fibrilar, sinaptofisina, y citoqueratinas. Aunque las células

rabdoïdes pueden ser positivas para actina de músculo liso, no expresan miogenina ni desmina lo cual indicaría una diferenciación rabdomioblástica verdadera (Bishop & Ali, 2012). Otro marcador de importancia es la proteína INI1 la cual muestra expresión nuclear en tejidos no neoplásicos y en la mayoría de las neoplasias consideradas como diagnóstico diferencial, mientras que en el tumor Rabdoïde teratoïde atípico hay pérdida total de expresión, lo cual la hace altamente sensible y específica para el diagnóstico (Bishop & Ali, 2012).

Índice de proliferación

Las células del TR/TA muestran un índice de proliferación alto, lo que traduce una alta expresión de Ki-67, usualmente mayor al 50% (Louis et al., 2007)

Histogénesis

La histogénesis de estos tumores no se conoce. Se cree que proviene de una célula fetal pluripotencial (Louis et al., 2007).

2.6. Genética

Estos tumores se pueden presentar de manera esporádica o bien asociados al síndrome de predisposición al tumor Rabdoïde Teratoïde. La característica más frecuente de estos tumores es la mutación o pérdida en la expresión del gen INI1 (hSNF5/SMARCB1) localizado en el Cromosoma 22q11.2. El gen pertenece al grupo de SWI/SNF del complejo de remodelación de la cromatina, y es importante para la formación del huso mitótico y para la regulación del ciclo celular (Ginn & Gajjar, 2012). La pérdida de expresión de INI1 por inmunohistoquímica se presenta en la mayoría de los tumores Rabdoïdes teratoïdes atípicos, mientras que por biología molecular las mutaciones o pérdidas son demostrables hasta en el 75%, lo cual hace a la inmunohistoquímica como el método de elección para detectar la inactivación del INI1 (Bishop & Ali, 2012)

2.7. Pronóstico

En general el pronóstico es malo. En una serie con 55 pacientes reportaron una supervivencia media posterior a la cirugía de 11 meses (Louis et al., 2007). La supervivencia es especialmente baja para pacientes con metástasis al momento del

diagnóstico. Los factores pronósticos más importantes en la experiencia de nuestra institución son la extensión de la resección, la edad del paciente y la enfermedad metastásica (Zárate, 2011).

3. MicroRNAs en tumores del SNC

En el caso de los tumores de SNC, se han identificado diversos microRNAs que están relacionados con el desarrollo tumoral. En los tumores en los que se genero mayor información son astrocitomas y meduloblastomas, en el caso del tumor Rabdoide hay un número escaso de estudios, entre los que destaca el estudio realizado por Treiger et al. donde exploraron la expresión de 365 microRNAs, encontrando sobre-expresión de miR-221 y miR-222, la cual correlacionaron con la baja expresión de una de sus moléculas blanco como es p27 (Treiger et al., 2010). Los microRNAs que se exploraron en este trabajo fueron miR-100 y miR-221. En estudios previos realizados en nuestra institución en astrocitomas, meduloblastomas y ependimomas se encontró alterada de manera significativa la expresión de ambos microRNAs (datos no publicados). A continuación se describen los principales estudios en los que han sido reportados.

3.1 miR-100

El miR-100 ha sido estudiado en varias neoplasias, como carcinoma hepatocelular, carcinoma de mama, carcinoma de tiroides, adenocarcinoma endometrial, carcinoma escamoso de esófago y carcinoma de próstata entre otros (Zhou et al., 2014). En todos ellos se han encontrado cambios lo cual lo hace atractivo como un marcador sensible y no invasivo para el diagnóstico de cáncer (Qin, Huang, & Wang, 2015). Diferentes estudios han demostrado que actúa como supresor tumoral a través de múltiples vías. La vía mTOR (mechanistic target of rapamycin) que regula la síntesis de proteínas y crecimiento celular y PLK1 (polo-like kinase) que pertenece a una familia de quinasas que regulan la replicación del ADN y la mitosis, ambas se han identificado como blanco directo de miR-100 (Chen, Zhao, & Ma, 2013; Liu, 2015). La sobre-expresión de miR-100 produce inhibición de la vía mTOR. La sobreexpresión de miR-100 sensibiliza las células del condrosarcoma resistentes a cisplatino haciéndolas nuevamente sensibles a él. (Zhu et al., 2014).

A través de la vía PLK1, la sobre-expresión de miR-100 ocasiona citotoxicidad in vivo e in vitro (Qin et al., 2015). Estudios en astrocitomas y glioblastomas han mostrado sub-expresión de miR-100 (Alrfaei, Vemuganti, & Kuo, 2013)

3.2 miR-221

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, Burge, & Bartel, 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 p27kip1 como un blanco directo de miR-221/miR-222. P27kip1 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 & Lorimer, 2007) . 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)

El miR-221 se ha encontrado sobre-expresado en heces de pacientes con lesiones pre-invasoras epiteliales de colon, surgiendo como una opción prometedora para su exploración en el carcinoma colorectal (Yau et al, 2014). Específicamente en tumor

Rabdoide teratoide atípico se ha encontrado sobre-expresión de miR-221, que estimula la proliferación promoviendo la progresión de las fases del ciclo celular en las células neoplásicas, se ha identificado a p27 (un inhibidor del ciclo celular) como probable blanco específico de miR-221, el cual se correlaciona de manera inversa a la expresión de miR-221 (Shalaby, et al., 2014).

IV. Planteamiento del Problema

Existe poca información disponible acerca de este tumor. El diagnóstico se basa en criterios morfológicos e inmunohistoquímicos, así como en alteraciones genéticas características. Los miR-100 y miR-221 son microRNAs cuya expresión tiene efectos directos en la proliferación celular y apoptosis en varias neoplasias. Los estudios sobre la expresión de miR-100 es muy limitada en tumores de SNC, existe un reporte en astrocitomas en el que se encontró con expresión alterada (Alrfaei et al., 2013). En otro estudio que incluyó astrocitomas, meduloblastomas y ependimomas (datos no publicados) se encontró sobre-expresado lo que sugiere que tiene una función importante en la patología de los tumores de SNC. En el caso de miR-221 existe un estudio en el tumor Rabdoide en el que lo encontraron sobre-expresado (Sredni et al., 2010). En un modelo experimental la inhibición de este microRNA redujo el crecimiento en un tumor de próstata por lo que puede considerarse como un biomarcador potencial (Mercatelli et al., 2008) sin embargo es necesario caracterizar su expresión en un mayor número de casos de TR/TA.

V. Pregunta de investigación:

¿Cuál es la expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en los tumores TR/TA del sistema nervioso central?

VI. Justificación

Los conocimientos sobre el TR/TA han cambiado mucho en los últimos años con la introducción de técnicas como la inmunohistoquímica y la biología molecular, sin embargo hay muchos aspectos que aún se desconocen. Entre estos aspectos se encuentra la histogénesis, los perfiles de expresión de microRNAs. El generar mayor conocimiento acerca de esta neoplasia puede proporcionarnos las herramientas para entender su histogénesis, y el comportamiento biológico, y

posteriormente identificar blancos terapéuticos, que podrían modificar el pronóstico de estos pacientes.

VII. Hipótesis

- Los microRNAs hsa-miR-100 y hsa-miR-221 se encuentran diferencialmente expresados en el TR/TA en comparación con el tejido cerebelar de paciente no oncológico.

VIII. Objetivos

Objetivo general

- Describir el perfil de expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en los casos de TR/TA en nuestro hospital.

Objetivo específicos

- Cuantificar y comparar el perfil de expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en el TR/TA con controles de cerebelo normal
- Describir la frecuencia del tumor Rabdoide/Teratoide atípico del sistema nervioso central en el Hospital Infantil de México Federico Gómez
- Describir la frecuencia de los casos asociados a síndrome de predisposición a tumor Rabdoide
- Describir las características de presentación clínica
 - Edad de presentación
 - Tamaño del tumor
 - Localización.
 - Manifestaciones clínicas de los pacientes

IX. Material y Métodos

Diseño del estudio y Criterios de selección.

Estudio transversal, comparativo y observacional. Se incluyeron:

- a) Muestras tumorales de tejido fijado en formol e incluido en parafina con lesión representativa (70%).
- b) Muestras de cerebelo normal como control, de tejido fijado en formol e incluido en parafina

Criterios de selección

- Muestras tumorales de tejido fijado en formol e incluido en parafina con diagnóstico de TR/TA con lesión representativa (70%), con los que cuente el departamento de patología del Hospital Infantil de México del año 2003 al 2014
- Expediente clínico completo.

Criterios de exclusión

- Material con RNA insuficiente
- Material con necrosis extensa (90%)

2.- Tamaño de la muestra a estudiar.

Tamaño de la muestra por conveniencia, se incluyeron todos los tumores con diagnóstico de TR/TA comprendidos en el periodo de 2003 a 2014. Se incluyeron 13 muestras de TR/TA, como control se incluyeron 11 muestras de cerebelo de autopsias de pacientes libres de cualquier tipo de tumor. Se excluyeron 9 casos con diagnóstico TR/TA por no contar con material suficiente y adecuado.

3.- Metodología:

3.1.- Se revisaron y seleccionaron todos los casos con diagnóstico de TR/TA.

3.2.- Extracción de RNA total: Se extrajo el RNA de las muestras de tejido en parafina utilizando la técnica con trizol.

3.3.- RT-qPCR: Se determinó la concentración y pureza del RNA total de cada muestra en un Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA). Se realizó tratamiento con DNAsa en todas las muestras y se incluyeron los que tuvieron una relación de A_{260}/A_{280} de 1.7 a 2.1.

3.4.- Se utilizaron sondas de hidrólisis (TaqMan) para amplificar los microRNAs hsa-miR-100 y hsa-miR-221, y el gen de referencia RNU48. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Stratagene 3500 (Agilent) con el programa de amplificación: 50°C 2min, 95 °C 10 min, posteriormente 40 ciclos a 95 °C 15 seg (desnaturalización) y 60 °C 1 min (alineamiento/extensión). Se realizó una

cuantificación relativa mediante el método Ct comparativo (Delta Ct). Los valores de expresión de los microRNAs se compararon contra los valores de expresión de los controles (cerebelo de paciente no oncológico) y el resultado se representó como el número de veces que la expresión se encontró alterada, para ello se tomaron en cuenta los siguientes parámetros: sobre-expresión se consideró cuando el número de veces fue mayor o igual a dos en el tumor en comparación con el control, sub-expresión cuando el número de veces fue dos veces menos en el tumor, en comparación con el control; se consideró expresión sin cambios cuando el número de veces fue menor de dos.

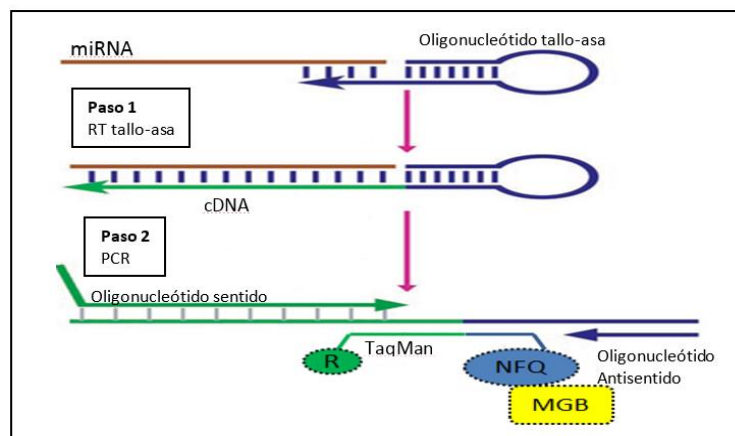


Figura 3. Descripción de la reacción de RT-qPCR. En el paso 1 a partir del oligonucleótido tallo asa se sintetiza el cDNA e incluye en su terminación 3' la secuencia específica de cada microRNA. En el paso 2 se lleva a cabo la reacción de qPCR, donde la sonda TaqMan, secuencia específica del microRNA, 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)

Consideraciones éticas

Riesgo de la investigación:

El presente protocolo es una investigación sin riesgo para los pacientes ya que el universo a estudiar son tejidos almacenados en el Departamento de Patología, no se harán intervenciones directas en pacientes.

Beneficios del estudio para los participantes y la sociedad en su conjunto:

El presente estudio no traerá beneficios directos para los propietarios de las muestras, sin embargo es un beneficio social porque podrá aportar conocimiento nuevo a cerca del comportamiento biológico de los TR/TA.

Confidencialidad

Nos comprometemos a asignar números seriados consecutivos con el fin de ocultar el numero biopsia asignado (número que vincula la biopsia con los datos clínicos de los pacientes) esto para guardar absoluta confidencialidad de los datos del paciente

Nos comprometemos a no contactar a los pacientes una vez obtenidos los resultados del estudio.

En caso de que se tenga RNA sobrante de las extracciones, nos comprometemos a que no se utilizará para otros fines que no sean los que se enlistan en este protocolo.

Selección justa de pacientes (muestras):

No aplica para los fines de este protocolo.

Consentimiento informado:

Es un estudio retrospectivo en el que se colectaron las muestras tumorales del Archivo del Departamento de Patología Clínica y Experimental y como parte del procedimiento institucional los familiares dan su consentimiento para la utilización del material biológico.

X. Plan de análisis estadístico

Los valores de expresión relativos se calcularon con la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. Se obtuvo el valor de expresión promedio de cada microRNA en el grupo de TR/TA y por separado para el grupo control. Se comparó la expresión de los microRNA estudiados entre los casos problema y los controles mediante la prueba “t-student” y se determinó las diferencias en la expresión.

XI. Descripción de variables

A continuación se describen las variables estudiadas

Variable	Definición conceptual	Definición operacional	Tipo de variable	Unidad de Medición
Edad	Tiempo transcurrido entre el nacimiento y la presentación del tumor	El consignado en el estudio de patología	Cuantitativa discreta	Meses
Sexo	Fenotipo de los pacientes	El consignado en los expedientes	Cualitativa nominal	Masculino o femenino
Localización tumoral	Localización dentro del sistema nervioso central	Supratentorial o infratentorial por estudios de imagen (expediente)	Cualitativa nominal	Supratentorial o infratentorial
Tipo de histología	Aspecto histológico del tumor	Mediante estudio microscópico determinar aspecto histológico	Cualitativa nominal	Pura o mixta
Expresión de miR-100	Valor de expresión por PCR	Medición mediante PCR en tiempo real	Cuantitativa continua	Valor numérico
Expresión de miR-221	Valor de expresión por PCR	Medición mediante PCR en tiempo real	Cuantitativa continua	Valor numérico

XII. Resultados

Características clínicas

De un total de 27,304 biopsias estudiadas en el departamento de patología en el periodo 2003-2014, se encontraron e incluyeron 13 pacientes con diagnóstico de TR/TA, el rango de edad fue de 3 a 118 meses, la media de presentación fue 13 meses. En relación al sexo 8 pacientes eran de sexo masculino y 5 femenino. La localización más frecuente fue infratentorial, la cual presentaban 8 pacientes (62%), mientras que 5 tuvieron localización supratentorial (38%). Ninguno de los casos se encontró asociado a tumor rabdoide en otros órganos. En todos los pacientes la resección del tumor fue parcial (Tabla 1). La manifestación clínica más frecuente fue la presencia de síndrome de cráneo hipertensivo (8/13 pacientes) (tabla 2).

Paciente	Edad (meses)	Sexo	Localización
1	2	M	I
2	15	F	S
3	10	F	I
4	36	M	S
5	24	M	S
6	12	F	I
7	3	F	I
8	14	M	I
9	118	M	S
10	31	F	S
11	11	M	I
12	11	M	I
13	12	M	I

Tabla 1. Datos clínico-patológicos de los pacientes como edad, sexo y localización de la neoplasia . I=Infratentorial, S=Supratentorial (n=13)

Manifestaciones clínicas

Hipertensión endocraneana	8/13
Convulsiones	3/13
Alteraciones de la marcha	3/13

Tabla 2. Manifestaciones clínicas de los pacientes (n=13)

Características histopatológicas

Histológicamente la mayoría de los tumores mostraron histología mixta (9/12), es decir tenían áreas de aspecto rabdoide clásicas con áreas distintas, principalmente áreas de aspecto neuroectodérmico primitivo, áreas papilares y áreas sólidas indiferenciadas. Se realizaron varios marcadores de inmunohistoquímica, considerando como positividad difusa aquellos que expresaban el marcador en 50% o más de las células neoplásicas y focal aquellos que expresaban menor del 50% de células neoplásicas. Todos los casos fueron positivos para vimentina de manera difusa y para citoqueratina AE1/AE3 (8 de manera difusa y 5 de forma focal) (tabla 3). La expresión de otros marcadores fue variable en los distintos casos, 10 casos

fueron positivos para antígeno de membrana epitelial (76.9%), 6 casos fueron positivos para sinaptofisina (46.15%), 5 casos positivos para proteína ácida glial fibrilar (38.4%) y solo 2 mostraron positividad para PGP9.5 (15.3%).

Expresión de marcadores de inmunohistoquímica						
No. Caso	Vimentina	EMA	Sinaptofisina	GFAP	CK AE1/AE3	PGP9.5
1	Difusa	Difusa	Focal	Focal	Difusa	No se realizó
2	Difusa	Focal	Focal	No se realizó	Difusa	Difusa
3	Difusa	Difusa	No se realizó	Negativa	Difusa	No se realizó
4	Difusa	Negativo	Focal	Negativa	Difusa	No se realizó
5	Difusa	Difusa	No se realizó	No se realizó	Difusa	No se realizó
6	Difusa	Difusa	No se realizó	Focal	Focal	No se realizó
7	Difusa	Focal	No se realizó	Focal	Difusa	No se realizó
8	Difusa	Focal	Focal	Focal	Focal	No se realizó
9	Difusa	No se realizó	Focal	No se realizó	Focal	No se realizó
10	Difusa	Difusa	No se realizó	Focal	Focal	No se realizó
11	Difusa	Negativa	No se realizo	No se realizó	Difusa	Focal
12	Difusa	No se realizó	No se realizo	No se realizó	Focal	No se realizó
13	Difusa	No se realizó	No se realizo	No se realizó	Focal	No se realizó

Tabla 3. Expresión de marcadores de inmunohistoquímica.

EMA= Antígeno de membrana epitelial, GFAP=proteína ácida glial fibrilar, CK AE1/AE3 Citoqueratina AE1/AE3, PGP9.5= Protein gene product 9.5

Extracción de RNA.

Se realizó la extracción del RNA mediante la técnica de trizol, obteniendo concentraciones y grado de pureza adecuados en todos los casos. De acuerdo a la concentración de RNA de cada muestra se realizaron diluciones para estandarizar y proceder con la PCR en tiempo real.

Expresión cuantitativa de microRNAs

Expresión cuantitativa de microRNAs en muestras de cerebelo de paciente no oncológico (control)

Se determinó la expresión de los microRNAs hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en 11 muestras de cerebelo mediante PCR en tiempo real utilizando la fórmula $2^{-\Delta Ct}$. En cada caso se realizaron determinaciones por triplicado y se obtuvo promedio y

desviación estándar. Dichos valores fueron normalizados con el control endógeno RNU48. Los valores de expresión promedio fueron de 8.038 ± 3.29 para hsa-miR-100 y de 0.09786 ± 0.034 para hsa-miR-221 (Tabla 4).

Valores de expresión en controles		
Control (no)	hsa-miR-100	hsa-miR-221
1	0.2206758	0.05974658
2	0.3219704	0.006066163
3	0.5266805	0.0116381
4	0.5723621	0.08686989
5	0.6506709	0.006345722
6	2.188587	0.02105053
7	31.23302	0.1435873
8	25.81254	0.2962732
9	7.542276	0.08747412
10	7.185059	0.3219704
11	12.16783	0.03540262
<i>Promedio</i>	<i>8.03833</i>	<i>0.09786</i>

Tabla 4. Valores de expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en controles

Expresión cuantitativa de microRNAs en tumor Rabdoide/Teratoide atípico

La expresión de hsa-miR-221 y hsa-miR-100 fue analizada en el TR/TA y se comparó su expresión con respecto al grupo de cerebelo control mostrando diferencia significativa en la expresión de ambos microRNAs (Figura 4).

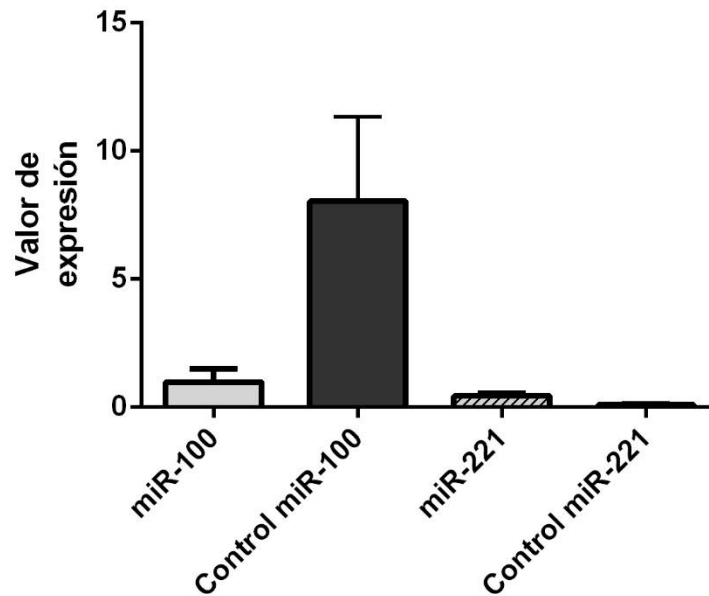


Figura 4. Expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en TR/TA y controles.

Expresión de hsa-miR-100 en TR/TA

Se encontró sub-expresión de hsa-miR-100 en TR/TA de 8.2 veces menos en comparación con el grupo de cerebelo control, en TR/TA la expresión fue de 0.9758 ± 0.34 , en comparación el grupo control que expresó 8.038 ± 3.2 , la diferencia fue significativa estadísticamente ($P=0.0313$) (Figura 5).

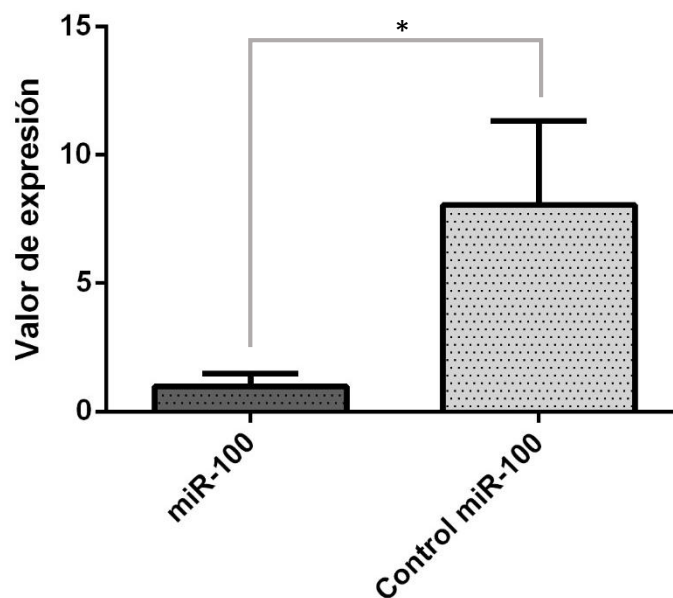


Figura 5. Expresión relativa de hsa-miR-100 en TR/TA y controles. * $P=0.0313$.

Expresión de hsa-miR-221 en TR/TA

Se encontró sobre-expresión de hsa-miR-221 en TR/TA de 4.5 veces más en comparación con el grupo de cerebelo control, en TR/TA la expresión fue de 0.4447 ± 0.113 , en comparación con el grupo control que expresó 0.09758 ± 0.034 , la diferencia fue significativa estadísticamente ($P=0.0125$) (Figura 6).

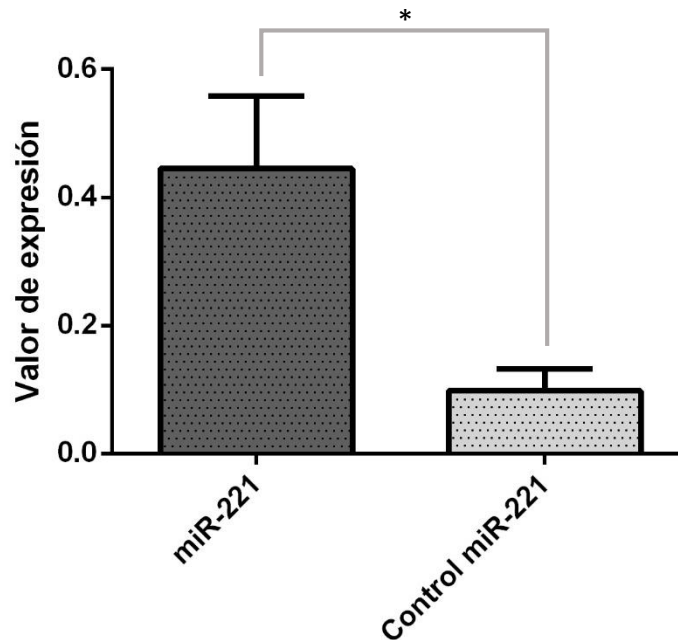


Figura 6. Expresión relativa de hsa-miR-221 en TR/TA y muestras control de cerebelo. * $P=0.0125$.

Comparación en la expresión de hsa-miR-100 contra expresión de hsa-miR-221

En los TR/TA se comparó la expresión entre ambos microRNAs resultando mayor la expresión de hsa-miR-100 (0.97 ± 0.52) contra la de hsa-miR-221 (0.44 ± 0.11). Esta diferencia fue de 2.2 veces pero no fue estadísticamente significativa. En el caso de los controles también se comparó la expresión de ambos microRNAs y se observó una expresión mayor de hsa-miR-100 (8 ± 3.2) en comparación con hsa-miR-221 (0.097 ± 0.0349). En este caso hsa-miR-100 se observó 82 veces más expresado, mostrando una diferencia significativa ($P= 0.0257$).

XIII. Discusión

Desde el 2002, cuando por primera vez se reportó la alteración de los microRNAs en cáncer, cada día hay un número creciente de información sobre el papel de estos en el crecimiento tumoral, invasión, angiogénesis y evasión inmune (Hayes et al., 2014). El TR/TA continúa siendo un tumor de mal pronóstico a pesar de las nuevas modalidades terapéuticas existentes (Hsieh et al., 2014). Estudios previos han encontrado alteración de hsa-miR-221/hsa-miR-222 en TR/TA que tienen un efecto directo sobre la oncogénesis. En otros tumores de origen embrionario como el meduloblastoma no se ha reportado dicha alteración. Un gran número de estudios experimentales se ha centrado en antagonizar la expresión de los microRNAs alterados evaluando posteriormente cambios en diferentes procesos celulares como proliferación (Hsieh et al., 2014). En nuestro estudio encontramos sobreexpresión de hsa-miR-221 en TR/TA en comparación con cerebelo libre de tumor. Lo cual corrobora lo encontrado previamente en otros estudios (Sredni et al., 2010). Esto sugiere que esta sobreexpresión refleja en parte el comportamiento altamente agresivo de este tumor. Ahora, en cuanto a la manera en que hsa-miR-221 contribuye a esto hay varios hallazgos. Los microRNAs generalmente ejercen sus funciones a través de la inhibición de los genes blanco de manera post-transcripcional. Hsa-miR-221 disminuye la expresión de varios genes supresores de tumor: p57, BIM, PUMA, TIMP3, PTEN, SUN2 entre otros, esta inhibición activa el inicio el ciclo celular a través de distintas vías que promueven la proliferación celular (Cai, Shen, Cui, Yu, & Pan, 2015). En el caso de TR/TA algunos autores han explorado a SUN2 como blanco específico de hsa-miR-221. La sobreexpresión de hsa-miR-221 es inversamente proporcional a la expresión de SUN2, que actúa como un supresor tumoral, al aumentar la expresión de hsa-miR-221 disminuye la expresión de SUN2, lo cual promueve la proliferación celular. Con la evidencia mostrada podemos sugerir que este microRNA es un candidato para desarrollar fármacos que antagonicen su función de tal manera que su disminución contribuya a disminuir la proliferación celular y la progresión tumoral. Lo anterior abre la posibilidad a nuevas modalidades terapéuticas, en especial las terapias blanco a microRNAs (Hsieh et al., 2014). En cuanto a la expresión de hsa-miR-100, este se ha encontrado sub-expresado y sobre-expresado en diferentes neoplasias

(Chen et al., 2013; Qin et al., 2015). En nuestro estudio encontramos sub-expresión de este microRNA. Hsa-miR-100 ha sido estudiado ampliamente en muchas neoplasias, y se han encontrado diferencias significativas entre pacientes con tumores y pacientes sanos, este microRNA también sea detectado en suero por lo que es un potencial biomarcador excelente para la detección de cáncer. Un ejemplo, hsa-miR-100 se ha encontrado sobre-expresado en carcinoma de corteza suprarrenal en comparación del adenoma suprarrenal (Qin et al., 2015). Hsa-miR-100 regula las vías celulares IGF/mTOR y también PLK1. Los patrones de expresión de hsa-miR-100 en distintas neoplasias son variables. La sobreexpresión de hsa-miR-100 ocasiona sobreexpresión de PLK1 en varios tumores, en cáncer nasofaríngeo promueve la proliferación celular, además produce cierta citotoxicidad en vivo e in vitro. Hsa-miR-100 re-sensibiliza las células resistentes a docetaxel de adenocarcinoma de pulmón, haciéndolas nuevamente sensibles a este a través del blanco PLK1. La expresión forzada de hsa-miR-100 en células Saos-2 y MG63 de osteosarcoma inhibe la proliferación a través del blanco Cyr61. Zheng et al. demostró una vía alternativa por la cual hsa-miR-100 regula la transición G1/S y la entrada a la fase de síntesis a través del supresor tumoral RBSP3 (Qin et al., 2015). En tumores de sistema nervioso central, hsa-miR-100 ha sido estudiado en glioblastoma, donde se ha encontrado que es uno de los principales microRNAs alterados en los perfiles realizados por varios autores. En glioblastoma uno de los blancos probables de hsa-miR-100 parece ser SMRT/NCOR2. Hsa-miR-100 parece tener un efecto supresor tumoral a través de la regulación de SMRT/NCOR2 (Alrfaei et al., 2013). De manera experimental la administración de hsa-miR-100 en ratones implantados con líneas celulares de glioblastoma disminuye el tamaño tumoral hasta en 50% (Alrfaei et al., 2013). Por último la diferencia es la expresión de ambos microRNAs en los cerebelos de pacientes no oncológicos es evidente y puede reflejar diferente grado de participación en diversas funciones en el SNC.

XIV. Conclusiones

En conclusión, nuestro estudio encontró alteración en la expresión de hsa-miR-100 y hsa-miR-221 en TR/TA. La expresión de hsa-miR-100 no había sido explorada en TR/TA, sin embargo al igual que otras neoplasias reportadas en la literatura su

expresión está alterada. Lo cual lo perfila como posible biomarcador de este tumor, y probable blanco terapéutico. La sobre-expresión de hsa-miR-221 en TR/TA coincide con lo reportado previamente en la literatura, lo cual confirma su importancia en el desarrollo y progresión de este tumor. Las vías a través de las cuales ejerce su efecto son múltiples. Aunque sabemos que la expresión de estos microRNAs está alterada en TR/TA como en otras neoplasias, es necesario poseer mayor entendimiento de los mecanismos por los que ejercen su efecto en el desarrollo, crecimiento y progresión tumoral para poder aplicarlos como biomarcador en cáncer y como blancos terapéuticos. La alteración de estos microRNAs y su repercusión en distintos procesos celulares es el centro de varias investigaciones. La interacción con vías moleculares que alteran el ciclo celular son complejas, es necesario se continúe explorando más al respecto para poder aplicar estos conocimientos en un futuro y poder incidir en el tratamiento y pronóstico de este tumor.

XV. Limitación del estudio

Debido a la baja frecuencia de este tumor, la muestra es pequeña y puede no ser representativa de todos los casos

XVI. Cronograma de actividades

Junio – Agosto 2014: Obtención de bibliografía y búsqueda de casos

Septiembre- Octubre 2014: Obtención y revisión del material de los casos

Noviembre-Diciembre 2014: Extracción de RNA

Enero-Marzo 2015: Extracción de cDNA, y elaboración de PCR-en tiempo real

Abril-Mayo 2015: Análisis de resultados

Junio 2015: Elaboración de resultados, discusión y conclusiones

XVII. Referencias

Adesina, A. M., & Hunter, J. (2010). Atlas of Pediatric Brain Tumors, 95–107.
<http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1062-2>

- Alrfaei, B. M., Vemuganti, R., & Kuo, J. S. (2013). microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models. *PLoS ONE*, *8*(11), 1–13. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0080865>
- Bandrés, E. (2009). Micro-ARN y cáncer, *8*.
- Bartelheim, K., Sumerauer, D., Behrends, U., Kodetova, D., Kucera, F., Leuschner, I., ... Frühwald, M. C. (2014). Clinical and genetic features of rhabdoid tumors of the heart registered with the European Rhabdoid Registry (EU-RHAB). *Cancer Genetics*. <http://doi.org/10.1016/j.cancergen.2014.04.005>
- Bishop, J. A., & Ali, S. Z. (2012). *Pediatric Cancer*, Volume 2, 2, 53–58. <http://doi.org/10.1007/978-94-007-2957-5>
- Cai, K., Shen, F., Cui, J., Yu, Y., & Pan, H. (2015). Expression of miR-221 in colon cancer correlates with prognosis, *8*(September 2009), 2794–2798.
- Chen, P., Zhao, X., & Ma, L. (2013). Downregulation of microRNA-100 correlates with tumor progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *383*(1-2), 49–58. <http://doi.org/10.1007/s11010-013-1753-0>
- Cho, W. C. S. (2007). OncomiRs: the discovery and progress of microRNAs in cancers. *Molecular Cancer*, *6*, 60. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-6-60>
- Ciafrè, S. a., Galardi, S., Mangiola, a., Ferracin, M., Liu, C. G., Sabatino, G., ... Farace, M. G. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *334*(4), 1351–1358. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.07.030>
- Conti, A., Aguenouz, M., La Torre, D., Tomasello, C., Cardali, S., Angileri, F. F., ... Tomasello, F. (2009). miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II-IV astrocytic tumors. *Journal of Neuro-Oncology*, *93*(3), 325–332. <http://doi.org/10.1007/s11060-009-9797-4>
- Dang, T., Vassilyadi, M., Michaud, J., Jimenez, C., & Ventureyra, E. C. G. (2003). Atypical teratoid/rhabdoid tumors. *Child's Nervous System: ChNS: Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, *19*(4), 244–8. <http://doi.org/10.1007/s00381-003-0731-3>
- Fenton, L. Z., & Foreman, N. K. (2003). Atypical teratoid/rhabdoid tumor of the central nervous system in children: an atypical series and review. *Pediatric Radiology*, *33*(8), 554–8. <http://doi.org/10.1007/s00247-003-0934-5>
- Gillies, J. K., & Lorimer, I. a J. (2007). Report regulation of p27Kip1 by miRNA 221/222 in glioblastoma. *Cell Cycle*, *6*(16), 2005–2009. <http://doi.org/10.4161/cc.6.16.4526>
- Ginn, K. F., & Gajjar, A. (2012). Atypical teratoid rhabdoid tumor: current therapy and future directions. *Frontiers in Oncology*, *2*(September), 114. <http://doi.org/10.3389/fonc.2012.00114>
- Hayes, J., Peruzzi, P. P., & Lawler, S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*. <http://doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
- Hsieh, T.-H., Chien, C.-L., Lee, Y.-H., Lin, C.-I., Hsieh, J.-Y., Chao, M.-E., ... Wang, H.-W. (2014). Downregulation of SUN2, a novel tumor suppressor, mediates miR-221/222-induced

- malignancy in central nervous system embryonal tumors. *Carcinogenesis*, 00(00), 1–11. <http://doi.org/10.1093/carcin/bgu105>
- Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120(1), 15–20. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>
- Liu, X. (2015). Targeting Polo-Like Kinases: A Promising Therapeutic Approach for Cancer Treatment. *Translational Oncology*, 8(3), 185–195. <http://doi.org/10.1016/j.tranon.2015.03.010>
- Louis, D. N., Ohgaki, H., Wiestler, O. D., & Cavenee, W. K. (2007). *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. (D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, & W. K. Cavenee, Eds.) (4 th). Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).
- Macfarlane, L.-A., & Murphy, P. R. (2010). MicroRNA: Biogenesis, Function and Role in Cancer. *Current Genomics*, 11(7), 537–561. <http://doi.org/10.2174/138920210793175895>
- Medina, R., Zaidi, S. K., Liu, C. G., Stein, J. L., VanWijnen, A. J., Croce, C. M., & Stein, G. S. (2008). MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Research*, 68(8), 2773–2780. <http://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-6754>
- Mercatelli, N., Coppola, V., Bonci, D., Miele, F., Costantini, A., Guadagnoli, M., ... Ciafrè, S. A. (2008). The inhibition of the highly expressed mir-221 and mir-222 impairs the growth of prostate carcinoma xenografts in mice. *PLoS ONE*, 3(12), 1–10. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0004029>
- Nicoloso, M. S., Kipps, T. J., Croce, C. M., & Calin, G. a. (2007). MicroRNAs in the pathogeny of chronic lymphocytic leukaemia. *British Journal of Haematology*, 139(5), 709–716. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2141.2007.06868.x>
- Ordóñez, N. G. (2006). Mesothelioma with rhabdoid features: an ultrastructural and immunohistochemical study of 10 cases. *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19(3), 373–383. <http://doi.org/10.1038/modpathol.3800543>
- Qin, C., Huang, R.-Y., & Wang, Z.-X. (2015). Potential role of miR-100 in cancer diagnosis, prognosis, and therapy. *Tumor Biology*. <http://doi.org/10.1007/s13277-015-3267-8>
- Shalaby, T., Fiaschetti, G., Baumgartner, M., & Grotzer, M. a. (2014). Significance and therapeutic value of miRNAs in embryonal neural tumors. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 19(5), 5821–62. <http://doi.org/10.3390/molecules19055821>
- Shitara, S., & Akiyama, Y. (2014). Atypical teratoid/rhabdoid tumor in sellar turcica in an adult: A case report and review of the literature. *Surgical Neurology International*, 5, 75. <http://doi.org/10.4103/2152-7806.133105>
- Sredni, S. T., Bonaldo, M. D. F., Costa, F. F., Huang, C.-C., Hamm, C. A., Rajaram, V., ... Soares, M. B. (2010). Upregulation of mir-221 and mir-222 in atypical teratoid/rhabdoid tumors: potential therapeutic targets. *Child's Nervous System : ChNS : Official Journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 26(3), 279–83. <http://doi.org/10.1007/s00381-009-1028-y>

- Yau, T. O., Wu, C. W., Dong, Y., Tang, C.-M., Ng, S. S. M., Chan, F. K. L., ... Yu, J. (2014). microRNA-221 and microRNA-18a identification in stool as potential biomarkers for the non-invasive diagnosis of colorectal carcinoma. *British Journal of Cancer*, (April), 1765–1771. <http://doi.org/10.1038/bjc.2014.484>
- Zárate, C. A. (2011). *TUMOR TERATOIDE RABDOIDE ATIPICO MALIGNO EXPERIENCIA EN EL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO FEDERICO GÓMEZ*. UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO FACULTAD DE MEDICINA.
- Zhou, S., Yang, B., Zhao, Y., Xu, S., Zhang, H., & Li, Z. (2014). Prognostic value of microRNA-100 in esophageal squamous cell carcinoma. *Journal of Surgical Research*, 192(2), 515–520. <http://doi.org/10.1016/j.jss.2014.07.005>
- Zhu, Z., Wang, C.-P., Zhang, Y.-F., & Nie, L. (2014). MicroRNA-100 Resensitizes Resistant Chondrosarcoma Cells to Cisplatin through Direct Targeting of mTOR. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 15(2), 917–923. <http://doi.org/10.7314/APJCP.2014.15.2.917>