



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

Expresión de hsa-miR-214-3p y hsa-miR-199a- 5p en el tumor de Wilms

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICO BIÓLOGA

P R E S E N T A

Rios Rodríguez Tonantzin

Director: Dra. María del Pilar Eguía Aguilar
Asesor: M. en C. María Lourdes Vega Navarrete



Hospital Infantil de México Federico Gómez, Cd Mx, 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.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi entero agradecimiento a todas las personas que han contribuido en mi formación profesional a través de los años.

A mi familia, especialmente a mis padres y hermano, quienes me han apoyado en todas las adversidades y han creído firmemente en mi. Hicieron mediante su cariño y esfuerzo que esta meta se cumpliera.

A quienes trabajaron conmigo durante el desarrollo de la presente, brindándome su tiempo, apoyo y conocimientos:

Dra. María del Pilar Eguía

M. en C. María Lourdes Vega

Dra. Guadalupe Diaz Rosas

Dra. Alejandra Contreras Ramos

Dr. Hector Diaz García

Dra. Patricia Parra Cervantes

Dr. Ramón Soto Vázquez

A las instituciones:

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. Me brindo los conocimientos necesarios para ser un gran profesionista y la oportunidad de vivir grandes experiencias y conocer a personas que estarán presentes por el resto de mi vida.

Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. El lugar donde se desarrolló la presente donde pude adquirir mayor experiencia y conocer nuevas técnicas de trabajo, conocer a grandes investigadores y buenas amistades.

DEDICATORIA

El presente trabajo va dedicado a mis padres: **Tonantzin Rodríguez Gasca** y **Alejandro Rios Miranda**, sin ellos nada de esto podría haber sido posible.

A mi hermano por su apoyo y gran cariño.

A José Luis Galván por estar a mi lado durante todo el proceso, ayudándome, apoyándome y siempre dando todo su cariño.

A toda mi familia que siempre estuvo en los momentos importantes, apoyándome y brindándome todo su amor.

A los amigos que conocí a lo largo de la carrera, con quienes compartí grandes momentos.

ÍNDICE

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO.....	3
Histogénesis renal.....	3
Tumor de Wilms.....	3
Alteraciones genéticas.....	7
La importancia de la vía Wnt/ β -catenina.....	8
miRNAs.....	11
Biogénesis.....	12
Nomenclatura de miRNAs.....	14
Participación de miRNAs en cáncer.....	15
miRNAs con actividad oncogénica.....	16
miRNAs con actividad supresora de tumores.....	16
Cromosoma 1q y su relación con hsa-miR-214-3p y hsa-miR-199a-5p.....	17
hsa-miR-214-3p.....	19
hsa-miR-199a2-5p.....	19
Expresión de hsa-miR-199a5p y hsa-miR-214-3p en diferentes tipos de cáncer.....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
HIPÓTESIS.....	24
OBJETIVOS.....	25
Objetivos específicos.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS.....	26
Diseño (Tipo de estudio).....	26
Población de estudio.....	26
Variables.....	26
Criterios de Inclusión.....	26
Criterios de exclusión y eliminación.....	26
Técnicas.....	27
Desparafinar tejidos.....	27
Extracción de RNA.....	28
Ensayo de Transcriptasa reversa.....	30
Análisis estadístico.....	32

RESULTADOS	33
DISCUSIÓN.....	47
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS.....	53

INTRODUCCIÓN

El tumor de Wilms (TW) o nefroblastoma es el tumor renal más frecuente, se calcula una incidencia anual de 7 a 10 casos por millón de niños menores de 15 años y ocupa el cuarto lugar en los tumores más frecuentes en niños. La lesión precursora de este tumor es la presencia de restos nefrogénicos, esto es, células embrionarias retenidas en el riñón y que mediante una alteración genética adicional proliferan de forma aberrante. Se puede presentar en forma esporádica o hereditaria.

En el caso de pacientes con tumor de Wilms localizado los avances en el tratamiento han sido notables logrando supervivencia del 90 %; sin embargo, la morbilidad asociada con el tratamiento es un problema latente, el 50 % de los pacientes con recurrencia eventualmente mueren a causa de la enfermedad.

En recientes estudios se ha encontrado que la ganancia en el cromosoma 1q y la pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 1q y 16q se relacionan con el pronóstico de los pacientes con Tumor de Wilms. La ganancia en el cromosoma 1q se ha observado en cerca del 30 % de los TWs y se ha asociado con menor supervivencia en tumores unilaterales con histología favorable. En la región del cromosoma 1q se localizan miRNAs entre los que destacan miR-199a-5p y miR-214-3p debido a que participan en una de las vías de señalización más afectadas en este tipo de tumor como es WNT.

Durante años, se han realizado estudios sobre las alteraciones a nivel genético (secuencias codificadoras, promotores, polimorfismos), sin embargo, hoy en día queda claro que el nivel epigenético ejerce regulación de manera importante. Los

miRNAs son reguladores epigenéticos los cuales actúan en el citoplasma. Los miRNAs se descubrieron en 1993 y aún se siguen encontrando más en todo el organismo, hoy en día se sabe que hay alrededor de 2000 miRNAs pertenecientes al ser humano. Los miRNAs juegan un papel importante en el organismo como mecanismo de regulación post-transcripcional. El 1% de los genes animales codifica miRNAs y se estima que pueden regular cerca del 60% de los genes humanos. Actúan inhibiendo la traducción de genes oncogénicos o supresores de tumor, pueden tener más de un RNAm como blanco, formando redes complejas de regulación.

Existe información sobre la acción que tienen miRNAs como son miR-199a-5p y miR-214-3p sobre diversos tipos de tumores, sin embargo, se desconoce el efecto que ejercen estos miRNAs en el TW. Se sabe que la expresión alterada de ambos miRNAs está estrechamente relacionada con el desarrollo del tumor en otros tipos de cáncer y también están relacionados con funciones renales. En este estudio se determina la expresión de miR-199a-5p y miR-214-3p mediante el aislamiento de RNA total en tejidos tumorales renales fijados en parafina de pacientes pediátricos, seguido de una PCR en tiempo real; los datos obtenidos de la PCR se compararon contra un control, el cual se obtuvo de biopsias de pacientes sanos. Finalmente se determinó la expresión de ambos miRNAs encontrando diferencias significativas entre el control y TW. Ambos miRNAs participan en la vía WNT una de las más afectadas en el TW y pueden constituirse como biomarcadores para desarrollar terapias dirigidas a inhibir o favorecer la expresión de oncogenes o supresores de tumor, respectivamente; de este modo se podría incidir en el crecimiento del tumor.

MARCO TEÓRICO

Histogénesis renal

En mamíferos el riñón se origina de células progenitoras localizadas en el mesodermo intermedio. El riñón fetal es un órgano lobulado, que presenta unos 12 lóbulos. En los adultos, los riñones muestran una superficie lisa debido a la fusión de los lóbulos fetales.(1)

El metanefro será el riñón definitivo y este se desarrolla alrededor del día 32 a partir del brote uretral y del blastema mesonéfrico. El brote uretral dará lugar a las vías urinarias (uréter, pelvis renal, cálices mayores y menores y túbulos colectores) y el blastema metanefrogénico originará a las nefronas. (2)

Durante la embriogénesis las células progenitoras que expresan el gen supresor de tumor de Wilms, WT1, son inducidas para diferenciarse en respuesta a señales de la vía WNT.(3)

Tumor de Wilms

En niños los tumores renales abarcan de un 7 a 8% en menores de 15 años. El tipo más común es el tumor de Wilms, como se muestra en el cuadro 2.1.

Cuadro 2.1. Frecuencia relativa de los diferentes tipos de tumores renales en niños.

Tumor	Frecuencia relativa (%)
Tumor de Wilms	85
Nefroma mesoblástico	2-3
Sarcoma de células claras	3
Tumor rabdoide	2
Carcinoma renal	5
Otros	3

El tumor de Wilms (TW) es una neoplasia maligna embrionaria, éste se desarrolla cuando existen anomalías en la histogénesis renal, cuando los tejidos blastemales metanéfricos no maduran de forma adecuada.(4, 5)

El tumor de Wilms se compone por tres tipos celulares: blastemal, epitelial y estromal, existe otro subtipo que es el anaplásico. La anaplasia es el factor histológico más importante para predecir la respuesta y la supervivencia de los pacientes con tumor de Wilms; las células se caracterizan por presentar mitosis polipoides multipolares con agrandamiento nuclear marcado e hiper cromasia y se puede presentar en focos bien delimitados o de forma difusa, esto es con anaplasia fuera de la lesión primaria (vasos intra o extrarrenales) o bien anaplasia no localizada que se extiende hasta el borde de uno o más cortes (los bordes de la zona o foco anaplásico no pueden determinarse con claridad). (5)

El tumor de Wims puede ser dividido en dos categorías favorable y desfavorable, esto dependerá si el tejido tiene anaplasia o está ausente de esta. La presencia de anaplasia es una señal de la resistencia a la quimioterapia, disminuyendo la probabilidad de respuesta al tratamiento y aumentando el riesgo de muerte. Los casos con anaplasia son aproximadamente el 11% en el TW.(6, 7)

Aproximadamente el 44% de pacientes que padecen TW con anaplasia mueren, mientras que 7.1% de pacientes sin anaplasia mueren a causa del tumor. (8, 9)

Cuadro 2.1. Clasificación de tumores renales en grupos de riesgo según características histológicas.(3)

Riesgo bajo	Nefroma mesoblástico congénito
	Nefroblastoma quístico parcialmente diferenciado
	TW completamente necrótico
Riesgo intermedio	TW tipo epitelial
	TW tipo estromal
	TW tipo mezclado
	TW tipo regresivo
	TW con anaplasia
Alto riesgo	TW tipo blastemal
	TW con anaplasia
	Sarcoma de células claras de riñón
	Tumor rabdoide en riñón

El estadio del TW va a determinar el pronóstico en el tratamiento del paciente. Entre mayor sea el grado del TW se tendrá menor respuesta en el tratamiento. (5)

Cuadro 2.3. Estadios en el tumor de Wilms. (10, 11)

Estadio I	Se presenta en un solo riñón, cápsula íntegra, ausencia de expansión y extirpación completa.
Estadio II	Se extiende fuera del riñón, pero puede extirparse totalmente
Estadio III	Presencia de tumor residual en el abdomen, puede extirparse parcialmente
Estadio IV	Metástasis hematógenas a distancia
Estadio V	Tumor renal bilateral

Alteraciones genéticas

El tumor de Wilms es un cáncer en el riñón que se diagnostica principalmente en niños menores de seis años. Este se presenta por causa de una anomalía en los genes: WT1 (Tumor de Wilms 1) localizado en el cromosoma 11p13 este gen se encuentra alterado en aproximadamente el 20% de los casos, el gen WTX localizado en Xq11.1 alterado en aproximadamente 18% de los casos y el gen CTNNB1 localizado en el cromosoma 3p22.1 alterado en 15% de los casos. (3, 12)

Las mutaciones que se presentan en el tumor de Wilms afectan principalmente la vía de señalización WNT (Wing, vía canónica), a genes supresores de tumores y genes relacionados en la biogénesis de los miRNAs.(13)

La vía WNT involucra genes asociados al ciclo celular, la transición epitelio-mesénquima y genes relacionados en la diferenciación celular. (14)

En años recientes se ha reconocido el papel de los miRNAs (microRNAs) en la fisiopatología de varios tipos de tumores entre ellos el TW. Mediante estudios de microarreglos se ha reportado un número importante de miRNAs involucrados en la formación y propagación del TW. Así también, se ha reconocido que el perfil de expresión de algunos miRNAs es un poderoso marcador diagnóstico y pronóstico que puede predecir el desarrollo post-quirúrgico.(3) De igual manera se ha encontrado que los miRNAs están involucrados en el desarrollo del tumor, angiogénesis, metástasis y resistencia a la quimioterapia, debido a que sus blancos son oncogénos o genes supresores de tumores específicos.(13)

La importancia de la vía Wnt/ β -catenina

La vía de señalización Wnt/ β -catenina se encontró por primera vez en *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) y se descubrió que una alteración en esta vía les provocaba a las moscas un defecto en sus alas y halterios. Esto sucedía durante el desarrollo del embrión a causa de una alteración en la diferenciación celular.

La función de la vía de señalización Wnt recae en uno de los principales efectores β -catenina, es fundamental en el desarrollo embrionario y en la homeostasis tisular. La regulación de la vía de señalización está basada en la presencia del ligando WNT que produce la activación. (15)

La activación de la vía canónica es iniciada en la membrana celular tras la interacción del ligando Wnt con un complejo que comprende al receptor de superficie celular Frizzled y lipoproteína de baja densidad (*FZD/LRP*); esta interacción permite a su vez la asociación de la proteína Dishevelled (*DVL*) al receptor Frizzled (*FZD*) y el secuestro del complejo que está conformado por: Poliposis coli adenomatosa, axina y la enzima glucógeno sintasa cinasa 3 β (*APC-Axina-GSK3B*). La incorporación de este complejo a *DVL-FZD* promueve la actividad cinasa de *GSK3B* sobre el co-receptor de lipoproteínas de baja densidad 5 y 6 (*LRP5/6*) en la serina de los dominios PPPSP y a sus alrededores por la caseína cinasa I γ (*Ckly*). Estas modificaciones reclutan a la proteína axina hacia los residuos fosforilados del co-receptor *LRP5/6*, que provoca la disociación del complejo de degradación y promueve la liberación de β -catenina, la cual se acumula sucesivamente en el citoplasma, para luego migrar al núcleo. Cuando se encuentra en el núcleo la β -catenina activa co-factores transcripcionales como *TCF/LEF*, *p300/CBP*, *Brgl*, *parafibromina/Hvra* y *PGO*. La β -catenina activa genes que regulan procesos como la apoptosis, proliferación y adhesión celular.

(16)

La activación de la vía y el reclutamiento de axina y proteínas asociadas (*GSK3B*, *CK1 α* , *APC*) a *Fz-LRP5/6* en la membrana regulan de forma negativa el denominado complejo de destrucción, conformado por las proteínas *GSK3B*, *CK1 α* , *APC* y axina. Este complejo tiene como función marcar la proteína β -catenina para que sea degradada en el proteosoma y de este manera impedir su actividad como factor de transcripción.(15)

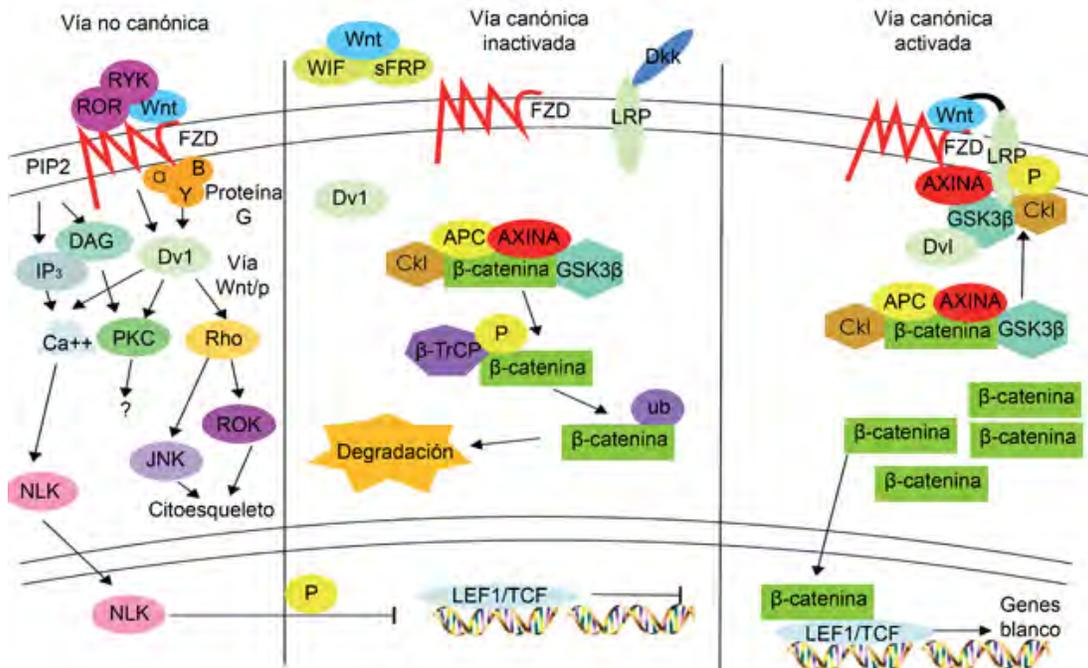


Figura 2.1. Vías de señalización canónica y no canónica de Wnt que muestran las moléculas involucradas en su estado inactivado y activado. (16)

La β-catenina es codificada por el gen *CTNNB1*, esta es crucial para las uniones célula-célula y en la vía de señalización TWN/GW (en la región del citoplasma).

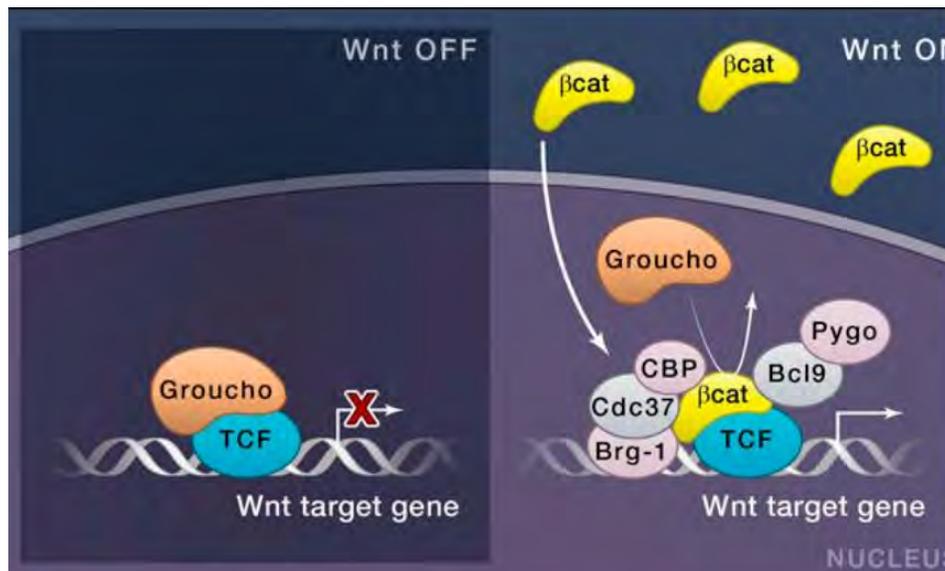


Figura 2.2. Función de β-catenina, una vez que entra al núcleo se une al factor de células T (TCF) el cuál activa la transcripción de genes.(17)

En condiciones normales β -catenina se mantiene en concentraciones bajas en el citoplasma debido a un proceso de degradación dependiente de ubiquitina-proteosoma, por lo tanto, en el núcleo los genes diana de la vía Wnt son inhibidos por el complejo proteínico que incluye el factor estimulador linfoide (*LEF*) y al factor de células T (TCF), unidos a la proteína co-receptora Groucho. El incremento de β -catenina en el citoplasma permite la entrada al núcleo de la misma lo cual activa la transcripción de genes como *MYC*, *C-JUN*, *CCND1*, *PPARD*, *FOSL1*, *ASCL2*, *ID2*, *ITF2*, *ENC1*, *MMP7*, *MMP14*, *VEGF* y *UTERIN*; asociados a procesos de diferenciación celular, división celular, desarrollo embrionario, migración celular, angiogénesis y morfogénesis.(14, 18)

El descontrol en la homeostasis de la β -catenina, como una hiperactivación de la vía Wnt, puede promover una serie de neoplasias malignas como el cáncer de colon, melanoma, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer de endometrio, pilomatricomas, meduloblastoma y cáncer de próstata. (19)

miRNAs

El RNA forma parte del núcleo celular y es junto con el DNA uno de los componentes más importantes. Se conocen distintos tipos de RNA: mensajero (RNAm), ribosomal (RNAr) y de transferencia (RNAt). En estudios más recientes se describe otras variantes de RNA que son llamadas microRNA o miRNA que regulan la síntesis de proteínas.(20)

Los miRNAs son un tipo de RNAs endógenos que poseen un tamaño pequeño de 21-25 nucleótidos aproximadamente. Estos tienen un papel importante en la

regulación post-transcripcional de la expresión génica a través de su unión con el RNAm e inhibición de la traducción.(21)

El análisis de la expresión de miRNAs en diferentes neoplasias ha permitido definir el perfil de miRNA característico de cada tumor y asociarlo con la alteración en mecanismos de proliferación, apoptosis e invasión, entre otros. De esta forma se pueden proponer marcadores característicos para grupos de riesgo, progresión y pronóstico en el desarrollo tumoral.(21)

Los miRNAs fueron descritos por primera vez en 1993, en el nemátodo *Caenorhabditis elegans* en el que se estudiaban los genes involucrados en la regulación del desarrollo larval; en esta especie observaron que lin-4 daba origen a moléculas pequeñas de RNA que eran capaces de modular la expresión de lin-14. Posteriormente se encontró que estaban involucrados en el desarrollo y diferenciación celular. Sin embargo, su importancia biológica se denota hasta el año 2001 cuando se describe como un mecanismo de regulación o modulación diferente a los ya descritos, se reporta su presencia en otras especies como *D. melanogaster* y *Homo sapiens*, también se acuña el término miRNA.(22) Actualmente en la base de datos miRBase se reportan cerca de 2588 miRNAs maduros. (23)

Biogénesis

Los microRNAs se pueden localizar en un exón o intrón de un gen o constituir una unidad de transcripción independiente, es decir, que son considerados como

genes con una localización que puede ser tanto inter-génica como intra-génica.(24)

Los miRNAs se transcriben inicialmente como transcritos largos de aproximadamente 1kb, conocidos como microRNAs primarios (pri-miRNA). Dentro de estos transcritos se encuentran secuencias de microRNA maduro constituido por estructuras en horquilla de 60 a 80 nucleótidos. En un inicio los pri-miRNAs son reconocidos en el núcleo por el complejo compuesto por la enzima RNAsa III *Drosha* y *DGCR8* (proteína con un dominio de unión a RNA de doble banda). Aunque existe un número pequeño de precursores que no son generados por *Drosha* (25). Este complejo corta la estructura en horquilla conteniendo el miRNA maduro. Las horquillas liberadas son denominadas miRNA precursor (pre-miRNA), éstas son reconocidas 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 banda de 18 a 24 nucleótidos (24). Un gran complejo proteínico conocido como complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) se asocia con el RNA duplex y separa ambas cadenas. RISC es un complejo trimérico compuesto de *Dicer*, *TRBP* (proteína con un dominio de unión a RNA) y *Ago2* (proteína de la familia Argonauta). *Ago2* identifica el RNAm blanco basándose en la complementariedad con el miRNA de una sola banda asociado.(26)

La secuencia que es reconocida del RNAm blanco se ubica en la región 3' no traducida (3'UTR). Generalmente solo una banda es incorporada dentro de RISC y la otra es degradada. El miRNA guía a RISC hacia el mensajero blanco. La

proteína Argonauta probablemente interactúa con la maquinaria traduccional para inhibir la síntesis de proteínas. Esta interacción puede tener lugar al inicio o en el paso de elongación dependiendo posiblemente de la naturaleza del miRNA y del transcrito blanco.(27)

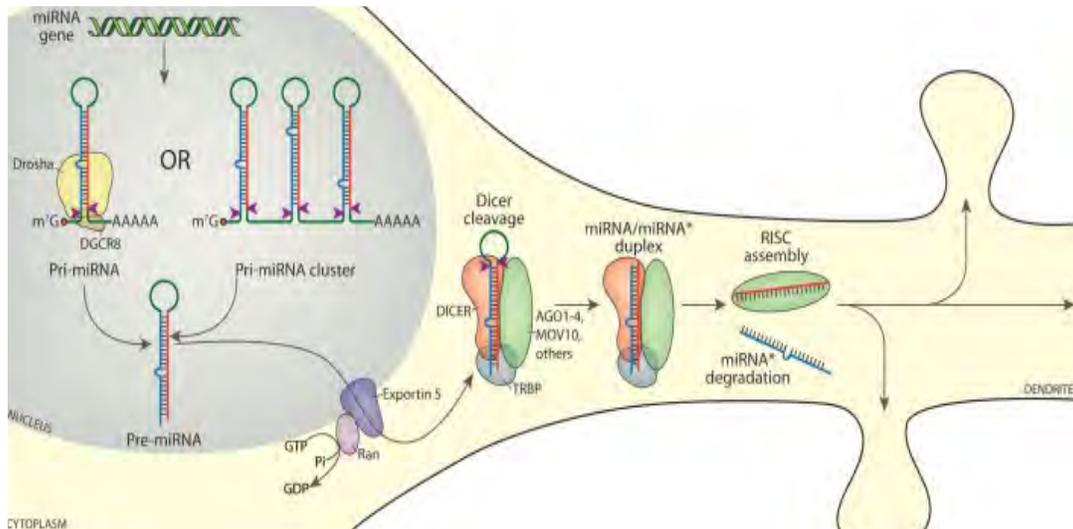


Figura 2.3. Biogénesis de miRNA. (28)

Se estima que el genoma de los vertebrados codifica más de 2,500 miRNAs diferentes, los cuales regulan la expresión de al menos el 60 % de genes. Estos miRNAs pueden tener un gran número de blancos, pero la mayoría no han sido validados. En base a la función que desempeñe su blanco será la relevancia del miRNA en el desarrollo del tumor. (29)

Nomenclatura de miRNAs

Debido a los nuevos estudios y la expansión en el descubrimiento de miRNAs descritos *in silico* e *in vivo*, fue necesario adoptar una nomenclatura para miRNAs. Después de la validación experimental se asigna un nombre que contiene un sufijo

con tres o cuatro letras indicando la especie y un sufijo numérico secuencial que se basa en la similitud de la secuencia madura por ejemplo hsa-miR-221. Los miRNAs que son homólogos en diferentes especies reciben el mismo nombre y sólo se diferencian con las tres primeras letras que indican la especie. A las secuencias maduras idénticas que se originan de un locus genómico diferente en una misma especie se les agrega un sufijo numérico, tal como hsa-miR-9-1, hsa-miR-9-2. Secuencias maduras con uno o dos cambios de bases son asignados con sufijos de letra miR-181a, miR-181b. El gen del miRNA y miRNA precursor (pre-miRNA) son designados como *mir*, mientras que los miRNAs maduros son denotados como *miR*.

Cuando la abundancia relativa indica claramente que miRNA se expresa de forma predominante, a las secuencias maduras se les asignan nombres como miR-9 (miRNA predominante) y miR-9* (indicando el brazo opuesto del precursor). Cuando los datos no son suficientes para determinar cuál miRNA predomina, entonces se designan 142-5p (del brazo 5') y 142-3p (del brazo 3'). Let-7 y lin-4 son excepciones a este esquema de numeración y sus nombres son mantenidos por razones históricas (30). Los miRNAs que son específicos de algún tejido se denominan con el nombre del tejido a que pertenecen como neuromiRs, miomiRs, neumomiRs, etc. (31)

Participación de miRNAs en cáncer

En 2002 Calin y col. fueron los primeros en encontrar evidencia acerca de la relación entre los miRNAs y el cáncer, demostrando que los miR-15 y miR16 están localizados en una región mutada, en más de la mitad de las leucemias linfocíticas

crónicas de células B. Varios estudios posteriores han mostrado que los perfiles de expresión del miRNA están alterados en el cáncer, dando lugar a un amplio rango de malignidades. Evidencias recientes indican que los miRNAs pueden actuar como genes supresores de tumor y oncogenes. El grupo miR-17-92 fue el primer miRNA descrito en mamíferos. Los tumores que sobre-expresan este oncomiR presentan baja apoptosis, lo que puede contribuir al desarrollo del tumor(32). Se sabe de la expresión diferencial de miRNA 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 (33).

miRNAs con actividad oncogénica

Son miRNAs que promueven la actividad oncogénica, por medio de la activación de la proliferación celular y la actividad anti-apoptótica, estos se encuentran sobre-expresados en células tumorales. La función de estos miRNAs consiste en regular negativamente a genes supresores de tumores que al estar disminuidos favorecen los procesos invasivos y de metástasis en el cáncer. (34)

miRNAs con actividad supresora de tumores

Los miRNAs que previenen la proliferación celular y la apoptosis son llamados supresores de tumores. La expresión de estos miRNAs se encuentra disminuida en células tumorales en comparación con un tejido sano.

Los miRNAs pueden actuar sobre más de un mRNA, por este motivo un miRNA puede tener actividad como oncogén, si su blanco es el transcrito de un gen

supresor de tumor; o como supresor de tumores, si su blanco es el transcrito de un oncogén.(34)

Cromosoma 1q y su relación con hsa-miR-214-3p y hsa-miR-199a-5p.

En recientes estudios se ha encontrado que la ganancia en el cromosoma 1q y la pérdida de heterocigosidad en los cromosomas 1p y 16q están en relación con el pronóstico de los pacientes con TW.

Una de las alteraciones con mayor prevalencia es la ganancia del cromosoma 1q observada en el 30 % de los casos con TW (5, 35). La ganancia de 1q se ha asociado con incremento en la recurrencia tumoral y/o una disminución en la supervivencia. En esta región se localizan secuencias de RNAs codificantes y no codificantes muchos de los cuales no han sido descritos y que pueden conferir el pronóstico adverso. Dentro de 1q, la región 1q22-25 se ha encontrado alterada de forma significativa en el TW. En esta región se localizan alrededor de 25 miRNAs, entre los que destacan miR-199 y miR-214, los cuales se han descrito en otros tipos de cáncer. Se encuentran localizados en el mismo locus genómico y son transcritos por el mismo promotor. Ambos tienen como blancos RNAs mensajeros que participan en la vía de señalización Wnt (figura 2.4).(36)

Existen dos locus genómicos que dan lugar al miR-199 uno se localiza en el cromosoma 19, el cual da lugar al miR-199a1 y el que se origina en el cromosoma 1 que pertenece al miR-199a2. La secuencia de miR-199a2 se encuentra contigua a miR-214.(37)

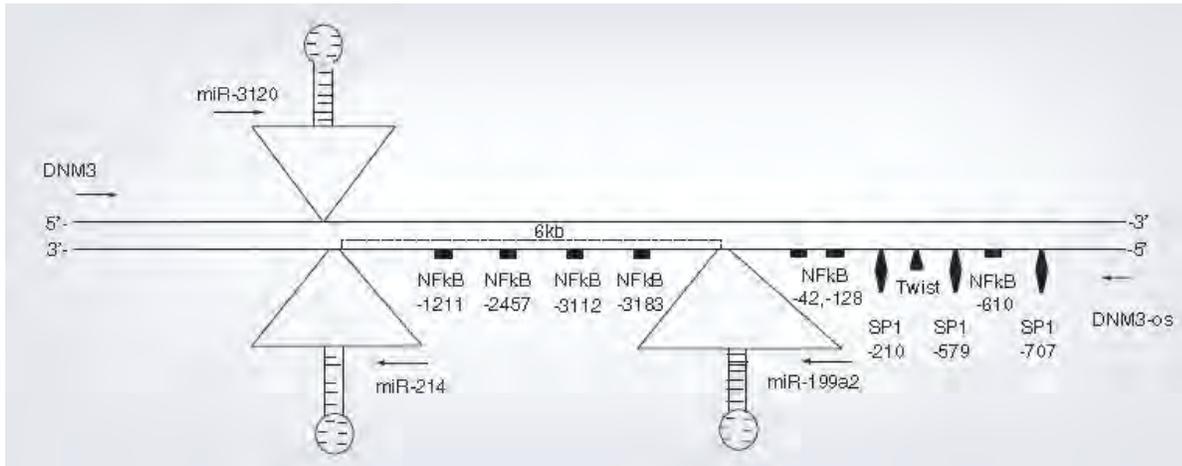


Figura 2.4. Localización genómica de miR-214 y miR-199. Ambos se encuentran separados por una distancia de 6 kb y son co-transcritos. Se observan varios sitios de unión para NFκB, para Twist.(36)

La secuencia que alberga a miR-214 y miR-199a2 se localiza en el cromosoma 1q24.3 en el intrón 14 del gen Dinamina 3 (*DNM3*). La distancia entre ambos miRNAs es de 6 kb. En este intrón también se localiza un RNA largo no codificante (lncRNA) denominado DNMT3os de aproximadamente 7.9 kb de longitud. Factores como *Twist-1*, *ZEB1*, *EZH2*, *NFκB* y *SMAD4* controlan la transcripción de los miRNAs y del lncRNA DNMT3os.(38)

En ambos miRNAs se han validado blancos importantes. En el caso de miR-214-3p: *CTNNB1* (β-catenina), *EZH2*, *PTEN*, *TP53*, *TWIST1*, etc. En el caso de miR-199a-5p se han identificado *WNT2*, *GSK3B*, *EZH2*, *FZD4*, *JAG1*, *HIF1a*, *E-caderina*, etc. (35)

hsa-miR-214-3p

En estudios recientes se encontró que el miR-214 es un supresor de tumores que actúa directa o indirectamente sobre la β -catenina inhibiendo el crecimiento celular mediante la regulación negativa del *c-Myc*, *cyclin D1*, *TCF-1* y *LEF* en el carcinoma hepatocelular. (39)

En algunos adenocarcinomas la expresión del miR-214 está relacionada negativamente con la expresión de *CTNNB1*. miR-214 inhibe la expresión de *CTNNB1* en el adenocarcinoma de pulmón, por lo tanto, la expresión de miR-214 se ha encontrado elevada en adenocarcinoma de pulmón, esto se ha asociado a estadios avanzados del tumor, altas tasas de recurrencia y baja supervivencia. (40) *CTNNB1* da origen a β -catenina, miR-214 inhibe o disminuye la traducción de β -catenina (24).



Figura 2.5. Efecto del miR-214 en la vía de señalización Wnt en tumores. Dependiendo de la abundancia del miRNA será el grado de inhibición de *CTNNB1* y en consecuencia de β -catenina.

hsa-miR-199a2-5p

En el caso de hsa-miR-199 existen dos miRNAs, con secuencia similar, pero se transcriben de cromosomas distintos. El miR-199a1 se localiza en el cromosoma

19p13.12 y el miR-199a2 se localiza en el cromosoma 1q24.3. Estudios recientes en células de fibroblastos renales indican que miR-199a-3p y miR-199a-5p aumentan la proliferación y activación celular, sin embargo, miR-199a-3p tuvo en general mayor actividad que miR-199a-5p. Otros estudios han demostrado que miR-199a-5p tiene un papel importante en la fibrogénesis en el pulmón, principalmente mediante la inhibición en la expresión de caveolin-1(41).

miR-199 participa en la vía Wnt teniendo como blancos a *FZD4*, *JAG1*, *WNT2* y *GSK3B*. El miR-199 regula negativamente al *GSK3B*. La proteína *GSK3B* es importante junto con *CK1 α* , *APC* y *axina* en la vía de señalización Wnt, ya que promueven la degradación de β -catenina y evitan su actividad como factor de transcripción (42). La *GSK3B* marca a β -catenina por medio de fosforilación para su ubiquitinación y rápida degradación mediante proteosomas. (14)



Figura 2.6. Efecto del miR-199 en la vía de señalización Wnt en tumores. miR-199 inhibe a *GSK3B* por lo tanto no se unirá al complejo de proteínas que promueve la degradación de β -catenina, teniendo como consecuencia menor degradación de β -catenina. (14)

Se ha encontrado que la disminución en la expresión de miRNA-199 está relacionada con una sobre expresión de la proteína *GSK3B* y con etapas avanzadas en tumores renales. (32)

Expresión de hsa-miR-199a5p y hsa-miR-214-3p en diferentes tipos de cáncer

En trabajos anteriores se encontró que miR-214 posee actividad oncogénica o supresora de tumores en diferentes tipos de cáncer dependiendo de los genes blanco y el tipo de tejido (36). En cáncer de esófago y de mama, se encontró que la expresión de miR-214 estaba significativamente más baja comparada con tejidos sanos, se menciona que este miRNA funciona como supresor de tumores y su expresión en condiciones normales debe ser abundante para modular la expresión de genes relacionados con proliferación celular.(43, 44)

Estudios recientes han demostrado que en cultivos de células estromales renales humanas la inhibición en la función de miR-214 da como resultado células hipoactivas, hipomigratorias e hipoproliferativas en respuesta a estímulos activadores. También se reportó que en células cancerígenas ocurría lo mismo, haciendo que estas tuvieran menos capacidad de migración, pero más resistentes al estrés citotóxico.(41)

En cuanto a miR-199a-5p se ha demostrado que éste retarda la proliferación, migración e invasión de células madre, presentando un papel como supresor de tumores en diferentes tipos de cáncer tales como cáncer de mama, gástrico, colorrectal o renal. (41, 42, 45)

Específicamente en cáncer renal se evaluó la expresión de miR-199 y *GSK3B* (factor que participa en la vía Wnt), se encontró que miR-199 estaba disminuida y *GSK3B* se encontraba incrementada, esto condujo a una mayor respuesta a la degradación de β -catenina.(42)

Por otra parte, la expresión de miR-199a-5p es significativamente mayor en cáncer gástrico comparado con tejidos sanos. Se observó que miR-199a-5p puede promover la migración e invasión celular en este tipo de cáncer. También se confirmó por medio de una hibridación *in situ* que la expresión elevada de este miR está asociada con una mayor probabilidad de metástasis a los ganglios linfáticos, por lo tanto, miR-199a-5p está funcionando como un oncogén en el cáncer gástrico. (46)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

El tumor de Wilms es el tumor renal más común en la edad pediátrica. En México se tiene una incidencia anual de 7.6 casos por millón en niños menores de 15 años y es la séptima causa de morbilidad por cáncer. En la mayoría de los casos la presentación del TW es de forma esporádica (98%). El pronóstico de los pacientes con TW en general es bueno alcanzando una supervivencia a 5 años de más del 80%. El 20% restante presenta recaídas y bajas tasas de supervivencia. Se han descrito varias alteraciones genéticas que contribuyen al desarrollo de este tumor, como la ganancia en el cromosoma 1q presente en cerca del 30% de casos. Esta alteración se considera un biomarcador potencial en el TW. La región 1q22-q25 es la que se ha encontrado con mayor frecuencia alterada. Dentro de esta región se encuentran alrededor de 25 miRNAs, dentro de los que destacan el clúster formado por miR-199 y miR-214. Ambos tienen como blanco moléculas clave en la vía canónica de Wnt como son *GSK-3 β* y β -catenina, respectivamente. El análisis de expresión de miRNAs involucrados en la ruta de señalización Wnt constituye un acercamiento importante para entender la etiología del tumor de Wilms. Los cambios en su expresión pueden alterar la vía Wnt y delinear un mecanismo de regulación post-transcripcional poco explorado entre subgrupos de TW.

En la literatura no se encuentra descrita la expresión de ambos miRNAs o información sobre la regulación del tumor por medio de miR-199 y miR-214, como se mencionó anteriormente ambos miRNAs tienen como blancos moléculas que participan en mecanismos de regulación y podrían fungir como buenos marcadores moleculares.

HIPÓTESIS.

En el Tumor de Wilms (TW) la expresión de hsa-199-a-5p y hsa-214-3p se encuentra alterada de manera diferencial con respecto a riñón sin tumor. Estos cambios permiten identificar la participación de los miRNAs en la vía de señalización WNT en este tipo de tumor y se traduce en el comportamiento biológico de la neoplasia.

OBJETIVOS.

Determinar la expresión de los miRNAs hsa-199-a-5p y hsa-214-3p en pacientes pediátricos con TW en el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) del año 2007 a 2013.

Objetivos específicos

1. Comparar la expresión de los miRNAs 214-3p y 199-a-5p en casos fijados en formol e incluidos en parafina de TW y riñón sano.
2. Comparar la expresión de miR-199a-5p y -214-3p en los distintos subtipos histológicos de TW (predominio blastemal, mesenquimal, epitelial, anaplásico).
3. Correlacionar la expresión de los miRNAs con datos clínicos de los pacientes.

MATERIAL Y MÉTODOS

Diseño (Tipo de estudio)

- Descriptivo
- Transversal

Población de estudio.

Muestras de pacientes del HIMFG con diagnóstico de TW del año 2007 a 2013.

Variables.

- Concentración de RNA (ng/ μ L)
- Expresión de los miRNAs en la PCR en tiempo real.

Criterios de Inclusión

- Muestra de tejido incluidos en parafina, con diagnóstico de Tumor de Wilms
- Muestras con 80% de tejido libre de necrosis, con patrón histológico íntegro.

Criterios de exclusión y eliminación

- Que no se localicen los bloques de parafina.
- Muestras con un porcentaje de necrosis mayor al 20%.
- Muestras con ARN degradado.

Técnicas

Desparafinar tejidos

Material biológico

Se incluyeron 20 casos de TW fijados en formol e incluidos en parafina. Se tomaron 9 casos de tejido sano en pacientes que no presentan TW como grupo control.

En cada caso, a partir del bloque de parafina se realizaron 4 cortes cada uno de 10 μm y se colocaron en microtubos de 1.5 mL.

Material y equipo

- Micropipeta 1 mL, 100 μL , 200 μL (Brand).
- Incubadora Incubator Shaker II (Bockel industries Inc).
- Vortex-2 Genie (scientific industries)
- Microcentrifuga Myfuge (Benchmark)

Reactivos

- Xilol (Fisher)
- Etanol grado molecular (Merck)
- Buffer de digestión (Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion))
- Proteínasa K (Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion))

Método

Se tomó un corte de 10 μm y se colocó en un microtubo de 1.5 mL para eliminar la parafina, se agregó 1 mL de xilol, agitó en vortex e incubó por 5 minutos a 45 °C.

Lo anterior se repitió una vez más y se procedió a eliminar el xilol de la siguiente forma:

Realizando tres lavados con 1 mL de etanol, agitando en cada ocasión, se centrifugó 1 minuto a 12000 rpm y se decantó el sobrenadante. El procedimiento se repite dos veces con cada concentración de etanol.

- Etanol absoluto
- Etanol 90%
- Etanol 75%

Se abrieron los tubos para permitir la evaporación de etanol y después se agregaron 200 μ L del buffer de digestión y 4 μ L de proteinasa K. Se dejó toda la noche en incubación a 50 °C.

Extracción de RNA

Material y equipo

- EPOCH (BioTeK) software Gen5 2.09
- Microcentrifuga Myfuge (Benchmark)
- Micropipetas 1 mL, 100 μ L, 200 μ L (Brand).

Reactivos

- Kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion)
 - Wash 1 Concentrado (Adicionar 42 mL de etanol 100% antes de usarlo)
 - Wash 2/3 Concentrado (Adicionar 48 mL de etanol 100% antes de usarlo)

- Tubos colectores
- Columnas de filtración
- Aditivo de aislamiento
- Solución de elución
- 10X DNase Buffer
- DNase
- Etanol absoluto grado molecular

Método

Se preparó la mezcla etanol/aditivo de aislamiento agregando: 240 μL de aditivo de aislamiento y 550 μL de etanol absoluto grado molecular. El volumen final (790 μL) corresponde solo a una muestra. Se agregó 790 μL de la mezcla a cada muestra después de la digestión y mezclando con ayuda de la misma pipeta subiendo y bajando el volumen.

Se montaron las columnas de filtración dentro de los tubos colectores y se agregó dentro de las columnas 700 μL de la mezcla anterior. Posteriormente se centrifugó a 10000 rpm por 30 segundos. Se decantó el volumen que paso a través del cartucho de filtración.

Se repitió el paso anterior con el volumen restante de la mezcla, evitando grandes piezas de tejido.

Se adicionaron 700 μL de Wash 1 a la columna de filtración. Se centrifugó 30 segundos a 10000 rpm y se descartó el volumen. A continuación, se agregaron

500 μ L de Wash 2/3 y se procedió de la misma forma, centrifugando una vez más para eliminar el fluido que pudiera quedarse en la columna de filtración.

Se realizó un tratamiento para eliminar el DNA mezclando 6 μ L 10x Buffer de DNasa, 4 μ L DNasa y 50 μ L de agua libre de nucleasas. Se agregaron los 60 μ L de la mezcla en el centro de la columna de filtración y se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente.

Nuevamente se realizaron los lavados de la columna de filtración con Wash 1 y Wash 2/3 de la misma manera. Repitiendo el lavado con Wash 2/3 dos veces.

Se transfirió la columna de filtración a un tubo colector nuevo y se agregaron 60 μ L de la solución de elución. Se incubó por un minuto a temperatura ambiente y se centrifugó por un minuto a máxima velocidad.

Se determinó la concentración y pureza del RNA total de cada muestra en el equipo EPOCH (BioTeK) software Gen5 2.09 y se incluyeron las que tuvieron una relación de A260/A280 de 1.7 a 2.1.

Ensayo de Transcriptasa reversa

Material y Equipo

- Termociclador Stratagene 3500 (Agilent)

Material biológico

- 200 ng de RNA total

Reactivos

- Kit TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystem, Manasas Ca)

Método

A continuación, se realizó la reacción de transcriptasa reversa con 200 ng de RNA total usando el kit TaqMan microRNA reverse transcription kit (Applied Biosystem, Manasas Ca) en un volumen total de 10 μ L.

Se utilizaron sondas de hidrólisis (TaqMan) para amplificar los microRNAs miR-199 y miR-214 utilizando como gen de referencia a RNU48. Las muestras se amplificaron en un termociclador Stratagene 3500 (Agilent) con el programa de amplificación: 50 °C 2 min, 95 °C 10 min, posteriormente 40 ciclos a 95 °C 15 seg (desnaturalización) y 60 °C 1 min (alineamiento/extensión). En cada caso se realizaron determinaciones por triplicado y se obtuvo promedio y desviación estándar. Dichos valores fueron normalizados con el control endógeno RNU48.

Se realizó una cuantificación relativa mediante el método Ct comparativo (Delta Ct). Los valores de expresión de los miRNAs se compararon contra los valores de expresión de los controles (tejido renal normal) 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: expresión aumentada cuando el número de veces fue mayor o igual a dos en el tumor en comparación con el control, expresión baja cuando el número de veces fue dos veces menor en el tumor, en

comparación con el control; se consideró expresión sin cambios cuando el número de veces fue menor de dos.

Análisis estadístico

Se empleó el programa computacional GraphPad Prism (versión 5) para comparar las diferencias en la expresión de los microRNAs. Se determinó el promedio de la expresión de miR-199 y 214 en los TW y se comparó contra tejido renal control (no neoplásico). Y empleando la distribución t de student. Se empleó esta misma distribución para realizar una comparación entre tejidos con TW que presentaban anaplasia y los que no la presentaban.

En la comparación de los diferentes estadios presentes en los tumores se utilizó el modelo de ANOVA para determinar diferencia significativa entre grupos. Estos cálculos se realizaron con el programa computacional GraphPad Prism.

RESULTADOS

Se incluyeron 19 pacientes, 11 de sexo femenino y 8 sexo masculino. El rango de edad abarcó desde los 8 meses hasta los 9 años; 15 pacientes tuvieron ≤ 4 años (75%); el siguiente grupo etario fue de "9 años" con 2 pacientes (10%) y por último dos pacientes con 5 y 7 años. En cuanto a la histología predominaron los tumores con tejido blastemal (60%), el 83 % de los tumores con anaplasia tuvieron predominio blastemal. (Cuadro 7.1).

Cuadro 7.1. Datos clínicos de pacientes con TW.

No. Tumor	Sexo	Edad al diagnóstico en años	Histología	Anaplasia (1:si, 0:no)	Estadio
1	M	1	ESTROMAL	0	V
6	F	2	TRIFASICO	0	III
7	F	9	BLASTEMAL	0	III
8	F	3	BLASTEMAL	0	I
9	M	3	BLASTEMAL	1	IV
10	F	4	BLASTEMAL	0	III
13	F	0.7	BLASTEMAL	0	V
14	F	3	BLASTEMAL	0	IV
15	M	1	TRIFASICO	0	II
21	F	3	BLASTEMAL	1	III
22	F	7	BLASTEMAL	1	III
23	M	9	BLASTEMAL	0	III
24	M	5	TRIFASICO	0	IV
25	M	2	BLASTEMAL	1	IV
26	F	4	BLASTEMAL	0	II
28	F	4	TRIFASICO	0	IV
29	M	1	TRIFASICO	0	III
30	M	1	TRIFASICO	0	II
40	F	4	BLASTEMAL	1	IV

En el grupo control se comparó la expresión entre miR-199 y 214. En cada caso se determinó la relación entre la expresión de ambos miRNAs, siendo evidente mayor abundancia de miR-214, en promedio 287 veces más expresado que el miR-199 (Cuadro 7.2).

Cuadro 7.2. Expresión de miR-199 y 214 en riñones control. En todos los casos la expresión de miR-214 fue mayor con respecto a miR-199.

No. control	miR-199 Control	miR-214-Control	Relación miR-214/miR-199
1	0.0006	0.3415	502.623
2	0.0041	0.6658	161.456
3	0.0019	0.2822	147.033
4	0.0020	0.2415	121.095
5	0.0014	0.4506	324.408
6	0.0030	0.2973	98.133
7	0.0010	0.4527	434.537
8	0.0019	0.3842	208.177
9	0.0016	0.9548	592.224
		Promedio	287.743
		Rango	592.224-98.133

En el caso de los tumores, también se comparó la expresión entre ambos miRNAs mostrando mayor expresión de miR-214 en todos los casos (Cuadro 7.3).

Cuadro 7.3. Expresión relativa de miR- 199 y 214 en pacientes con TW. En todos los casos la expresión de miR-214 fue al menos 20 veces mayor que la de miR-199.

No. Tumor	miR-199	miR-214	Relación miR-214/miR-199
1	0.00685	0.89397	130.53564
6	0.00918	0.21915	23.86239
7	0.00123	0.24656	200.38996
8	0.00089	0.24770	279.49278
9	0.00380	0.17354	45.67503
10	0.00549	0.78277	142.68270
13	0.00053	0.15550	293.04961
14	0.00366	0.12328	33.70756
15	0.00120	0.60430	503.78570
21	0.00044	0.02480	56.36257
22	0.00018	0.04972	269.97209
23	0.00472	0.62201	131.90298
24	0.00914	0.61273	67.02682
25	0.00081	0.04693	57.88024
26	0.00103	0.05441	53.07645
28	0.00016	0.02368	148.56982
29	0.00086	0.46544	538.69798
30	0.00086	0.35030	405.43663
40	0.00254	0.12866	50.73818
Promedio			64.86563
Rango			538.6979-23.86239

Los datos de expresión de miR-199 en los tumores se compararon contra los valores obtenidos en los controles y en este caso las diferencias no fueron significativas (Cuadro 7.4). De igual forma en el caso de miR-214 las diferencias en la expresión con los controles tampoco resultaron significativas (Cuadro 7.5).

Cuadro 7.4. Resultados en la prueba t de student para miR-199 vs Control

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column A	miR-199
vs	vs
Column B	CONTROL
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.2714
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=1.126 df=24
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.002819 ± 0.0006794 N=19
Mean ± SEM of column B	0.001960 ± 0.0003491 N=9
Difference between means	0.0008599 ± 0.0007639
95% confidence interval	-0.0007167 to 0.002437
R squared	0.05016
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	7.998, 18, 8
P value	0.0054
P value summary	**
Are variances significantly different?	Yes

Cuadro 7.5. Resultados en la prueba t de student para miR-214 vs Control

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column D	mir-214
vs	vs
Column E	CONTROL
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.1563
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=1.480 df=18
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column D	0.3066 ± 0.06301 N=19
Mean ± SEM of column E	0.4523 ± 0.07569 N=9
Difference between means	-0.1457 ± 0.09848
95% confidence interval	-0.3526 to 0.06120
R squared	0.1084
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	1.463, 18, 8
P value	0.5987
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Los valores promedio de expresión mostrados en tabla 4 y 5 se graficaron para mostrar la abundancia de cada miRNA en los controles, en los tumores y entre ambos microRNAs. La expresión de miR-199 fue mayor que en el grupo control (1.43 veces, diferencia no significativa). En el caso de miR-214 su expresión fue menor en comparación con el grupo control (1.47 veces, diferencia no significativa) (Figura 7.1).

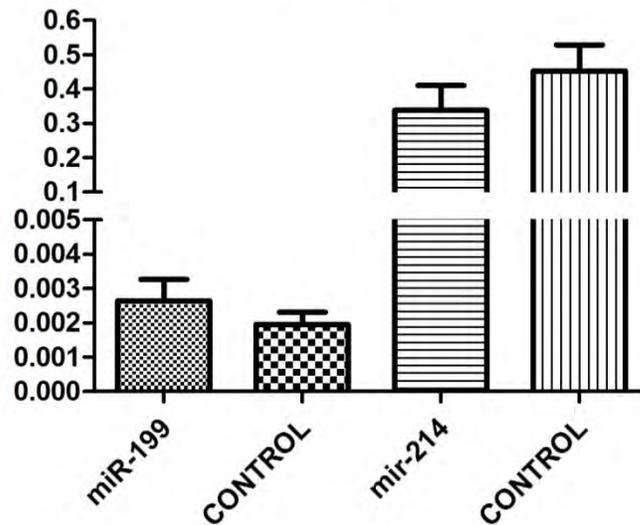


Figura 7.1. Comparación en la expresión de miR-199 y miR-214 contra el grupo control de riñones control.

De los 20 tumores analizados 5 mostraron anaplasia, así que separamos y comparamos los valores de expresión de los tumores con anaplasia y sin anaplasia, en el caso de miR-199 la expresión de los tumores con anaplasia fue 2.3 veces menor (Cuadro 7.6). En el caso de miR-214 su expresión fue 1.4 veces menor en casos con anaplasia con una diferencia significativa (Cuadro 7.7).

Cuadro 7.6. Resultados en la prueba t de student para miR-199: TW con anaplasia vs TW sin anaplasia

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column A	Anaplasia miR-199
vs	vs
Column B	NO anaplasia miR-199
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.1450
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=1.543 df=14
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.001554 ± 0.0006955 N=5
Mean ± SEM of column B	0.003271 ± 0.0008686 N=14
Difference between means	-0.001717 ± 0.001113
95% confidence interval	-0.004104 to 0.0006695
R squared	0.1454
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	4.367, 13, 4
P value	0.1656
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Cuadro 7.7. Resultados en la prueba t de student para miR-214: TW con anaplasia vs TW sin anaplasia

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column D	Anaplasia miR-214
vs	vs
Column E	NO Anaplasia miR-214
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.0018
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=3.782 df=15
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column D	0.08473 ± 0.02834 N=5
Mean ± SEM of column E	0.3858 ± 0.07441 N=14
Difference between means	-0.3011 ± 0.07962
95% confidence interval	-0.4708 to -0.1314
R squared	0.4881
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	19.30, 13, 4
P value	0.0113
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes

Se realizó una gráfica con los resultados promedio de los casos descritos con anaplasia encontrándose una diferencia significativa en la expresión de miR-214 ($p= 0.018$) (Figura 7.2)

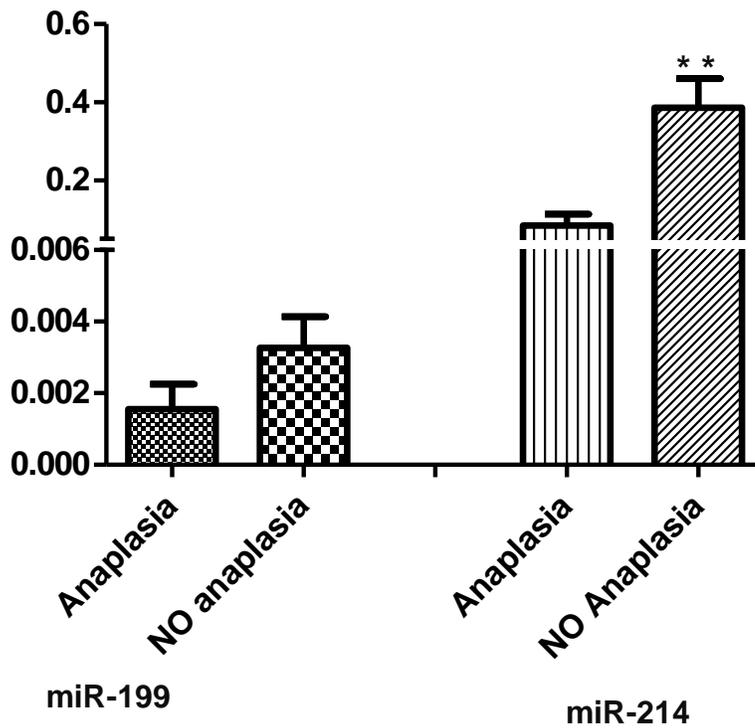


Figura 7.2. Comparación en la expresión de miR-199 y miR-214 en TW con anaplasia y TW sin anaplasia. **En este caso se observa una diferencia significativa con p calculada= 0.0018.

De los 5 tumores que mostraron anaplasia se compararon las expresiones de ambos miRNAs contra el grupo control. En el caso de miR-199 la expresión de los tumores con anaplasia fue 1.3 veces menor (Cuadro 7.8). En el caso de miR-214 su expresión fue 5.3 veces menor en casos con anaplasia con una diferencia significativa (Cuadro 7.9).

Cuadro 7.8. Resultados en la prueba t de student para miR-199: tejido control contra tejido con anaplasia.

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column A	Control
vs	vs
Column B	Anaplásicos
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.6218
P value summary	ns
Are means signif. different? (P < 0.05)	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=0.5199 df=6
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.001959 ± 0.0003488 N=9
Mean ± SEM of column B	0.001554 ± 0.0006964 N=5
Difference between means	0.0004049 ± 0.0007788
95% confidence interval	-0.001501 to 0.002311
R squared	0.04310
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	2.215, 4, 8
P value	0.3145
P value summary	ns
Are variances significantly different?	No

Cuadro 7.9. Resultados en la prueba t de student para miR-214: tejido sano contra tejido con anaplasia.

	Data Set-A
Table Analyzed	Data 1
Column A	miR-214 Tejidos control
vs	vs
Column B	miR-214 Tejidos anaplasticos
Unpaired t test with Welch's correction	
P value	0.0011
P value summary	**
Are means signif. different? (P < 0.05)	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed
Welch-corrected t, df	t=4.548 df=10
How big is the difference?	
Mean ± SEM of column A	0.4523 ± 0.07569 N=9
Mean ± SEM of column B	0.08473 ± 0.02834 N=5
Difference between means	0.3676 ± 0.08082
95% confidence interval	0.1875 to 0.5476
R squared	0.6741
F test to compare variances	
F,DFn, Dfd	12.84, 8, 4
P value	0.0261
P value summary	*
Are variances significantly different?	Yes

Se realizó una gráfica con los resultados promedio de los casos descritos con anaplasia y grupo control encontrándose una diferencia significativa en la expresión de miR-214 ($p= 0.001$) (Figura 7.3).

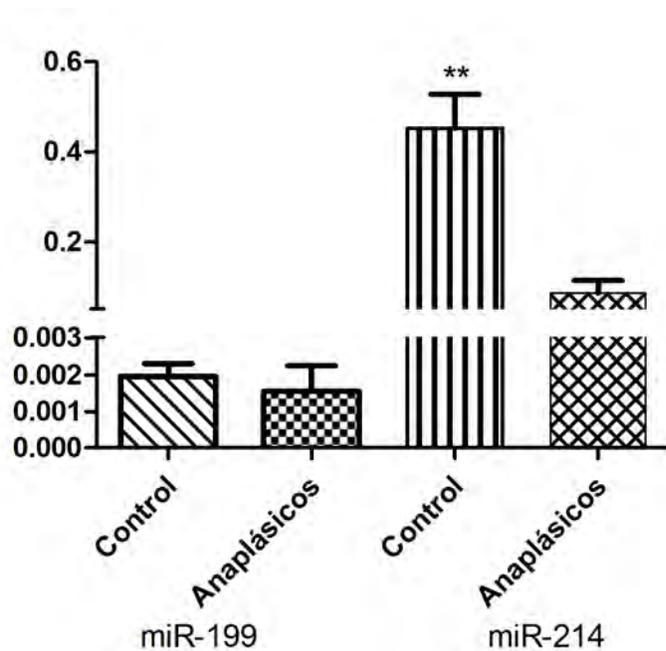


Figura 7.3. Comparación en la expresión de miR-199 y miR-214 en tejidos control y tejidos con anaplasia. **En este caso se observa una diferencia significativa con p calculada= 0.0011

En los 20 casos analizados con tumor de Wilms se realizó una clasificación de acuerdo con el estadio, teniendo así los estadios II, III, IV y X con 3, 7, 5 y 2 pacientes respectivamente. Se realizó una comparación de la expresión de ambos miRNAs entre dichos estadios (Cuadro 10 y 11).

Cuadro 7.10. Prueba ANOVA en miR-199, comparación entre estadios

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0.7242		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
F	0.4456		
R squared	0.08717		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0.00001342	3	0.000004473
Residual (within columns)	0.0001405	14	0.00001004
Total	0.0001539	17	

Se procedió a realizar una gráfica con los datos obtenidos en cada expresión para miR-199 (Figura 7.4) y miR-214 (Figura 7.5).

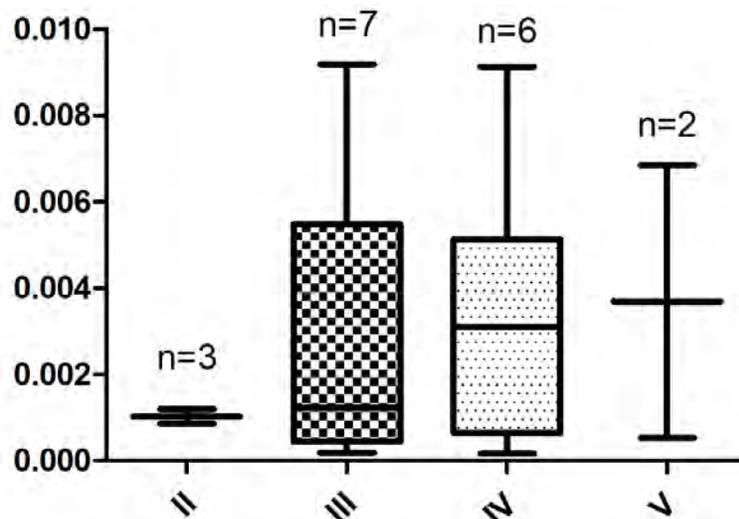


Figura 7.4. Comparación en la expresión de miR-199 en distintos estadios.

Cuadro 7.11. Prueba ANOVA en miR-214, comparación de estadios.

	Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C
Table Analyzed	Data 1		
One-way analysis of variance			
P value	0.5180		
P value summary	ns		
Are means signif. different? (P < 0.05)	No		
Number of groups	4		
F	0.7927		
R squared	0.1452		
ANOVA Table	SS	df	MS
Treatment (between columns)	0.1966	3	0.06554
Residual (within columns)	1.157	14	0.08267
Total	1.354	17	

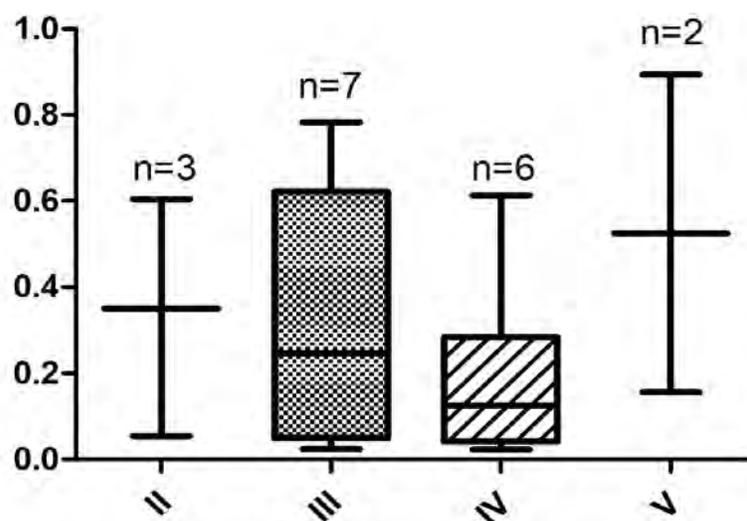


Figura 7.5. Comparación en la expresión de miR-214 en diferentes estadios.

DISCUSIÓN

En este estudio se describió la alteración en la expresión de dos miRNAs localizados en una región que se amplifica en un tercio de los casos de tumor de Wilms (1q23) y que además tienen como blancos RNAm que participan en la vía de señalización Wnt. La vía Wnt se encuentra alterada con frecuencia en el TW ya sea por alteración en algún componente del complejo de destrucción o bien por mutación con ganancia de funciones de la proteína β -catenina (*CTNNB1*) (47).

Se realizó una comparación en riñones con TW y un grupo control de riñones libres de tumor para ambos miRNAs (miR-199 y miR-214). En este estudio la expresión de miR-199 en los pacientes con TW fue 1.4 veces más alta con respecto a riñón control (Figura 7.1). Posteriormente analizamos los datos separando los casos con anaplasia y sin anaplasia, en los tumores con anaplasia la expresión de miR-199 disminuyó 2.3 veces de manera significativa (Figura 7.2). No se ha reportado en estudios anteriores por lo cual resulta de gran interés debido a que los tumores con anaplasia presentan baja respuesta a la terapia, mayor resistencia al tratamiento y su pronóstico es reservado (6, 7). En otros tumores la expresión de miR-199 ha sido variable, ya que en algunos tipos de cáncer como el cáncer gástrico se encuentra aumentado de forma significativa, actuando sobre los genes *klotho* jugando el papel como oncogén (46). Los genes *klotho* codifican una proteína de membrana tipo-I que está relacionada con β -glucósidos (43). En cambio, en el carcinoma de células renales se ha encontrado disminuido de forma significativa y se ha relacionado de manera inversa con la expresión de uno de sus blancos como es *GSK3B* (42).

Sabemos que miR-199 tiene como blanco a *GSK-3B* (42) que forma parte del complejo destructor de la β -catenina en la vía WNT por lo que la alteración en algún componente afecta la degradación de la β -catenina (42). En este estudio miR-199 mostró una baja expresión por lo que probablemente no es un factor que influya en la inhibición de *GSK-3B* y éste a su vez continúa degradando a β -catenina manteniendo una baja transcripción. Al respecto Tsukigi y col. reportaron que la disminución en la expresión de miR-199 se correlacionó significativamente con estadios avanzados de carcinoma de células renales y aumentó en el riesgo de recurrencia tumoral. Sus resultados también sugieren que la disminución de miR-199 puede causar sobreexpresión nuclear de *GSK3B* (42, 46). Un dato importante que puede explicar la baja expresión de miR-199 en el TW con anaplasia es la metilación del DNA en el locus de miR-199a en el cromosoma 1 y 19, como lo demostró Tsukigi para el carcinoma de células renales. (42)

También deben existir otros blancos que se ven afectados con la disminución en la expresión de miR-199, pero que no han sido validados en TW como *WNT2*, *GSK3B*, *EZH2*, *FZD7*, *JAG1*, *HIF1a*, *E-caderina*. Al parecer miR-199 coopera en la alteración de esta vía sin embargo no de forma relevante.

Se ha evaluado que varios blancos de miR-199 actúan como ligando/receptor de la vía Wnt, cuando un miRNA presenta ese tipo de blancos o un blanco ligando/receptor asociado a la inhibición de proteínas, la vía de señalización puede ser suprimida por este medio.(14)

En el caso de miR-214 su expresión disminuyó 1.3 veces en el TW con respecto a tejido control (Figura 7.1), esta diferencia se acentuó entre los TW con anaplasia y casos control (5.3 veces) (cuadro 7.9). Encontrándose disminuido 1.4 veces en tumores con anaplasia en comparación con los tumores sin anaplasia, la diferencia fue significativa (cuadro 7.7). MiR-214 se ha encontrado alterado en varias neoplasias mostrando un comportamiento ambivalente dependiendo del contexto celular (38). Así tenemos que en cáncer de mama, cáncer de esófago entre otros tipos de cáncer su expresión se ve disminuida. En el cáncer hepatocelular se observó que la re-expresión de miR-214 aumentó el número de células apoptóticas (48).

Este miRNA juega un papel importante en la vía Wnt ya que inhibe la traducción de la β -catenina evitando su acumulación en el citoplasma. En estos tumores se sabe que la vía Wnt está activa, los miRNAs como miR-214 pueden ayudar a regular la abundancia de β -catenina, pero cuando esta disminuido como es en este estudio, la β -catenina favorece la transcripción de genes relacionados con proliferación celular. Entre los principales genes que se transcriben y favorecen el desarrollo del tumor, se encuentran: tumor de Wilms 1 (WT1), *CTNNB1*, *AMER1*, *DROSHA*, *DGCR8*, *XPO5*, *DICER*, *SIX1*, *SIX2*, *MLLT1*, *MYCN*, and *TP53* (49, 50). Es importante mencionar que en el TW se han descrito mutaciones en Drosha, DGCR8 y DICER, proteínas que participan en la biogénesis de los miRNAs lo que conlleva a baja expresión de los mismos, en el caso de miRNAs con funciones supresoras de tumor (51).

Comparando los resultados de estudios anteriores con los del presente estudio se observa que miR-214 funciona como un supresor de tumores y regulador clave para bloquear la vía Wnt por medio de la regulación de la expresión de β -catenina que es uno de sus blancos validados experimentalmente.(52)

En cuanto a la comparación en la expresión entre ambos miRNAs en TW, se encontró que la expresión de miR-214 fue mayor 64.9 veces (cuadro 7.3) en comparación con la expresión de miR-199. La expresión diferencial es notable, a pesar de que ambos miRNAs se localizan en el mismo locus genómico a 6 kb de distancia uno con otro y se ha descrito que su transcripción está regulada por Twist-1. Se ha demostrado en estudios anteriores que al inhibir la expresión de Twist-1 los niveles de miR-199 y miR-214 se encuentran disminuidos (35). La gran diferencia en la expresión de los miRNAs en nuestro trabajo indica que existen otros factores que regulan la transcripción de forma diferencial (secuencias enhancer, sitios CTCF, etc.) y que actúan dependiendo del tipo celular y microambiente de las células tumorales.(37). A este respecto Bhatt en el 2011 menciona que la actividad en la región promotora de genes que contienen miRNAs es gobernada por factores de transcripción específicos como *MYC*, *p53* y *HIF1 α* (factor inducible de hipoxia). Además, los miRNAs bajo ciertas condiciones de daño celular pueden sintetizarse rápidamente y luego disminuir, aunque la maquinaria molecular responsable de su degradación es poco conocida (53).

CONCLUSIONES

Ambos miRNAs se encontraron con expresiones bajas en los tumores con anaplasia siendo más acentuado en el caso de miR-214-3p.

En tejidos con anaplasia (de peor pronóstico) miR-214-3p está disminuido lo que evita que pueda regular a β -catenina en la vía de señalización Wnt, como resultado que β -catenina favorezca la transcripción de genes relacionados con proliferación celular (*MYC*, *CCND1*, *PPARD*), diferenciación de células madre (*ASCL2*), diferenciación celular (*ID2*, *ITF2*, *ENC1*), migración (*MMP7*, *MMP14*) y angiogénesis (*VEGF*).

No se logró realizar una comparación entre subtipos histológicos debido al número de casos clínicos, sin embargo, se realizó una comparación entre estadios de TW y se observó que en el estadio V (tumor renal bilateral) es donde se encuentran las expresiones más altas de ambos miRNAs.

Existen un mayor número de casos con TW de predominio blastemal en pacientes del sexo femenino y menores de cuatro años. Las expresiones más altas de miR-214 se observan en pacientes del sexo masculino. En cuanto a miR-199 las expresiones son homogéneas y no se observa alguna relación entre datos clínicos y expresión del miRNA.

PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos dan pie a seguir con la investigación determinando la expresión de moléculas blanco de estos miRNAs como β -catenina (gen y proteína), *GSK3B* (gen y proteína), etc. para tener una idea más clara sobre la vía de señalización Wnt.

También se podría realizar ensayos de *in vitro* en líneas celulares de riñón y evaluar el efecto de inducir o inhibir la expresión de estos miRNAs en la proliferación, invasión y apoptosis.

Así como, evaluar la diferencia inversa en ambos miRNAs, este resultado resulta interesante ya que ambos se encuentran dentro del mismo cluster y se sabe están regulados por el mismo promotor.

REFERENCIAS.

1. Rahul K. Histogenesis of Human Fetal Renal Cortex. *International Journal of Recent Trends in Science and Technology*. 2014; 9(3): 378-85.
2. Arteaga M. *Embriología Humana y Biología del Desarrollo*. México: Médica Panamericana; 2014.
3. Eibrink H. *Wilms Tumor*. Australia: Codon Publications; 2016.
4. Stocker JT. Hepatic tumors in children. *Clin Liver Dis*. 2001; 5(1): 259-81, viii-ix.
5. Natrajan R, Williams R, Hing S, Mackay A, Reis-Filho J, Fenwick K, et al. Array CGH profiling of favourable histology Wilms tumours reveals novel gains and losses associated with relapse. *J Pathol*. 2006; 210(1): 49-58.
6. Lima M. *Pediatric urology*. Italia: Springer; 2015. 391 p.
7. C. F. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 4 ed. EUA: Churchill Livingstone; 2013. 2294 p.
8. Stuart H, Thomas L, Lux S, Ginsburg G. *Oncology of Infancy and Childhood*. USA: Saunders Elsevier; 2009.
9. DeVita H, Rosenberg K. *Cancer: Principles and practice os oncology*. 8 ed. USA: Lippincott williams and wilkins; 2005.
10. R. S. *Temas de gastroenterología*. Caracas: Universidad central de Venezuela; 2003. Disponible en: <https://books.google.com.mx/books?id=4lxDAxfmjB8C&pg=PA90&dq=estadios+en+tumor+wilms&hl=es&sa=X&ved=0ahUKEwiE3PXOhOnWAhUm04MKHYjbClkQ6AEIJzAA#v=onepage&q=estadios%20en%20tumor%20wilms&f=false>.
11. Valoria J. *Atlas de cirugía pediátrica*. Venezuela: Santos; 1997.
12. Ruteshouser E, Robinson S, Huff V. Wilms tumor genetics: mutations in WT1, WTX, and CTNNB1 account for only about one-third of tumors. *Genes Chromosomes Cancer*. 2008; 47(6): 461-70.
13. Peng Y, Zhang X, Feng X, Fan X, Jin Z. The crosstalk between microRNAs and the Wnt/beta-catenin signaling pathway in cancer. *Oncotarget*. 2017; 8(8): 14089-106.
14. Ochoa B, Vazquez C, Rosales M, Barros P. WNT-beta-catenin signaling pathway and its relationship with cancer. *Cir Cir*. 2012; 80(4): 389-98.
15. Mantilla C. Mecanismos de señalización por B-catenina y su papel en la carcinogénesis. *Rev CES Med*. 2015; 29(1): 109-28.
16. Ramos M, Alvarez M, Garcia B, Jave L, Aguilar A. Wnt signalling pathway and cervical cancer. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2015;53 Suppl 2:S218-24.
17. Vargas I. *Mecanismos moleculares relacionados con la vía wnt/ β -catenina y la enfermedad psiquiátrica*. España: Universidad de Cantabria; 2015.
18. Herbst A, Jurinovic V, Krebs S, Thieme SE, Blum H, Goke B, et al. Comprehensive analysis of beta-catenin target genes in colorectal carcinoma cell lines with deregulated Wnt/beta-catenin signaling. *BMC Genomics*. 2014;15:74.
19. Morin P. B-catenin signaling and cancer. *BioEssays*. 2012; 21(12): 1021-30.

20. Díaz A, Suárez G, Fernández M. Nuevos métodos de extracción de ácidos ribonucleicos (ARN): herramientas básicas en la biología molecular. *Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia* 2015;31(4):1-5.
21. Fazli W, Taous K, Young Y. MicroRNAs: Synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2010;1803(11):1231-43.
22. Lagos M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*. 2001;294(5543):853-8.
23. Griffiths S, Grocock R, vanDongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*. 2006;34(suppl_1):D140-D4.
24. Arvanian V, Motin V, Mendell L. Comparison of metabotropic glutamate receptor responses at segmental and descending inputs to motoneurons in neonatal rat spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 2005;312(2):669-77.
25. Cunningham J, Oberg A, Borralho P, Kren B, French A, Wang L, et al. Evaluation of a new high-dimensional miRNA profiling platform. *BMC Med Genomics*. 2009;2:57.
26. Liu B, Shankar N, Turner DH. Fluorescence competition assay measurements of free energy changes for RNA pseudoknots. *Biochemistry*. 2010;49(3):623-34.
27. Bhalla AD, Gudikote JP, Wang J, Chan WK, Chang YF, Olivas OR, et al. Nonsense codons trigger an RNA partitioning shift. *J Biol Chem*. 2009;284(7):4062-72.
28. Eipper J, Eipper B, Mains R. Global Approaches to the Role of miRNAs in Drug-Induced Changes in Gene Expression. *Front Genet*. 2012;3:109.
29. Tan L, Lai W, Lee C, Kim D, Choe W. Differential interactions of plasmid DNA, RNA and endotoxin with immobilised and free metal ions. *J Chromatogr A*. 2007;1141(2):226-34.
30. Driskell J, Seto A, Jones L, Jokela S, Dluhy RA, Zhao Y, et al. Rapid microRNA (miRNA) detection and classification via surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS). *Biosens Bioelectron*. 2008;24(4):923-8.
31. Padwad Y, Mishra K, Jain M, Chanda S, Karan D, Ganju L. RNA interference mediated silencing of Hsp60 gene in human monocytic myeloma cell line U937 revealed decreased dengue virus multiplication. *Immunobiology*. 2009;214(6):422-9.
32. Calin G, Dumitru C, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(24):15524-9.
33. Volinia S, Calin G, Liu C, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(7):2257-61.
34. I. S. Papel de los androgénos en el desarrollo del cáncer de próstata: Un estudio sobre miRNAs. *Instituto Nacional de Medicina Genómica*. 2012;1(3):185-210.
35. Gratias EJ, Dome J, Jennings L, Chi Y, Tian J, Anderson J, et al. Association of Chromosome 1q Gain With Inferior Survival in Favorable-Histology Wilms Tumor: A Report From the Children's Oncology Group. *J Clin Oncol*. 2016;34(26):3189-94.

36. Sharma T, Hamilton R, Mandal CC. miR-214: a potential biomarker and therapeutic for different cancers. *Future Oncol.* 2015;11(2):349-63.
37. Lee Y, Bantounas I, Lee D, Phylactou L, Caldwell MA, Uney JB. Twist-1 regulates the miR-199a/214 cluster during development. *Nucleic Acids Res.* 2009;37(1):123-8.
38. Penna E, Orso F, Taverna D. miR-214 as a key hub that controls cancer networks: small player, multiple functions. *J Invest Dermatol.* 2015;135(4):960-9.
39. Yuan T, Pengyuan Y, Cheng A. Epigenetic Activation of Wnt/ β -Catenin Signaling in NAFLD-Associated Hepatocarcinogenesis. *Cancers.* 2016;8(8).
40. WEI Q, Xiaoming C, Jiani H, Tong X, Qijing I, Haixia L, Bo Z. Targeting the Wnt-Regulatory Protein CTNNBIP1 by microRNA-214 Enhances the Stemness and Self-Renewal of Cancer Stem-Like Cells in Lung Adenocarcinomas. *Stem Cells Express.* 2015:3423-36.
41. Gomez I, Duffield S. MicroRNAs as novel therapeutic targets to treat kidney injury and fibrosis *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 2016;310(10):931-44.
42. Tsukigi M, Bilim V, Yuuki K, Ugolkov A, Naito S, Nagaoka A, et al. Re-expression of miR-199a suppresses renal cancer cell proliferation and survival by targeting GSK-3 β . *Cancer Lett.* 2012;315(2):189-97.
43. Xu Y, Lu S. Regulation of beta-catenin-mediated esophageal cancer growth and invasion by miR-214. *Am J Transl Res.* 2015;7(11):2316-25.
44. Yi SJ, Li LL, Tu WB. MiR-214 negatively regulates proliferation and WNT/beta-catenin signaling in breast cancer. *Eur Rev Med Pharmacol Sci.* 2016;20(24):5148-54.
45. Kim BK, Yoo HI, Kim I, Park J, Kim Yoon S. FZD6 expression is negatively regulated by miR-199a-5p in human colorectal cancer. *BMB Rep.* 2015;48(6):360-6.
46. He XJ, Ma YY, Yu S, Jiang XT, Lu YD, Tao L, et al. Up-regulated miR-199a-5p in gastric cancer functions as an oncogene and targets klotho. *BMC Cancer.* 2014;14:218.
47. Schweigert A, Fischer C, Mayr D, von Schweinitz D, Kappler R, Hubertus J. Activation of the Wnt/beta-catenin pathway is common in wilms tumor, but rarely through beta-catenin mutation and APC promoter methylation. *Pediatr Surg Int.* 2016;32(12):1141-6.
48. Duan Q, Wang X, Gong W, Ni L, Chen C, He X, et al. ER stress negatively modulates the expression of the miR-199a/214 cluster to regulates tumor survival and progression in human hepatocellular cancer. *PLoS One.* 2012;7(2):e31518.
49. Lee KY, Jeon YJ, Kim HG, Ryu J, Lim DY, Jung SK, et al. The CUG-translated WT1, not AUG-WT1, is an oncogene. *Carcinogenesis.* 2017.
50. Gadd S, Huff V, Walz AL, Ooms A, Armstrong AE, Gerhard DS, et al. A Children's Oncology Group and TARGET initiative exploring the genetic landscape of Wilms tumor. *Nat Genet.* 2017;49(10):1487-94.
51. Gonzalez-Duarte RJ, Cazares-Ordenez V, Avila-Chavez E. The microRNA biogenesis machinery: regulation by steroid hormones and alterations in cancer. *Rev Invest Clin.* 2014;66(5):460-4.

52. Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, et al. MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;428(4):525-31.
53. Bhatt K, Mi QS, Dong Z. microRNAs in kidneys: biogenesis, regulation, and pathophysiological roles. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2011;300(3):F602-10.