



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**VALIDACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RNAS
LARGOS NO CODIFICANTES SOX2-OT Y BCYRN1
EN ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

VIVIANA MERLIES CASTRO ROMERO



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO**

Ciudad Universitaria, CD. MX., 2020



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.

DATOS DEL JURADO

1. Datos del alumno

Castro
Romero
Viviana Merlies
54 46 03 60
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
312232528

2. Datos del tutor

Dra.
Ruth
Ruiz Esparza
Garrido

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Silvia
Jiménez
Morales

4. Datos del sinodal 2

Dra.
María Sandra
Cabrera
Benítez

5. Datos del sinodal 3

Dr.
Miguel Ángel
Velázquez
Flores

6. Datos del sinodal 4

M. en C.
Enrique
Hernández
Hernández

7. Datos del trabajo escrito

Validación de la expresión de los RNAs largos no codificantes SOX2-OT y BCYRN1 en
Astrocitomas Pediátricos
88p
2020

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesora la Dra. Ruth Ruiz Esparza Garrido por todo el apoyo que me proporcionó durante este proceso, por darme la oportunidad de desarrollar mis habilidades para realizar este trabajo y por la confianza depositada en mi, por siempre ser amable, paciente y accesible al resolver mis dudas y también por las llamadas de atención que fueron sumamente necesarias para terminar exitosamente este proyecto. Al Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores por ayudarme durante la primera parte de este trabajo, ya que sin sus enseñanzas y apoyo esto no hubiera sido posible. Muchas gracias por haberme aceptado en el laboratorio y por todas las buenas experiencias que tuve junto a ustedes y mis compañeros, espero seguir formando más.

A la Dra. María Sandra Cabrera Benítez y la Dra. Silvia Jiménez Morales por ser mis sinodales, por tomarse el tiempo de revisar mi trabajo y por sus comentarios que fueron muy importantes para mejorarlo.

Al M. en C. Enrique Hernández Hernández, por ser mi profesor en la preparatoria y en la carrera. Sus enseñanzas fueron muy importantes al tomar la decisión de dedicarme a la investigación. También quiero agradecer que se tomara el tiempo de revisar mi trabajo y por darme sus valiosos comentarios.

A la Dra. Verónica Ponce y la M. en C. Adriana Hernández por todo el apoyo que me brindaron durante el tiempo que estuve en el taller y durante este proyecto, por enseñarme las cosas esenciales que debía saber y hacer en un laboratorio y por todos sus comentarios constructivos para mejorar como estudiante e investigadora.

A Andrea Cervantes y Elizabeth Morales, por brindarme su amistad dentro y fuera del laboratorio, por siempre ser amables y estar dispuestas a enseñarme o explicarme cosas que no entendía. También les agradezco todo el apoyo y motivación que me brindaron cada día que pasamos juntas. Ustedes hicieron mi estadía en el laboratorio mucho más amena y bonita.

A Ofelia Loyola, por ser mi mejor amiga en el taller y en nuestro último semestre, por escucharme y motivarme, por su compañerismo y por formar parte del mejor equipo de laboratorio que pude tener durante la carrera.

A mis mejores amigas Ximena Laureano, Fernanda Bravo y Karen Robles por todos esos años de amistad y todas las experiencias que he vivido con ustedes. Por las risas, por escucharme y apoyarme, por motivarme cuando sentía que ya no podía, por siempre creer en mí y por compartir conmigo parte de su vida. Espero contar con ustedes por mucho tiempo más. Las quiero mucho y las aprecio infinitamente.

Finalmente, agradezco a todas esas personas que me han apoyado y aconsejado a lo largo de mis 24 años de vida, en definitiva contribuyeron a formar a la persona que soy ahora.

DEDICATORIA

A mis padres

Ma. de Jesús Romero Real y Noé Rigoberto Castro Trujillo

A mi hermana

Lizzet Daniela Castro Romero

Sin su apoyo y motivación, este trabajo nunca hubiera sido posible

Gracias por todo

*“And never forget the progress you have made or the mountains you have climbed.
Never forget that beautiful new things will come together in their time”*

Morgan Harper Nichols

Índice

Abreviaturas.....	IX
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XIII
Resumen.....	XIV
Abstract.....	XV
I. Introducción.....	1
1.1 Astrocitos.....	1
1.2 Astrocitoma pediátrico.....	5
1.2.1 <i>Clasificación de 2007 de la OMS para los astrocitomas</i>	6
a) Astrocitomas de bajo grado	6
i) <i>OMS Grado I - Astrocitoma pilocítico</i>	6
ii) <i>OMS Grado II - Astrocitoma difuso</i>	8
b) Astrocitomas de alto grado	10
i) <i>OMS Grado III - Astrocitoma anaplásico</i>	11
ii) <i>OMS Grado IV - Glioblastoma multiforme</i>	13
1.2.2 <i>Nueva clasificación de los astrocitomas</i>	16
1.3 RNAs largos no codificantes.....	19
1.3.1 <i>Categorización por localización genómica</i>	20
1.3.2 <i>Posibles estructuras</i>	21
1.3.3 <i>Funciones descritas</i>	23
1.4 LncRNAs en cáncer.....	25
1.5 SOX2-OT.....	28
1.6 BCYRN1	29
II. Antecedentes directos	30
III. Justificación y planteamiento del problema.....	32
IV. Hipótesis.....	32
V. Objetivos	32
VI. Materiales y Métodos	33
6.1 Obtención de muestras de Astrocitomas y tejidos control	33
6.2 Extracción de RNA total a partir de tejido por medio de Trizol	34
6.3 Cuantificación de RNA total.....	34
6.4 Realización de electroforesis de RNA en gel de agarosa.....	35
6.5 Síntesis de cDNA a partir de RNA total.....	35
6.6 Diseño de Primers	36

6.7 Realización de qRT-PCR utilizando el cDNA obtenido para amplificar los diferentes lncRNAs a estudiar (SOX2-OT y BCYRN1), el gen SOX2 y el gen constitutivo B-Actina	37
6.8 Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por qRT-PCR.....	38
6.9 Cálculo de la doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para conocer las diferencias en los patrones de expresión de los lncRNAs en tumores gliales y en tejidos control.....	38
VII. Resultados	39
7.1 Cuantificación de RNA total	40
7.2 Electroforesis de RNA en gel de agarosa.....	40
7.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA total	42
7.4 Estandarización de las condiciones de amplificación por qRT-PCR	43
7.5 Gráficas de amplificación de SOX2-OT.....	44
7.6 Gráficas de amplificación de SOX2.....	47
7.7 Gráficas de amplificación de BCYRN1	49
7.8 Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por qRT-PCR.....	51
7.9 Análisis de la expresión relativa de SOX2-OT, SOX2 y BCYRN1.....	53
7.10 Análisis de la expresión relativa de SOX2-OT, SOX2 y BCYRN1 por localización tumoral	56
VIII. Discusión.....	58
IX. Conclusión	62
X. Perspectivas.....	63
XI. Referencias.....	64
XII. Anexos.....	69

Abreviaturas

Ach	Acetilcolina
ANF	Factor natriurético atrial
ANRIL	RNA no codificante antisentido en el locus INK4
ARF	Marco de lectura alternativo, locus supresor de tumores p14
Ast	Astrocitoma
AstA	Astrocitoma anaplásico
AstD	Astrocitoma difuso
AstP	Astrocitoma pilocítico
ATRX	Helicasa dependiente de ATP
BCYRN1	Brain cytoplasmic RNA 1
BMI1	Proteína BMI del grupo Polycomb
BRAF V600E	Mutación cambio específica V (valina) por E (glutamato) del protooncogén B-Raf en la posición 600
BRAFP1	BRAF pseudogén 1
BRCA1	Gen supresor de tumores, cáncer de mama 1
Ca²⁺	Calcio
CALM2	Calmodulina 2
Cap	Caperuza 5' (caperuza 7-metilguanilato)
cDNA	DNA complementario
ceRNA	RNA endógeno competitivo
circRNAs	RNAs circulares
c-Myc	Protooncogén de mielocitomatosis celular
COX-2	Ciclooxigenasa-2
Ct	Ciclo umbral
DDSR1	LncRNA RNA1 sensible al daño de DNA
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNse I	Desoxirribonucleasa 1
DSB	Roturas de DNA bicatenario
elncRNAs	RNAs asociados al enhancer
EMT	Transición epitelio – mesenquimal
EPCAM	Molécula de adhesión celular epitelial
ER	Receptor de estrógenos
eRNAs	RNAs enhancer o potenciadores
F2R	Receptor de trombina del factor de coagulación II
FAL1	lncRNA amplificado focalmente en el cromosoma 1
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GBM	Glioblastoma multiforme
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
Glu	Glutamato
H3 K27M	Mutación cambio específica de K (lisina) por M (metionina) de la Histona 3 en la posición 27
H3.1/3.2 H27M	Mutación cambio específica de H (histidina) por M (metionina) del gen H3.1/3.2 en la posición 27
H3.3 G34R/V	Mutación cambio específica de G (glicina) por R (arginina) / V (valina) del gen H3.3 en la posición 34

H3K4	Histona 3 con trimetilación en la lisina 4
HepG2	Línea celular de carcinoma hepatocelular
HM	Altamente mutado
hnRNP-K A1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea A1
hnRNPUL1	Ribonucleoproteína nuclear heterogénea U Like 1
HOTAIR	lncRNA antisentido de la transcripción de HOX
Hox	Gen homeobox
IDH1	Isocitrato deshidrogenasa 1
IDH1 R132H	Isocitrato deshidrogenasa 1, mutación cambio específica de R (arginina) por H (histidina) en la posición 132
IDH2	Isocitrato deshidrogenasa 2
IL-1B	Interleucina 1 beta
INK4	Familia de cinasas dependientes de ciclinas
INK4B-ARF-INK4A	Locus supresor de tumores, por cinasas dependientes de ciclinas y marcos de lectura alternativos
IP3	Inositol 1,4,5-trifosfato
IRG	Gen regulado por interferón
kb	Kilobases
LGG	Glioma de bajo grado
linc-p21	lncRNA intergénico, p21
lincRNAs	lncRNA intergénicos
LncRNA	RNA largo no codificante
LncRNA ATB	RNA largo activado por el TGF- Beta
LncRNA COX2	LncRNA de COX2
LncRNA MIF	LncRNA factor inhibidor de c-Myc
MALAT1	Transcrito 1 de adenocarcinoma de pulmón asociado a metástasis
MCF7	Línea celular Michigan Cancer Foundation-7 de adenocarcinoma mamario
MEG3 (Gtl2)	Gen expresado maternalmente 3
MIR31HG	lncRNA gen huésped del microRNA 31
miRNAs	MicroRNAs
MMP1	Metaloproteinasa de matriz 1
MMP3	Metaloproteinasa de matriz 3
MMP9	Metaloproteinasa de matriz 9
MMP13	Metaloproteinasa de matriz 13
mRNA	RNA mensajero
µL	Microlitro
ncRuPAR	RNA no codificante de proteínas, río arriba de F2R/PAR1
NE	Noradrenalina
NF1	Neurofibromatosis tipo 1
NO	Óxido nítrico
NOS	No especificado
NSCLC	Cáncer pulmonar de células no pequeñas
NT2	Línea celular NTERA-2 de carcinoma embrionario, pluripotencial
OIS	Oncogenes inductores de senescencia
OMS	Organización Mundial de la Salud

ORFs	Marcos de lectura abiertos
p15	Inhibidor B de la quinasa 4 dependiente de ciclina
p21	Inhibidor de cinasa dependiente de ciclina 1
pancRNAs	lncRNAs divergentes
PAR1	Prader-Willi/Angelman región 1
pb	Pares de bases
PCAT1	Transcrito 1 asociado al cáncer de próstata
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
plncRNAs	lncRNAs asociados a promotores
POLE	DNA polimerasa épsilon, subunidad catalítica
Poli-A	Poliadenilación 3'
PRC2	Complejo Represivo Polycomb 2
qRT-PCR	PCR cuantitativa por transcriptasa reversa
RAP80	Proteína 80 asociada al receptor
RNA	Ácido ribonucleico
RNA pol II	RNA polimerasa II
RNA pol III	RNA polimerasa III
RNAsas	Ribonucleasas
SNC	Sistema nervioso central
SOCS2	Supresor de señalización de citocinas 2
SOCS2-AS1	RNA 1 antisentido de SOCS2
SOX2	Sex determining Region Y-box 2
SOX2-OT	SOX2 overlapping transcript
SPRY4-IT1	lncRNA de la proteína homóloga sprouty 4 (intergénico)
SRA	Activador de RNA del receptor de esteroides
TBE	Buffer Tris-Burato-EDTA
TCGA	Atlas del Genoma del Cáncer
TERC	Componente de RNA de la polimerasa
TGF-β	Factor de crecimiento transformante beta
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFSF10	Miembro 10 de la superfamilia del ligando del factor de necrosis tumoral
TP53 (p53)	Proteína tumoral p53
tRNA	RNA de transferencia
U-87MG	Línea celular Uppsala 87 Malignant Glioma de glioblastoma multiforme
UCA1	Cáncer urotelial asociado 1
VEGF	El factor de crecimiento endotelial vascular
XAP	Xantastrocitoma pleomórfico
Xist	Transcrito específico de X-inactivo
ZEB1	Dedos de zinc, con unión a caja-E, Homeobox 1
ZEB2	Dedos de zinc, con unión a caja-E, Homeobox 2

Lista de figuras

Figura 1	Estructura del sistema nervioso central	1
Figura 2	Microambiente del sistema nervioso central	2
Figura 3	Estructura de los astrocitos	3
Figura 4	Anatomía interna del encéfalo	5
Figura 5	Astrocitoma pilocítico: cortes histológicos y resonancias magnéticas	8
Figura 6	Astrocitoma difuso: cortes histológicos y resonancias magnéticas	10
Figura 7	Astrocitoma anaplásico: cortes histológicos y resonancias magnéticas	12
Figura 8	Glioblastoma multiforme: cortes histológicos y resonancias magnéticas	14
Figura 9	Clasificación de los astrocitomas pediátricos de alto grado según Mackay <i>et al</i> (2017)	18
Figura 10	Clasificación de los lncRNAs	21
Figura 11	Estructura secundaria del lncRNA SOX2-OT:1	22
Figura 12	Funciones de los lncRNAs	24
Figura 13	Funciones de los lncRNAs en cáncer	27
Figura 14	Mapa del cromosoma 3	28
Figura 15	Mapa de superposición de SOX2-OT	28
Figura 16	Mapa del cromosoma 2	29
Figura 17	Mapa de la secuencia de BCYRN1	29
Figura 18	Mapas de calor de los lncRNAs BCYRN1 y SOX2-OT	31
Figura 19	Secuencia de SOX2-OT y sus sitios de unión a los primers	36
Figura 20	Secuencia de BCYRN1 y sus sitios de unión a los primers	37
Figura 21	Electroforesis de RNA total en gel de agarosa al 1.5%	41
Figura 22	Gráficas de amplificación de SOX2-OT	45
Figura 23	Gráficas de la curva melt o curva de disociación de SOX2-OT	46
Figura 24	Gráficas de amplificación de SOX2	47
Figura 25	Gráficas de la curva melt o curva de disociación de SOX2	48
Figura 26	Gráficas de amplificación de BCYRN1	49
Figura 27	Gráficas de la curva melt o curva de disociación de BCYRN1	50
Figura 28	Electroforesis de los productos de SOX2-OT en gel de agarosa al 2%	51
Figura 29	Electroforesis de los productos de SOX2 en gel de agarosa al 2%	52
Figura 30	Electroforesis de los productos de BCYRN1 en gel de agarosa al 2%	52
Figura 31	Gráfica de la expresión relativa del lncRNA SOX2-OT en astrocitomas vs controles	53
Figura 32	Gráfica de la expresión relativa del mRNA SOX2 en astrocitomas vs controles	54
Figura 33	Gráfica de la expresión relativa del lncRNA BCYRN1 en astrocitomas vs controles	55
Figura 34	Gráfica de comparación de la expresión relativa del lncRNA SOX2-OT por localización tumoral	56
Figura 35	Gráfica de comparación de la expresión relativa del mRNA SOX2 por localización tumoral	57
Figura 36	Gráfica de comparación de la expresión relativa del lncRNA BCYRN1 por localización tumoral	57

Lista de tablas

Tabla 1	Características y localización de los astrocitomas en el sistema nervioso central (OMS 2007)	15
Tabla 2	Clasificación OMS 2016 de los gliomas del sistema nervioso central	17
Tabla 3	Muestras de tejido control	33
Tabla 4	Características de las muestras analizadas (astrocitoma pediátrico)	33
Tabla 5	Secuencias de los primers utilizados	36
Tabla 6	Temperatura de alineamiento de los primers utilizados	37
Tabla 7	Cuantificación del RNA total obtenido	40
Tabla 8	Cuantificación del cDNA obtenido	42
Tabla 9	Resultados de la qRT-PCR con SOX2-OT en tejidos control y muestras tumorales, promedios por experimento e histología	43
Tabla 10	Resultados de la qRT-PCR con B-Actina en tejidos control, promedios por experimento e histología	43
Tabla 11	Resultados de la qRT-PCR con SOX2 en tejidos control y muestras tumorales, promedios por experimento e histología	43
Tabla 12	Resultados de la qRT-PCR con BCYRN1 en tejidos control y muestras tumorales, promedios por experimento e histología	44

Resumen

Los astrocitomas son un tipo de neoplasias del sistema nervioso central que difieren en su localización y morfología. Son considerados como tumores sólidos heterogéneos y se presentan frecuentemente en niños menores de 16 años. La Organización Mundial de la Salud, los clasifica en 4 grados histológicos bien definidos: grado I o pilocítico, grado II o difuso, grado III o anaplásico y grado IV o glioblastoma multiforme. A pesar de existir distintos fármacos para mejorar la supervivencia de los pacientes, ésta no ha mejorado. Recientemente, se han realizado estudios que demuestran la participación de los RNAs no codificantes en estas neoplasias. Según diversos estudios, los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) que se encuentran alterados en diferentes tipos de cáncer podrían ser planteados como biomarcadores para estos tumores. El objetivo de este trabajo fue validar la expresión de los lncRNAs *SOX2 overlapping transcript* (SOX2-OT) y *Brain cytoplasmic RNA 1* (BCYRN1) en astrocitomas pediátricos de diferentes grados histológicos. Los patrones de expresión se determinaron por medio de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) (3 controles y 14 muestras tumorales) y analizados por el método de Livak y Schmittgen de la doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Posteriormente se realizó un análisis de T de Student para comparar cada una de las muestras con el control según correspondiera. Se encontró que la expresión de *SOX2-OT* es heterogénea en cada una de las muestras y los grados histológicos en general, el análisis estadístico T de Student mostró cambios significativos entre el Control y cinco de las muestras (AstP II, AstD VI, AstA I, GBM I y II). En el caso de *BCYRN1*, el análisis estadístico T de Student mostró cambios significativos entre el Control y siete de las muestras (AstP I y II, AstD I, IV y VI, AstA II y GBM III). Los resultados sugieren que *BCYRN1* puede funcionar como un biomarcador de progresión de grado histológico, ya que en las muestras analizadas se observa que la expresión decrece cuando aumenta la malignidad del tumor. En el caso de *SOX2-OT*, los datos sugieren que puede funcionar como un biomarcador de glioblastoma multiforme ya que se encuentra subexpresado en este tipo tumoral, además se cumplió la tendencia de expresión de estos dos lncRNAs previamente observada en el estudio que funcionó como antecedente.

Palabras clave: Astrocitoma pediátrico, lncRNAs, SOX2-OT, BCYRN1.

Abstract

Astrocytomas are a type of central nervous system neoplasm that differ in location and morphology. They are considered heterogeneous solid tumors and occur frequently in children under 16 years of age. The World Health Organization classifies them into 4 well-defined histological grades: grade I or pilocytic, grade II or diffuse, grade III or anaplastic, and grade IV or multiform glioblastoma. Despite the existence of different drugs to improve patient survival, it has not improved. Recently, several studies have demonstrated the participation of non-coding RNAs in these neoplasms. According to various studies, the long non-coding RNAs (lncRNAs) found altered in different types of cancer could be considered as biomarkers for these tumors. The objective of this work was to validate the expression of lncRNAs *SOX2 overlapping transcript (SOX2-OT)* and *Brain cytoplasmic RNA 1 (BCYRN1)* in pediatric astrocytomas of different histological grades. Expression patterns were determined by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) (3 controls and 14 tumor samples) and analyzed by the Livak and Schmittgen method of comparative expression double delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). Subsequently, a Student's T analysis was performed to compare each of the samples with the control as appropriate. It was found that the expression of *SOX2-OT* is heterogeneous in each one of the samples and the histological grades in general, the statistical analysis of Student's T showed significant changes between the Control and five of the samples (AstP II, AstD VI, AstA I, GBM I and II). In the case of *BCYRN1*, Student's T statistical analysis showed significant changes between the Control and seven of the samples (AstP I and II, AstD I, IV and VI, AstA II and GBM III). The results suggest that *BCYRN1* can function as a histological grade progression biomarker, since in the analyzed samples it is observed that the expression decreases when the tumor malignancy increases. In the case of *SOX2-OT*, the data suggest that it can function as a biomarker for multiform glioblastoma since it is under-expressed in this tumor type, and the expression trend of these two lncRNAs previously observed in the study that functioned as a background was fulfilled.

Keywords: Pediatric astrocytoma, lncRNAs, SOX2-OT, BCYRN1.

I. Introducción

1.1 Astrocitos

El sistema nervioso central (SNC) se encarga de recibir estímulos externos, procesar la información y transmitir órdenes de respuesta que serán ejecutadas por los músculos y nervios, está formado por el encéfalo y la médula espinal que se encuentran protegidos por las membranas meninges (duramadre, aracnoides y piamadre) y los huesos del cráneo y la columna vertebral (1) (Figura 1).

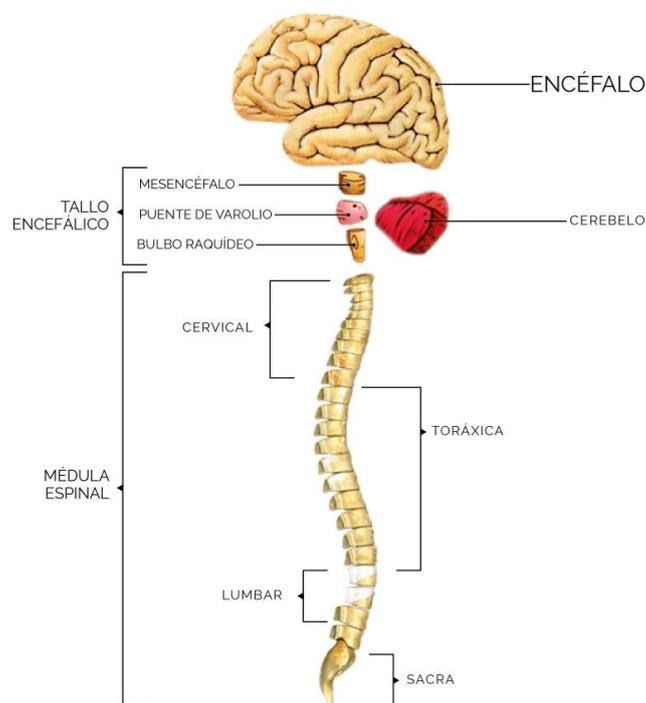


Figura 1. Estructura del sistema nervioso central. Se observa el encéfalo, el tallo y la médula espinal con sus partes principales [Tomado de (2)]

Microscópicamente, el SNC se encuentra dividido en dos áreas: la materia gris donde se encuentra el soma de las neuronas y la materia blanca donde se encuentran los axones de las mismas (3). Además de las neuronas, el SNC está conformado por distintas células que en conjunto forman la neuroglia: los astrocitos, los oligodendrocitos, las células ependimales y la microglia, de las cuales los astrocitos son los más abundantes con aproximadamente el 70% (3,4) (Figura 2).

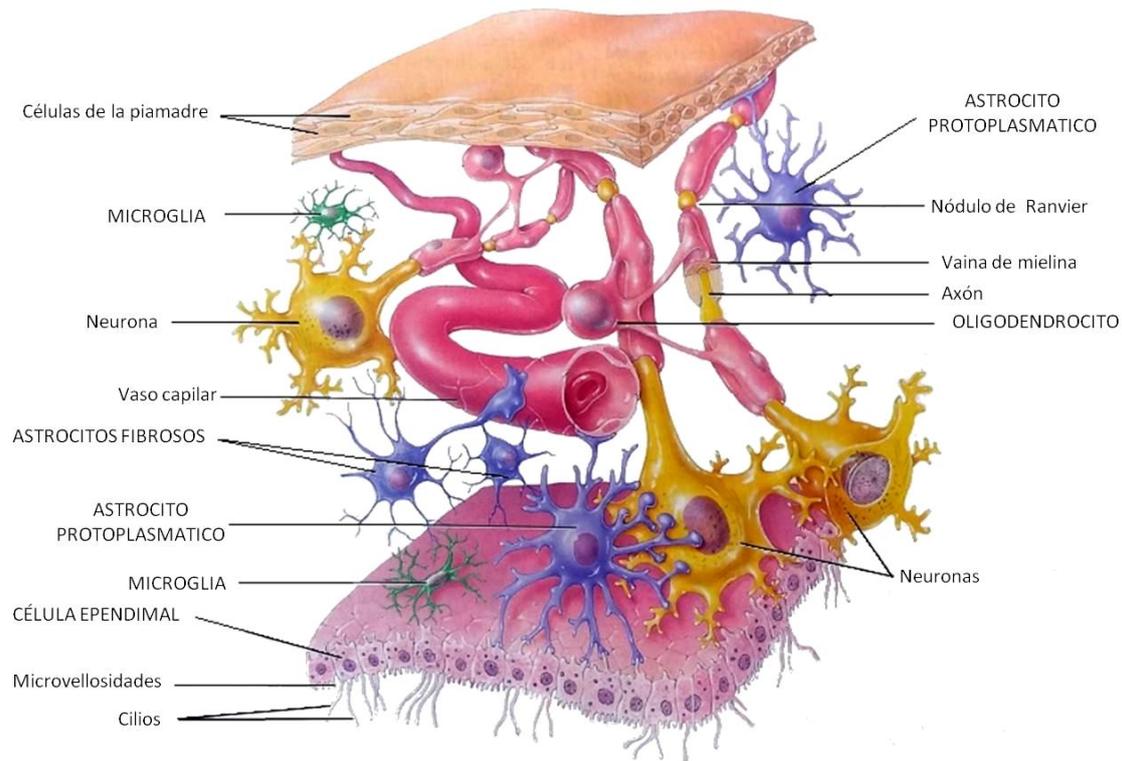


Figura 2. Microambiente del sistema nervioso central. Se observan las neuronas y su interacción con las células gliales [Tomado y modificado de (1)]

Los astrocitos son las células gliales que se encargan de conectar al encéfalo y la médula espinal al formar una matriz que le da soporte y movimiento a las neuronas. Forman la macroglía o astrogliá, donde se pueden encontrar los astrocitos protoplasmáticos en la sustancia gris y los astrocitos fibrosos en la sustancia blanca (5). Los astrocitos presentan forma estrellada debido a sus numerosas prolongaciones, sus extremos reciben el nombre de pies terminales o podocitos cuando rodean a los vasos capilares, formando una membrana glial continúa alrededor de ellos que recibe el nombre de membrana limitante perivascular. Ambos tipos de astrocitos presentan microtúbulos y filamentos intermedios formados por la proteína ácida fibrilar glial (GFAP), lisosomas, granulaciones de glucógeno en su citoplasma y un núcleo ovalado, grande y claramente visible en comparación con el de otras células gliales como los oligodendrocitos y la microglia (6).

Los astrocitos protoplasmáticos son las células más abundantes en la sustancia gris, presentan numerosas prolongaciones muy ramificadas y finas que se extienden en todas las direcciones (6). Las prolongaciones de estos astrocitos envuelven al soma y las dendritas de las neuronas, regulando el intercambio metabólico y el ambiente intercelular del SNC (Figura 3A, B y C) (3).

Los astrocitos fibrosos se encuentran en la sustancia blanca, sus prolongaciones se encuentran poco ramificadas y se pueden observar en el microscopio óptico como fibras finas, debido a que los filamentos de GFAP son más prominentes en estas células (3). En la cara interna de la piamadre, los astrocitos fibrosos forman una membrana glial limitante externa (*glia limitans*) que es relativamente impermeable y está compuesta por las uniones de los pies terminales (Figura 3D, E y F) (6).

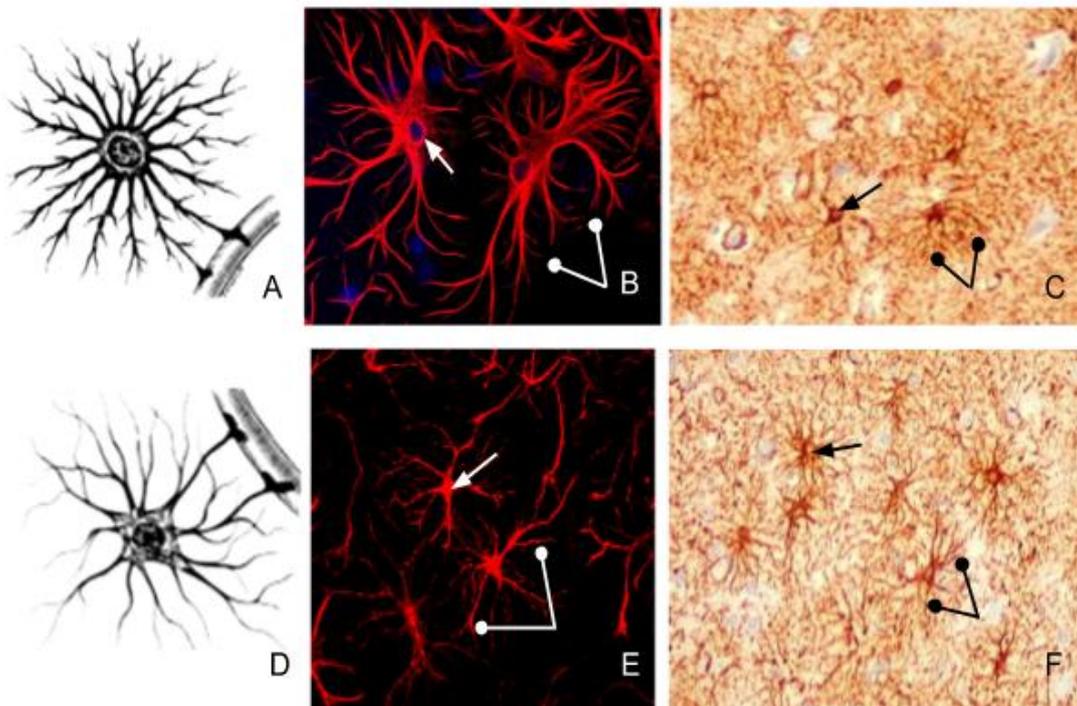


Figura 3. Estructura de los astrocitos. **A)** Esquema de astrocito protoplasmático (7). **B)** Astrocitos protoplasmáticos observados con tinción anti-gfap (rojo) y los núcleos teñidos con DAPI (azul) por inmunohistoquímica y microscopía confocal (8). **C)** Astrocitos protoplasmáticos observados con tinción anti-gfap (café oscuro) por inmunohistoquímica, visto en microscopía de campo claro a 40X (9). **D)** Esquema de astrocito fibroso (7). **E)** Astrocitos fibrosos observados con tinción anti-gfap (rojo) por inmunohistoquímica y microscopía confocal (10). **F)** Astrocitos fibrosos observados con tinción anti-gfap (café oscuro) por inmunohistoquímica, visto en microscopía de campo claro a 40X (9). Las flechas indican a los núcleos mientras que las prolongaciones con indicadas con puntos.

Actualmente, debido a una gran cantidad de estudios se sabe que los astrocitos se encargan de transportar nutrientes y metabolitos a las neuronas, regulan la concentración intracelular de iones y el pH manteniendo el microambiente del SNC (11), que actúan regulando la función de las uniones de los capilares que forman la barrera hematoencefálica (5), pueden responder a distintos neurotransmisores como glutamato (Glu), ácido γ -aminobutírico (GABA), acetilcolina (ACh), noradrenalina (NE) y óxido nítrico (NO), producir algunos gliotransmisores como ATP, ácido 2-aminopentanodioico o ácido glutámico, ácido homocisteíco o histamina, factor natriurético atrial (ANF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF – α) y taurina, inducidos por señalización de calcio (Ca²⁺) y por inositol 1,4,5-trisfosfato (IP3) (4). Además, los astrocitos también están involucrados en la cicatrización del sistema nervioso al rellenar los defectos tisulares producidos por distintos procesos patológicos, dando como resultado un tejido cicatricial más consistente que el tejido nervioso (formado por fibras de GFAP y α , β -cristalina), proceso conocido como esclerosis (12,13).

El daño o alteraciones a estas células están asociadas con distintas enfermedades neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson y Huntington (14) y cáncer, principalmente los tumores del sistema nervioso central llamados astrocitomas.

1.2 Astrocitoma pediátrico

Los astrocitomas (Ast) son un tipo de neoplasias presentes en el SNC, que difieren en su localización y morfología (Figura 4) (15,16). Son los tumores sólidos heterogéneos más frecuentes en niños menores de 16 años y se denominan tumores cerebrales primarios debido a que surgen del tejido cerebral normal (17,18). En nuestro país, los tumores del SNC ocupan el tercer lugar en frecuencia de todas las neoplasias en edad pediátrica, por debajo de las leucemias y los linfomas (16,18). Estos tumores pueden estar asociados con trastornos genéticos como el síndrome de Li-Fraumeni, el síndrome de Turcot, el síndrome de Ollier (encondromatosis múltiple), esclerosis tuberosa y neurofibromatosis tipo 1 (NF1) (19)

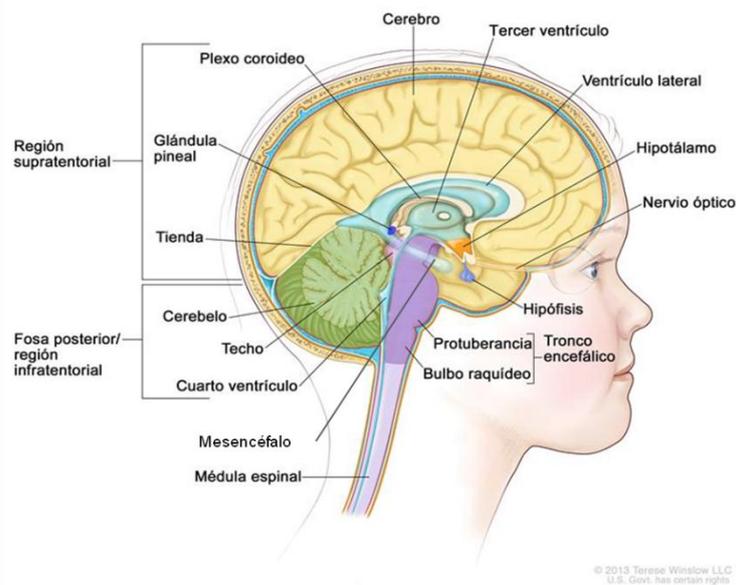


Figura 4. Anatomía interna del encéfalo. Se observan las dos regiones que dividen al encéfalo: supratentorial e infratentorial con sus respectivas partes, donde se puede presentar un astrocitoma [Tomada y modificada de (20)].

A partir de 2007 la Organización Mundial de la Salud (OMS) clasificó a los Ast en cuatro grados histológicos bien definidos: grado I o pilocítico (AstP), grado II o difuso (AstD), grado III o anaplásico (AstA) y grado IV o glioblastoma multiforme (GBM), de los cuales, los Ast de bajo grado (I y II) son los más frecuentes y presentan un mejor pronóstico (21). En el 2016 la OMS publicó una nueva clasificación de los tumores

cerebrales, basándose en sus características histopatológicas y genéticas para lograr un diagnóstico integrado más preciso. Actualmente están divididos en los mismos cuatro subgrupos de la clasificación de 2007 y la nomenclatura cambió: se debe escribir el tipo de tumor (histológicamente) seguido por sus características moleculares (22,23). Sin embargo es importante destacar que esta nueva clasificación está basada en los astrocitomas de adulto, integrando ciertos tipos histológicos de tumores pediátricos en algunos de los subgrupos mencionados. Ambas clasificaciones se mencionarán a continuación.

1.2.1 Clasificación de 2007 de la OMS para los astrocitomas

a) Astrocitomas de bajo grado

Son los tumores heterogéneos más comunes, presentándose en las primeras dos décadas de vida y constituyendo cerca del 50% de tumores del SNC en niños. En general no sufren transformación maligna y rara vez tienen regresión espontánea si fueron extraídos por medio de cirugía o resecaos completamente. Pueden afectar de manera negativa la calidad de vida, ya que los pacientes pueden presentar alteraciones adaptativas y cognitivas muy severas. Los Ast de bajo grado más frecuentes son el astrocitoma pilocítico (AstP; Grado I) y el astrocitoma difuso fibrilar (AstD; Grado II) (15,18).

i) OMS Grado I - Astrocitoma pilocítico

El astrocitoma pilocítico (AstP) es la neoplasia cerebral más frecuente en la edad pediátrica, constituyendo el 85% de los Ast cerebrales. Se pueden localizar en cualquier lugar del cerebro y la médula espinal, son más frecuentes en el cerebelo, mientras que los AstP de quiasma óptico y la vía óptica son frecuentes en pacientes con NF1 (21). Son tumores con gran vascularización, poca infiltración y tienen forma definida, presentan principalmente una forma quística que desplaza a los tejidos

adyacentes (Figura 5D). En el caso de los tumores del nervio óptico, se produce una forma fusiforme debido al alargamiento de esta estructura (Figura 5E). En general, el AstP tiene un crecimiento lento, exceptuando aquellos del nervio óptico y el quiasma, que pueden presentar crecimiento más acelerado. Tienen baja celularidad y actividad mitótica, por lo que rara vez metastatizan. Histológicamente, los AstP presentan un patrón bifásico, formado principalmente por tejido glial, vacuolas, microquistes, macroquistes ocasionales (Figura 5C) y tejido piloide compactado, formado por densas capas de células bipolares alargadas que presentan finos procesos fibrilares (tipo pelo) y gran abundancia de fibras de Rosenthal (Figuras 5A y 5B). El tejido glial está formado principalmente por astrocitos protoplasmáticos y se entremezclan con productos degenerativos conocidos como cuerpos granulares eosinófilos, que se relacionan con el lento crecimiento, bajo grado histológico y pronóstico favorable (24). Es poco común que estos tumores presenten calcificación, ocurriendo usualmente en los tumores de nervio óptico y tálamo – hipotálamo (24,25).

La sintomatología y el tratamiento del AstP dependen del lugar de origen del mismo. Los síntomas más comunes son el dolor de cabeza, náuseas, vómitos, trastornos de la marcha, visión borrosa y dolor de cuello. En el caso del AstP del cerebelo y de los lóbulos, la resección quirúrgica es el tratamiento de elección y es considerada como curativa cuando se realiza una resección total (24). Para las ubicaciones menos favorables como los ganglios basales, se puede utilizar la resección estereotáctica. La radioterapia se evita estrictamente dado su riesgo de causar una significativa morbilidad en niños menores de 5 años de edad, por lo que se recomienda la quimioterapia para evitar trastornos en el desarrollo del cerebro y sistema nervioso. La resección se recomienda en Ast de la vía óptica y la terapia por radiación en Ast del quiasma óptico, siempre que presenten síntomas progresivos o evidencias de hidrocefalia. En general, el pronóstico para los pacientes con un AstP es excelente, con una tasa de supervivencia a 10 años de hasta el 94% y una tasa de supervivencia a 20 años del 79% (24).

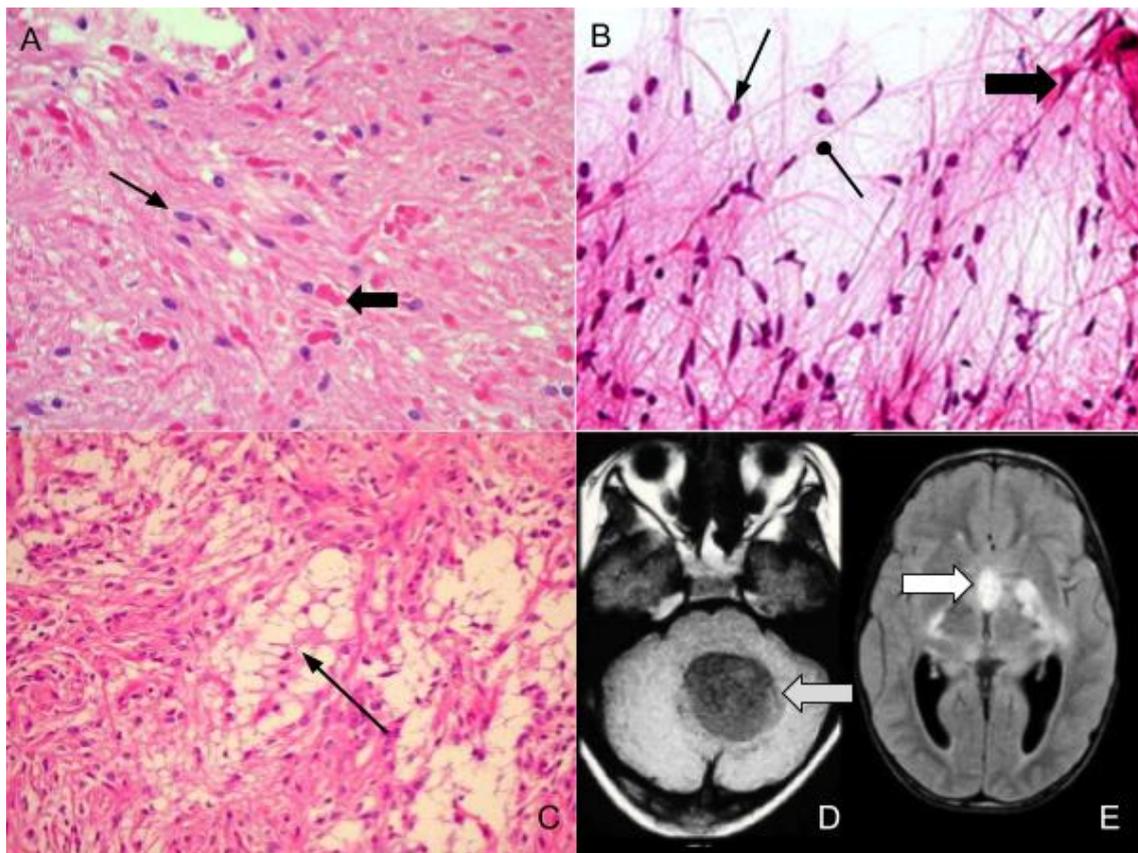


Figura 5. Astrocitoma pilocítico: cortes histológicos y resonancias magnéticas. **A)** Patrón celular característico del AstP con tinción de Hematoxilina-Eosina (HE) en microscopía de campo claro a 40x. Se observan núcleos astrocíticos en morado (flecha delgada) y fibras de Rosenthal en rosa oscuro (flecha ancha). **B)** Células de AstP con tinción de HE en microscopía de campo claro a 100x. Se observan núcleos astrocíticos en morado (flecha delgada), células binucleadas con aspecto de pelo (punta circular) y fibras de Rosenthal en rosa oscuro (flecha ancha). **C)** Forma microquística dentro del tumor, observado con tinción de HE en microscopía de campo claro a 40x (flecha delgada). **D)** Resonancia magnética de un AstP en plano axial, presente en el cerebelo con forma quística (flecha gris). **E)** Resonancia magnética de un AstP en plano axial, presente en el quiasma óptico (flecha blanca). [Tomadas y modificadas: **A, B y C** de de (26), **D y E** de (27)]

ii) OMS Grado II - Astrocitoma difuso

El astrocitoma difuso (AstD) es la neoplasia cerebral que afecta a niños y adultos jóvenes, siendo más frecuente entre los 20 - 45 años de vida. Constituyen el 15% de los Ast y tienen tendencia a la progresión maligna hacia astrocitoma anaplásico (AstA) y glioblastoma multiforme (GBM) (28). Se presentan en cualquier nivel del neuroeje, aunque rara vez aparecen en el cerebelo. Son más frecuentes en el tallo cerebral de niños y en los hemisferios cerebrales de adultos (29). Son tumores con gran diferenciación celular, infiltrantes, mal delimitados y en general tienen lento crecimiento, presentándose como masas sólidas localizadas en la sustancia gris y en

la blanca, que pueden presentar cambios quísticos en forma de espongirosis o en verdaderos espacios quísticos que provocan agrandamiento y distorsión de las estructuras anatómicas invadidas (Figuras 6C y 6D) (30). Tienen celularidad moderada y la actividad mitótica es nula o mínima. Histológicamente están compuestos por astrocitos fibrilares o células gemistocíticas y microquistes. Los astrocitos presentan atipia discreta, núcleos vesiculosos agrandados, cromatina en masas y nucléolo prominente (Figura 6A y 6B). Se ha relacionado a la angiogénesis con la progresión tumoral de estas neoplasias. Existen tres variantes del AstD: fibrilar, protoplasmático y gemistocítico, que se clasifican de acuerdo al tipo de astrocito que predomine en el tumor (25).

La sintomatología general del AstD son las crisis epilépticas, cefaleas, cambios de conducta, depresión y fallos de visión; el déficit neurológico focal, la hipertensión endocraneal o la hemorragia intratumoral son menos comunes (28,31). El tratamiento varía dependiendo de la sintomatología, en el caso de los pacientes con hipertensión endocraneal se realiza una resección quirúrgica; para el resto de los síntomas existen diferentes terapias, por ejemplo, cuando hay signos de progresión se realiza una biopsia para conocer con mayor exactitud el grado histológico y plantear un tratamiento dirigido, también se puede plantear un tratamiento por quimioterapia o temozolomida en el caso de los adultos. Estos tumores evolucionan hacia gliomas de alto grado en un tiempo medio de 7 años y pueden llevar a la muerte del paciente en un periodo de 2 - 3 años (28).

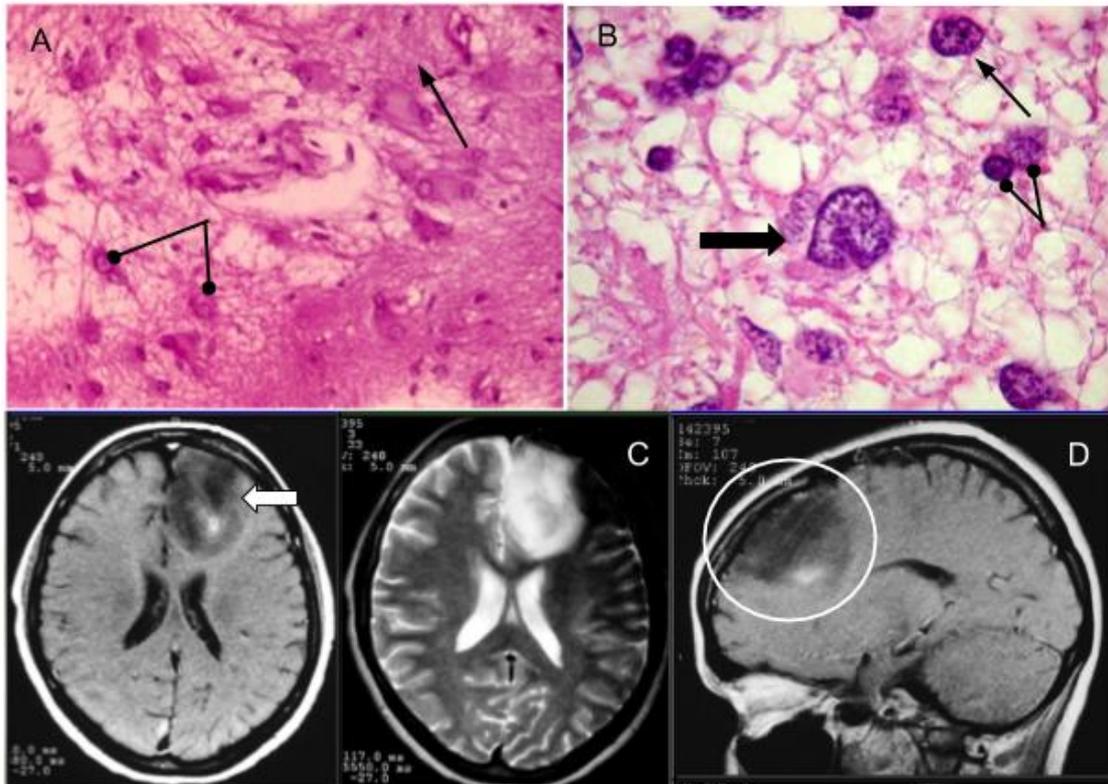


Figura 6. Astrocitoma difuso: cortes histológicos y resonancias magnéticas. **A)** Patrón celular característico del AstD con tinción de HE en microscopía de campo claro a 40x. Se observan astrocitos (puntas circulares) y un fondo fibrilar desordenado (flecha delgada). **B)** Células de AstD con tinción de HE en microscopía de campo claro a 100x. Se observan núcleos astrocíticos en morado (flecha delgada), una célula binucleada (punta circular) y un astrocito con atipia nuclear (flecha ancha). **C)** Resonancia magnética de un AstD en plano axial, presente en el lóbulo frontal (flecha blanca), igualmente se observa el mismo tumor con contraste, que permite observar la delimitación del mismo. **D)** Resonancia magnética de un AstD en plano sagital, presente en el lóbulo frontal (circulo blanco). [Tomadas y modificadas: **A** de (32), **B**, **C** y **D** de (33)]

b) Astrocitomas de alto grado

Son tumores heterogéneos malignos que se comportan agresivamente provocando invasión local de la matriz extracelular. Se presentan en mayor frecuencia de los 15-19 años y representan el 10% de todos los tumores gliales pediátricos (18). Pueden surgir de manera espontánea o por la transformación de un glioma de bajo grado bien delimitado (29). Los Ast de alto grado más frecuentes son el astrocitoma anaplásico (Grado III) y el glioblastoma multiforme (Grado IV).

i) OMS Grado III - Astrocitoma anaplásico

El astrocitoma anaplásico (AstA) es un tipo de neoplasia que se presenta principalmente en adultos, siendo frecuente entre los 45 - 60 años. Constituyen el 4% de los tumores primarios y pueden surgir a partir de un glioma de bajo grado o de manera espontánea sin un tumor precursor. Se encuentran en los hemisferios cerebrales, el diencéfalo, vías ópticas o el tallo cerebral (Figura 7E) (25). Es un tumor difuso e infiltrante, con gran potencial proliferativo y produce un engrosamiento de las estructuras invadidas (Figura 7C y 7D). Las formas quísticas son poco comunes, suelen mostrar granulaciones y tienen consistencia más blanda. Histológicamente se presenta un aumento de celularidad, atipia nuclear y marcada actividad mitótica (Figura 7A). La anaplasia progresiva presenta núcleos de morfología compleja y diferentes tamaños, nucleolos prominentes, inclusiones nucleares, células multinucleadas y mitosis atípicas (Figura 7C), a veces pueden encontrar células gemistocíticas (Figura 7B). Los vasos capilares se encuentran rodeados por una capa de células endoteliales y no se evidencian formaciones vasculares glomeruloides ni necrosis. Estos tumores tienen tendencia a transformarse en GBM glioblastoma multiforme en un tiempo medio de dos años (25).

Los síntomas y el tratamiento varían de acuerdo a la localización y tamaño del tumor. La sintomatología en general son las crisis epilépticas, alteraciones visuales, déficits focales o deterioro cognitivo progresivo. El tratamiento recomendado es la cirugía, procurando retirar la mayor parte del tumor sin dañar el estado neurológico del paciente, ya que la resección total es imposible. Después, se puede aplicar radioterapia o quimioterapia con temozolomida (30).

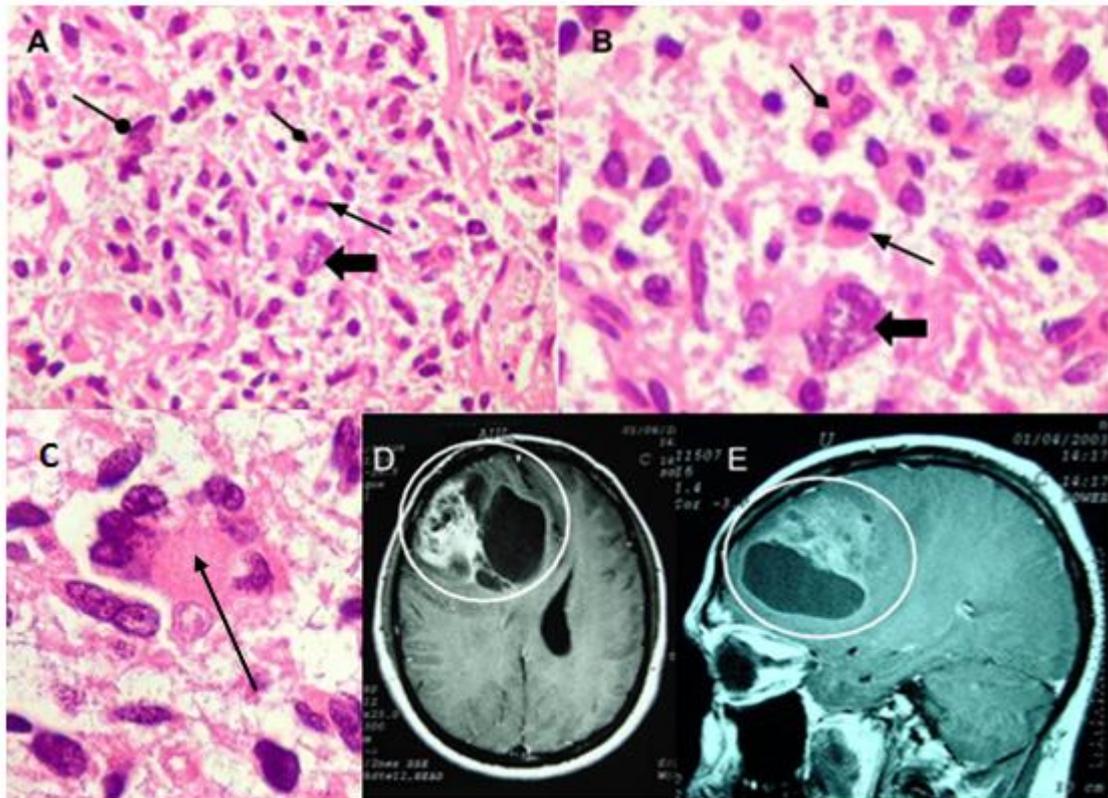


Figura 7. Astrocitoma anaplásico: cortes histológicos y resonancias magnéticas. **A)** Patrón celular característico del AstA con tinción de HE en microscopía de campo claro a 40x. Se observa polimorfismo celular: células multinucleadas (punta romboide), una célula con mitosis activa (flecha delgada), una célula gemistocítica (flecha ancha) y una célula en apoptosis (punta circular). **B)** Células de AstA con tinción de HE en microscopía de campo claro a 100x. Se observan células multinucleadas (punta romboide), una célula con mitosis activa (flecha delgada) y una célula gemistocítica (flecha ancha). **C)** Célula gigante multinucleada con tinción de HE en microscopía de campo claro a 100x (flecha delgada). Se observan los núcleos (color morado) y el cuerpo celular (rosa claro). **D)** Resonancia magnética de un AstA con forma quística en plano axial, presente en el lóbulo frontal (circulo blanco), se puede observar como el tumor desplaza al tejido circundante. **E)** Resonancia magnética de un AstA en plano sagital, presente en el lóbulo frontal (circulo blanco). [Tomadas y modificadas: **A, B, C** de (34), **D** y **E** de (35)].

ii) OMS Grado IV - Glioblastoma multiforme

El glioblastoma multiforme (GBM) es la neoplasia cerebral más frecuente y agresiva, constituyendo cerca del 50% de los tumores cerebrales y aproximadamente el 9% de los tumores gliales en niños. El GBM primario, surge espontáneamente sin evidencia de un tumor precursor, son los más comunes y frecuentes en adultos de 45 - 65 años de edad, afectando a más hombres que mujeres (25). El GBM secundario, surge a partir de un Ast de grado II o grado III y se presenta en pacientes de 45 años o menos (25,30). Se encuentran principalmente en la sustancia blanca del cerebro y en el caso de los niños, es frecuente en el lóbulo frontal y el tallo cerebral (Figura 8E y 8F), aunque se han descrito en el cerebelo y en la médula espinal (29,30). Es un glioma pobremente diferenciado e infiltrante, con crecimiento acelerado y pobremente delimitado por el parénquima cerebral; en caso de tener gran cantidad de colágeno, el tumor tiene mejor consistencia y delimitación. Histológicamente, presenta astrocitos pleomórficos (Figura 8A), atipia nuclear marcada y actividad mitótica (Figura 8C), intensa proliferación microvascular (Figura 8B) y necrosis (Figura 8D). Las células multinucleadas y gigantes son frecuentes, pero la mayor parte del tumor se encuentra constituido por células de menor tamaño con núcleos hipercromáticos y poco diferenciadas (Figura 8A). El patrón de crecimiento puede mostrar focos de disposición granuloide, componentes oligodendrogiales o gemistocíticos y células granulares o lipidizadas (25). Los síntomas más comunes son dolores de cabeza, convulsiones, pérdida de memoria y cambios de comportamiento. Otros síntomas pueden ser la pérdida de movimiento o sensibilidad en un lado del cuerpo, disfunción en el lenguaje y trastornos cognitivos. Dependiendo del tamaño y la ubicación del tumor también pueden aparecer otros síntomas. El tratamiento principal es la cirugía, con el fin de extraer la mayor parte del tumor, obtener una muestra de tejido y poder dirigir el tratamiento por radioterapia o quimioterapia, principalmente utilizando temozolomida en pacientes adultos (30). La media de supervivencia del GBM glioblastoma multiforme es de 15 meses después de la operación (36).

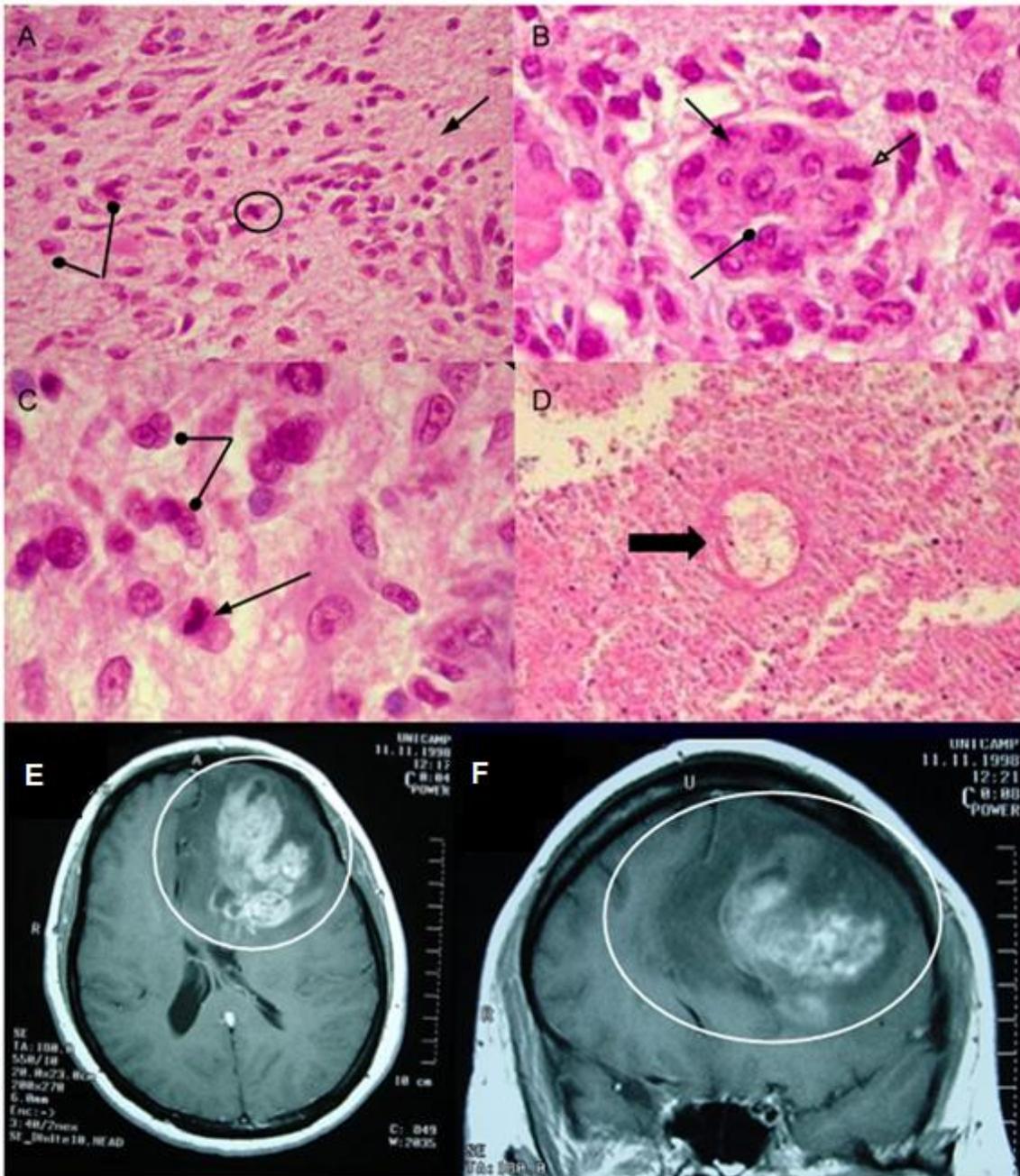


Figura 8. Glioblastoma multiforme: cortes histológicos y resonancias magnéticas. **A)** Patrón celular característico del GBM con tinción de HE en microscopía de campo claro a 40x. Se observa polimorfismo celular: células multinucleadas con núcleos atípicos (punta circular), una célula con mitosis activa (círculo negro) y un fondo fibrilar desorganizado (flecha) **B)** Vaso capilar con tinción de HE en microscopía de campo claro a 100x. Se observa proliferación endotelial (flecha), mitosis en una célula endotelial (flecha clara) y la luz del capilar (punta circular). **C)** Células multinucleadas con tinción de HE en microscopía de campo claro a 100x (punta circular) y una célula con mitosis activa (flecha). **D)** Necrosis coagulativa con tinción de HE en microscopía de campo claro a 40x (flecha ancha) **E)** Resonancia magnética de un GBM en plano axial, presente en el lóbulo frontal (círculo blanco), se puede observar como el tumor desplaza al tejido circundante. **F)** Resonancia magnética de un GBM en plano coronal, presente en el lóbulo frontal (círculo blanco), se puede observar como el tumor desplaza al tejido circundante. [Tomadas y modificadas: **A, B, C y D** de (37), **E y F** de (38)]

Tabla 1. Características y localización de los Ast en el SNC (OMS 2007)

Grado histológico	Características	Localización
OMS grado I	Lesiones con bajo potencial proliferativo, crecimiento expansivo, posibilidad de cura luego de la resección quirúrgica.	Nervio óptico, quiasma óptico, hipotálamo, tálamo, ganglios basales, hemisferios cerebrales, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal.
OMS grado II	Lesiones con bajo potencial proliferativo, crecimiento infiltrante y tendencia a la recurrencia. Algunas de estas lesiones tienden a progresar a grados mayores.	Cerebro, tallo cerebral, médula espinal, nervio óptico, quiasma óptico, vía óptica, hipotálamo y tálamo
OMS grado III	Lesiones con evidencia histológica de malignidad, mitosis, anaplasia y capacidad infiltrante.	Cerebro, diencefalo, cerebelo, tallo cerebral, vía óptica y médula espinal.
OMS grado IV	Lesiones malignas, mitóticamente activas, tendencia a la necrosis y evolución rápida tanto pre como postoperatoria.	Principalmente en cerebro, rara vez en el lóbulo frontal, cerebelo, tallo cerebral y médula espinal.

1.2.2 Nueva clasificación de los astrocitomas

La nueva clasificación de la OMS 2016, está basada en los astrocitomas de adulto y sólo incluye algunos subtipos pediátricos (Tabla 2). Una de las modificaciones es la fusión de todos los gliomas difusos independientemente de que se originen por oligodendrocitos o astrocitos, basándose en las mutaciones de los genes *IDH1* e *IDH2* (isocitrato deshidrogenasa 1 y 2), se incluye en esta clasificación a los tumores astrocíticos grado II – AstD, grado III – AstA y grado IV – GBM, así como los oligodendrogliomas de grado II y III (22,39) (Tabla 2).

Los AstD y AstA ahora se han dividido en las categorías de *IDH* – mutante, *IDH* – silvestre e *IDH* – NOS (no especificado). Dos de las variantes del AstD protoplásmico y el fibrilar fueron descartadas debido a que el diagnóstico se consideraba vago, manteniendo solamente la variante de AstD gemistocítico que es diferente del AstD *IDH* – mutante. El caso de *IDH* – mutante, se divide en pérdida de *ATRX* (helicasa *ATRX* dependiente de ATP) o mutación de *TP53* para AstD y en presencia o ausencia de codelecciones 1p / 19q para oligodendrogliomas. Esta clasificación solamente aplica en tumores adultos ya que estos cambios genéticos se consideran raros en tumores pediátricos a pesar de que la histología de ambos tumores sea muy parecida. Sin embargo, en esta clasificación se realizó la separación de tumores adultos y pediátricos basándose en marcadores moleculares, por ejemplo los gliomas difusos de la línea media con mutación *H3 K27M*, que incluyen a los gliomas pontinos y gliomas de alto grado con localización en el tálamo, estos tumores son considerados de mal pronóstico (22,23).

En el caso de los GBM, se clasifican en las categorías de *IDH* – mutante, *IDH* – silvestre e *IDH* – NOS (no especificado). Además se agregó una nueva variante, el glioblastoma epiteloide que presentan largas células epitelioides con abundante citoplasma eosinófilico, cromatina vesicular y nucléolos prominentes, ocasionalmente pueden presentar células rabdoideas. Son comunes en niños y adultos jóvenes,

presentándose como masas cerebrales superficiales o diencefálicas y a menudo albergan una mutación *BRAF V600E* (22,39).

Tabla 2. Clasificación OMS 2016 de los gliomas del SNC

Grado OMS	Tumor
OMS Grado I	Astrocitoma pilocítico
	Astrocitoma subependimal de células gigantes
OMS Grado II	Astrocitoma difuso, <i>IDH</i> mutante
	Oligodendroglioma, <i>IDH</i> mutante y codeleción 1p/19q
	Xantoastrocitoma pleomórfico
OMS Grado III	Astrocitoma anaplásico, <i>IDH</i> mutante
OMS Grado IV	Glioblastoma, <i>IDH</i> silvestre
	Glioblastoma, <i>IDH</i> mutante
	Glioma difuso de la línea media, <i>H3 K27M</i> mutante

Es importante destacar que en un estudio realizado por Mackay *et al* 2017 (40), se sugiere una nueva clasificación de los Ast pediátricos de alto grado (aquellos encontrados en OMS Grado III y Grado IV) basándose en la presencia o ausencia de las mutaciones de la histona H3.3: *H3.3G34R/V*, *H3.3K27M*, *H3.1/3.2H27M* y la mutación en los genes *BRAFV600E* e *IDH1R132*, así como la presencia o ausencia de ciertos rasgos epigenéticos como metilación y cambios en el número de copias de DNA. Igualmente se encontraron diferentes genes relacionados con cada una de las mutaciones que podrían ser de gran utilidad para que la clasificación sea más exacta (Figura 9).

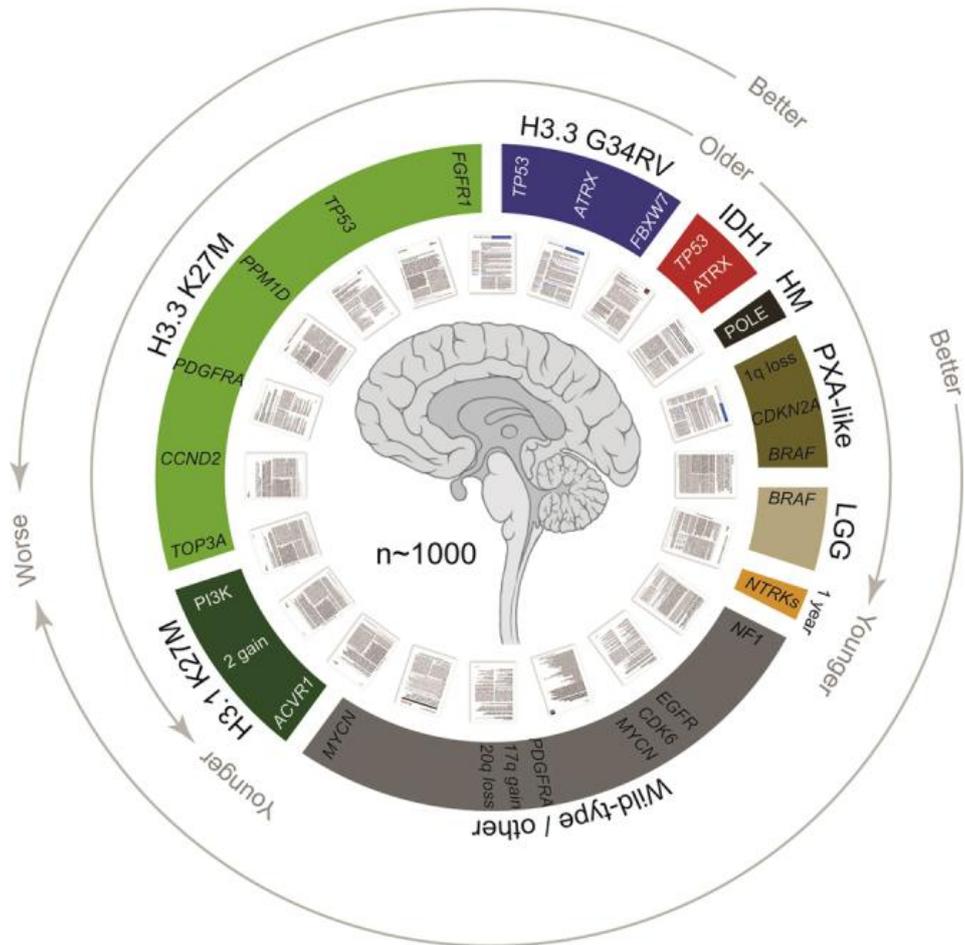


Figura 9. Clasificación de los astrocitomas pediátricos de alto grado según Mackay *et al* (2017).
 Se observa que los Ast se encuentran clasificados por su mutación principal (y los genes alterados relacionados), la etapa en la que se presentan y su pronóstico una vez diagnosticado [Tomado de (40)]

1.3 RNAs largos no codificantes

Los RNAs largos no codificantes (en inglés Long non-coding RNAs) son transcritos de más de 200 nt en longitud que no son traducidos en proteínas (41). Son transcritos por la RNA polimerasa II (RNA pol II) y en su mayoría presentan una estructura idéntica a un mRNA con un grupo metil-guanosina unido al grupo trifosfato (Cap) en el extremo 5' y una cola de poli-A en la región 3' terminal, la mayor parte de ellos presenta un número pequeño de exones (en promedio dos) y exhiben señales estándar de splicing canónico y splicing alternativo (41,42). Al igual que los mRNA, muchos lncRNAs presentan marcados los dominios "K4-K36" (histona 3 con trimetilación en la lisina 4 - histona 3 con trimetilación en la lisina 36), sin importar que el lncRNA se origine a partir de su propio promotor o de un potenciador. Estas marcas de histonas se observan principalmente en genes que codifican mRNA, mientras que la marca característica de potenciadores H3K4 metilada es más prominente en regiones genómicas codificantes para lncRNAs, estos sitios corresponden con sitios hipersensibles a la Desoxirribonucleasa I (DNase I) que indican cromatina accesible (42). Sin embargo, a pesar de presentar la estructura de un mRNA, los lncRNAs pueden ser sintetizados por la RNA polimerasa III (RNA pol III) (43).

Taxonómicamente, los RNAs no codificantes son considerados como genes constitutivos y reguladores de mRNAs (41). La mayoría de los lncRNA están pobremente conservados en comparación a los mRNA (43), se han encontrado algunos lncRNAs en las regiones genómicas sinténicas (42) altamente conservados en cerebro de ratón y en especies distantes como zarigüeyas y pollos, por lo que se sugiere que estos RNAs cumplen roles importantes en este tejido (43) y que pudieron contribuir a la evolución de las especies debido a que estos presentan un nivel de expresión diferente dependiendo de las células y el tejido (41) por lo que podrían promover características específicas de la especie y la complejidad de los órganos que presentan. En relación a los genes codificantes, las secuencias de lncRNA están

menos conservadas que los exones pero están más conservadas que los intrones de los mRNAs (42), mientras que sus promotores están tan conservados como los de los genes codificantes de proteínas (43). Algunos lncRNA pueden presentar marcos de lectura abiertos (ORFs) cortos no conservados (aprox. de 100 nt), que no presentan homología con secuencias de péptidos conocidos y que no coinciden con los que han sido identificados por espectrometría de masas, por esta razón son considerados genes no codificantes (41–43). Sin embargo en algunas ocasiones se han encontrado oligopéptidos funcionales (menores a 100 aminoácidos) que se traducen a partir de un lncRNA (41,43). Hay algunos genes que pueden producir secuencias codificantes de proteínas y al mismo tiempo secuencias no codificantes por medio de splicing alternativo, sin embargo hay pocos estudios que demuestran que estos pueden ser funcionales, lo que provoca algunos problemas al clasificarlos (42).

1.3.1 Categorización por localización genómica

Los lncRNAs son altamente heterogéneos, por esta razón han sido colocados en diferentes categorías basándose en su proximidad con los genes codificantes de proteínas, estos son: **intergenicos** cuando se encuentran distantes a otro gen, aproximadamente más de 10 Kb (lincRNAs), **divergentes** cuando se transcriben en la cadena opuesta de la misma región del promotor que un gen codificante de proteínas (pancRNAs), **convergentes** cuando se transcriben a partir de cadenas contrarias y se encuentran entre sí, **intrónicos** cuando se transcriben a partir de los intrones de otros genes, **sobrelapados en sentido** cuando se encuentran superpuestos con genes de la misma cadena, **sobrelapados en antisentido** cuando se encuentran sobrelapados con genes de la cadena opuesta, **asociados a promotores** cuando se expresan a partir de un promotor con alta proporción de H3K4me3 a H3K4me1 (plncRNAs), **RNAs enhancer** cuando se transcriben a partir de potenciadores ya sea de manera **unidireccional o bidireccional** (eRNAs), algunos de estos solo se transcriben

unidireccionalmente a partir de un promotor con baja proporción de H3K4me3 a H3K4me1 y reciben el nombre de **RNAs asociados al enhancer** (eIncRNAs), **circulares** cuando se generan a partir de la separación de intrones de mRNAs o de otros lncRNAs (circRNAs) y **gen huésped de microRNAs** cuando funcionan como precursores al contener la secuencia principal de estas moléculas (Figura 10) (42–45).

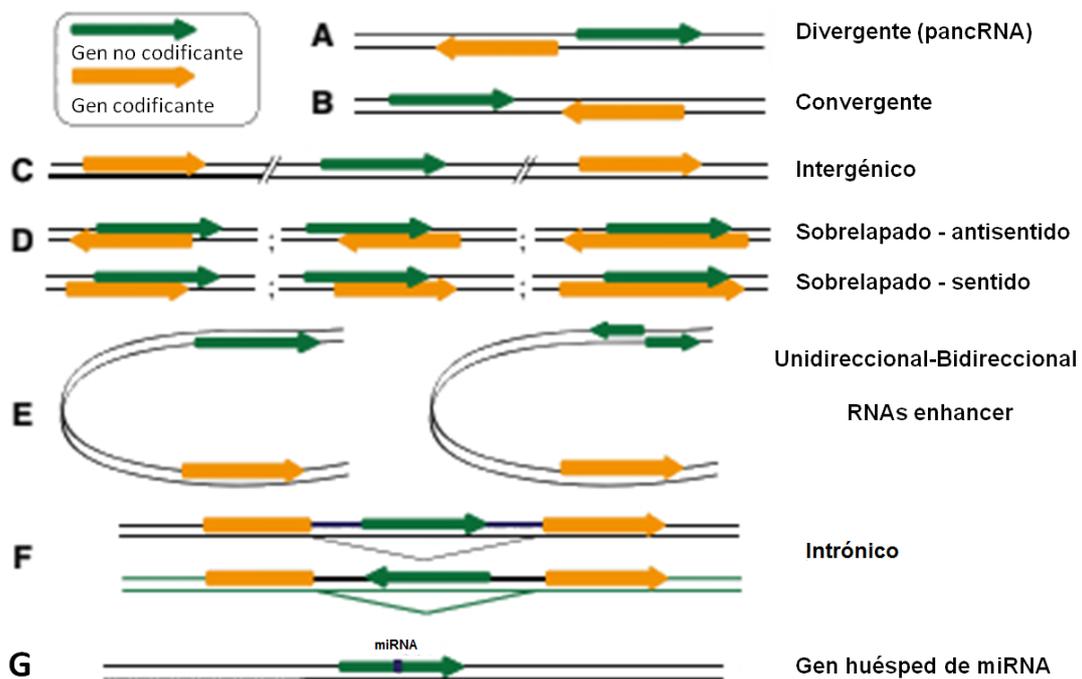


Figura 10. Clasificación de los lncRNAs. **A)** RNA no codificante divergente o pancRNA. **B)** RNA no codificante convergente. **C)** RNA no codificante intergénico (lincRNAs). **D)** RNAs no codificantes sobrelapados en antisentido y en sentido a los genes codificantes de proteínas. **E)** RNAs no codificantes enhancer (eRNAs). **F)** RNA no codificante intrónico. **G)** RNA no codificante, huésped de miRNA. Los genes no codificantes se indican en verde, mientras que los genes codificantes se indican en amarillo. [Tomado y modificado de (42)]

1.3.2 Posibles estructuras

Los transcritos de RNA y los lncRNA tienen la capacidad de formar complejas estructuras, sus conformaciones principalmente consisten en bucles/asas de cadena simple y tallos de doble cadena, por lo que pueden presentar una conformación 3D que les permite formar interacciones entre moléculas como otros ácidos nucleicos (DNA o RNA) por apareamiento de bases o formación de redes y complejos de

proteínas. Actualmente, se han descubierto las estructuras secundarias de algunos lncRNAs, pueden presentar una estructura parecida a un RNA de transferencia (tRNA) (por ejemplo *MALAT1*), una estructura helicoidal o apareamiento de bases (el activador de RNA del receptor de esteroides/*SRA*). Algunos pueden presentar horquillas largas (*SPRY4-IT1*) y otros funcionar como andamios moleculares con una estructura muy compleja (*HOTAIR*). Los cambios en la estructura les permite actuar como dominios de unión para distintos complejos de proteínas y también pueden servir como señal, guía o andamio en diferentes niveles celulares como su interacción con la cromatina y RNAs pequeños como los micro RNAs (miRNAs) (43). La estructura de algunos lncRNAs ha sido determinada experimentalmente por medio de ensayos químicos y apareamiento de bases por medio de RNAsas, así como con el uso de métodos computacionales (Figura 11) sin embargo estos solo pueden predecir la estructura secundaria y no la estructura terciaria (42).

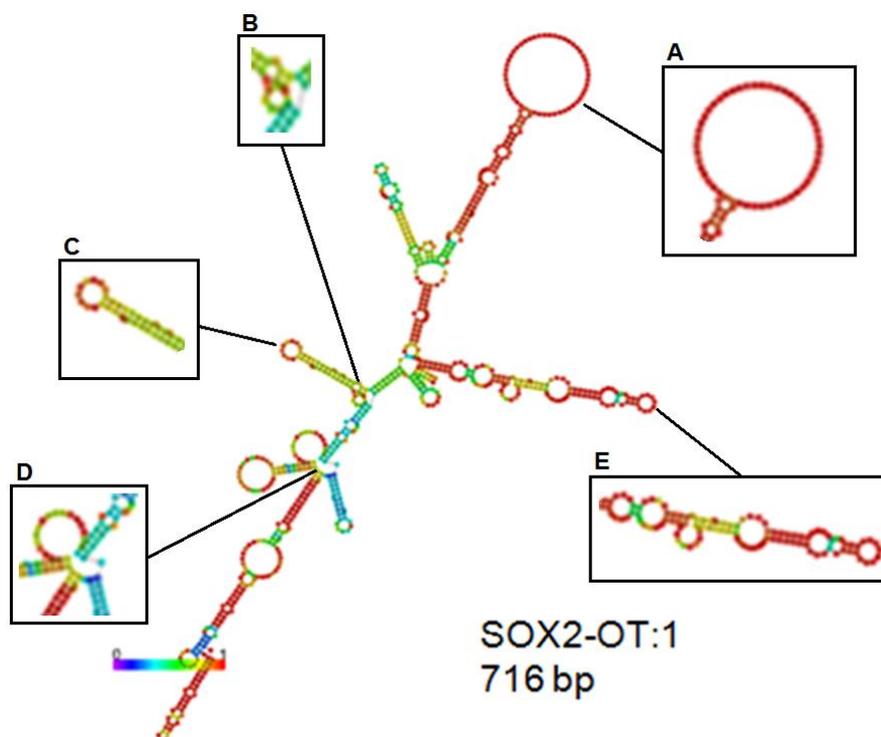


Figura 11. Estructura secundaria del lncRNA SOX2-OT:1. Se observan las estructuras secundarias más comunes en un lncRNA. **A)** Bucle o hélice. **B)** Pseudonudo, dos bucles que se encuentran apareados en un solo punto. **C)** Bucle en horquilla o estructura tallo-asa. **D)** Protuberancia, una región de la secuencia no se encuentra apareada. **E)** Bucle múltiple y bucles internos [Tomado y modificado de (46)].

1.3.3 Funciones descritas

Según experimentos realizados por medio de secuenciación de especies aisladas de RNA a partir de fracciones citosólicas o nucleares, la mayor parte de los lncRNAs detectados se encuentran en el núcleo (asociados a cromatina), y una fracción menor se encuentra en el citoplasma.

El hecho de que estos RNAs se encuentran a nivel subcelular sugiere que los lncRNAs tienen una función específica. Por ejemplo, los lncRNAs que se encuentran en el núcleo pueden interactuar con la cromatina y coregular la transcripción o pueden regular la estructura de la cromatina cerca o en el sitio de transcripción (42), sin embargo la función de la mayor parte de lncRNAs hasta la fecha descritos es desconocida (41).

Los lncRNAs participan de manera activa en la modulación de modificaciones epigenéticas del DNA, splicing alternativo, regulación postranscripcional, estabilidad y traducción de los genes codificantes de proteínas, regulando de esta manera la expresión génica (43). Asimismo, participan en diferentes procesos celulares que incluyen proliferación, migración, apoptosis, desarrollo y mantenimiento de pluripotencia, por lo que los lncRNAs se pueden clasificar como señal, guía, andamio y señuelo. Igualmente, pueden interactuar con otras moléculas como los microRNAs (miRNAs), con complejos de proteínas y elementos reguladores, por lo que se sugiere que estos RNAs cumplen un papel regulador por medio de ensamblaje de proteínas y otras moléculas como DNA y RNA (42,47). La expresión de los lncRNAs es regulada de manera dinámica durante el desarrollo embrionario y la diferenciación celular, e igualmente, algunos pueden producir polipéptidos pequeños e interactuar con otros RNAs y proteínas (Figura 12).

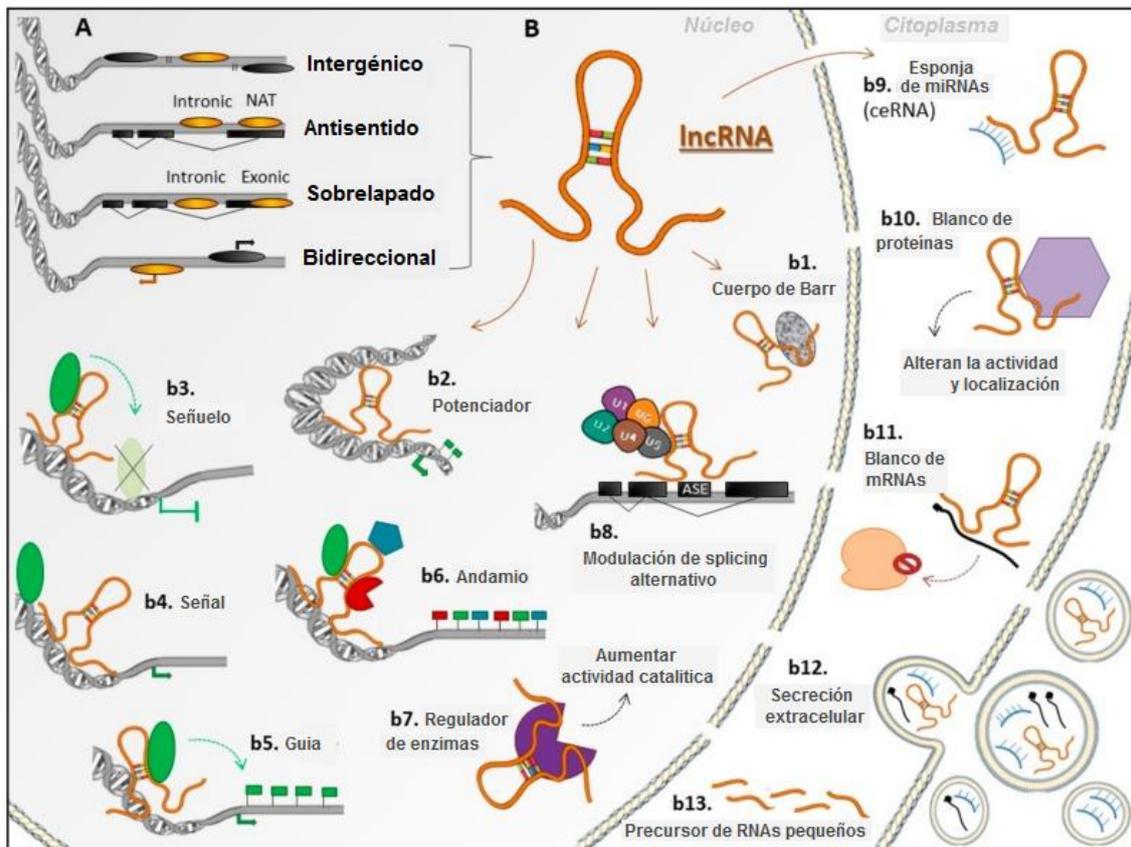


Figura 12. Funciones de los lncRNAs. **A)** Categorización por localización genómica. Como ejemplo se observan los lncRNAs intergénicos, antisentido, sobrelapado y bidireccionales (lncRNAs en dorado, genes codificantes de proteínas en negro). **B)** Distintas funciones de los lncRNAs. b1) *Xist* como un componente del cuerpo de Barr en células somáticas de hembras. b2) Potenciador o enhancer, induciendo la transcripción en *cis* o *trans*. b3) Señuelo para proteínas reguladoras como factores de transcripción y modificadores de histonas, bloquean su unión al DNA. b4) Señales moleculares, activan o silencian la expresión génica. b5) Guía para proteínas modificadoras de cromatina a sitios específicos. b6) Andamios para complejos epigenéticos o diferentes proteínas, formando complejos ribonucleoproteicos afectando la expresión génica. b7) Interacción con enzimas, regulando o potenciando su capacidad catalítica y alterando su señalización. b8) Modulación del empalme alternativo. b9) RNA endógeno competitivo (ceRNA) funcionando como esponja para miRNAs. b10) Blanco de proteínas, formando complejos moleculares que bloquean/inducen efectos funcionales o alterar la ubicación de los mismos en la célula. b11) Blanco de mRNAs, inhiben su traducción en los ribosomas. b12) Trasfección de lncRNAs por medio de vesículas extracelulares. b13) Precursores de miRNAs y otros RNAs reguladores pequeños. [Tomado y modificado de Salviano-Silva, et al, 2018 (48)]

1.4 LncRNAs en cáncer

Recientemente, diversos estudios de expresión de RNA han relacionado a los lncRNAs con el cáncer, estos estudios, realizados en diferentes muestras como tumores primarios, biopsias metastásicas, tejido normal adyacente y líneas celulares cancerosas, han revelado una alta especificidad de los lncRNAs en comparación a los genes que codifican proteínas. Los patrones de expresión de los lncRNAs son muy útiles para identificar subtipos tumorales, por lo que podría ser posible definir subtipos que sean capaces de responder a terapias dirigidas. Un estudio realizado para el proyecto “atlas del genoma del cáncer (TCGA)”, demostró que genes codificantes y no codificantes se encontraban desregulados y que aproximadamente el 60% de los lncRNAs detectados son específicos para un solo tipo de tumor. Se han observado cambios en el número de copias de DNA en loci donde se encuentran lncRNA, por ejemplo, se ha demostrado que el lncRNA *FAL1* está amplificado en diferentes tipos de tumores y es importante para los efectos tumorigénicos de líneas celulares con un mecanismo mediado por *BMI1*, de manera que el nivel de expresión y el número de copias está correlacionado con la supervivencia del paciente (42). Otros estudios han demostrado que estos lncRNAs pueden funcionar como genes supresores de tumores o como oncogenes (36,41) algunos pueden funcionar como biomarcador y pueden ser útiles como pronóstico para la supervivencia general de los pacientes (42).

MEG3 o *Gtl2* es un lncRNA humano que tiene una longitud aproximada de 1.6 kb y presenta doce isoformas de empalme diferentes. Zhang X, *et al* (49) demostró que al silenciar la isoforma Meg3 en tumores pituitarios, se inhibía el crecimiento de las células cancerosas por su expresión ectópica, de manera que se sugirió que la isoforma Meg3 funcionaba como supresor de crecimiento. En otro estudio (50) se encontró que la expresión de *MEG3* en meningiomas está asociada al grado tumoral y que suprime la síntesis de DNA y estimula la activación en trans mediada por p53. Además, la isoforma Meg3 presenta efectos antitumorales de alta importancia en la

patogénesis del carcinoma de células escamosas de lengua y podría ser utilizado como biomarcador de pronóstico en este tipo de cáncer (51).

En un estudio en modelos de ratón con cáncer de pulmón y cáncer de mama con metástasis, la expresión de el lncRNA *MALAT1* fue inhibida y después de la inducción del tumor se redujo la formación de metástasis, los ratones knockout para *MALAT1* no mostraron los fenotipos evidentes de anormalidades histológicas de la zona afectada, por lo que es posible que la regulación negativa de *MALAT1* podría no causar daños en células humanas normales y podría ser utilizado en pacientes, además, *MALAT1* está involucrado en la modificación del RNAm al realizar corte y empalme del mismo (42,47). Otro ejemplo es el pseudo lncRNA *BRAFP1* que está mutado o se expresa de manera aberrante en diferentes tipos de cáncer, así como su gen homólogo *BRAF*. En modelos de ratón se demostró que al inducir la expresión del gen *Braf-rs1* (homologo de *BRAFP1*) conduce a la formación de tumores parecidos a linfomas difusos de células B grandes; pero cuando el transgen se indujo para formación de tumores y después se inhibió, los tumores sufrieron regresión demostrando la importancia de este pseudogen. También se demostró que en modelos murinos *Braf-rs1* aumenta la regulación del gen *Braf* actuando como un RNA endógeno competitivo (ceRNA) y por lo tanto funcionando como esponja para miRNAs que son blancos para los transcritos de *BRAF* (42). Un mecanismo para prevenir la formación de tumores son los oncogenes inductores de senescencia (OIS), por ejemplo el locus supresor de tumores INK4B-ARF-INK4A es silenciado en las células en proliferación por proteínas del grupo Polycomb, el mecanismo depende del lncRNA *ANRIL* que actúa en cis y se transcribe a partir del locus mencionado, el gen *MIR31HG* en dirección 5' codifica un lncRNA que está involucrado en la regulación del gen *INK4A*, el lncRNA *UCA1* también está involucrado en OIS estabilizando mRNAs involucrados en senescencia posiblemente al secuestrar a *hnRNPKA1* (42).

Como último ejemplo, podemos mencionar a el gen supresor de tumores *p53* el cual se ha demostrado puede tener interacción con distintos lncRNAs uno de ellos es el *linc-p21* que al unirse con *hnRNP-K* regula la expresión de genes blanco de *p53* (47).

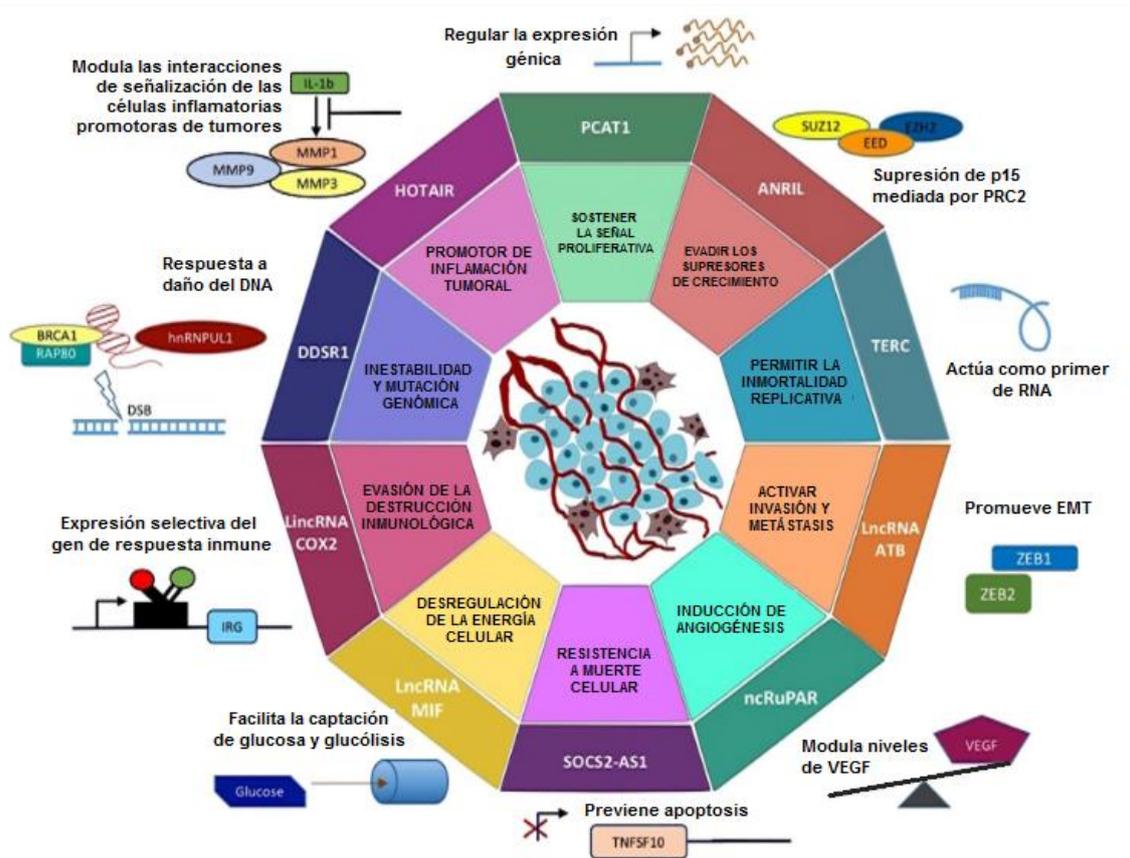


Figura 13. Funciones de lncRNAs en cáncer [Tomado y modificado de Rao, AKDM, et al, 2017 (52)]

En la literatura se pueden encontrar una gran cantidad de estudios de lncRNAs involucrados en el cáncer, sin embargo, los mecanismos de acción de estos RNAs necesitan ser investigados arduamente, ya que pueden funcionar de manera diferente entre un tipo de cáncer y otro. Dos de los lncRNAs con los que se han realizado pocos estudios en astrocitomas pediátricos son *SOX2-OT* y *BCYRN1* de los cuales se hablará a continuación.

1.5 SOX2-OT

SOX2 overlapping transcript (transcrito sobrelapado de *SOX2*), también llamado *SOX2-OT*, se encuentra en la cadena positiva del brazo largo del cromosoma 3 humano, en una región altamente conservada de ~700 kb (Localización 3q26.33) (Figura 14). Contiene entre 5 - 10 exones y puede presentar hasta 128 isoformas, de los cuales el más largo es el transcrito 90 con 4109 nt, además se encuentra superpuesto con al menos cinco genes distintos: *SOX2*, *FAUP2*, *RNU6-P4*, *RPL7AP25* y *LOC102724604* (Figura 15) (53).

En tejidos normales, se encuentra mayormente expresado en el cerebro, ya que es un regulador de la neurogénesis. Está conservado en el SNC del pez cebra, las aves y el ratón y se encuentra sobreexpresado durante el desarrollo embrionario. Se ha estudiado ampliamente en cáncer, encontrándose sobreexpresado en cáncer de pulmón y de mama; involucrado en la progresión de los mismos, así como en la tumorigénesis del cáncer de páncreas, próstata, estómago y esófago (53). Se ha encontrado que la baja expresión de *SOX2-OT* está relacionada con la motilidad de las células de GBM de adulto y con mal pronóstico para el paciente (54).



Figura 14. Mapa del cromosoma 3. Se puede observar la localización del RNA no codificante *SOX2-OT* en 3q26.33. Tomado de (55).

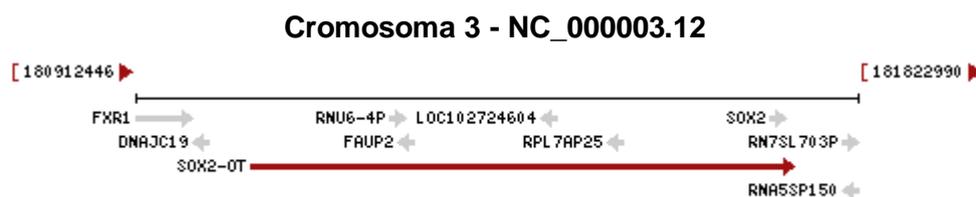


Figura 15. Mapa de superposición de *SOX2-OT*. Se puede observar que *SOX2-OT* se superpone con al menos seis secuencias distintas. Tomado de (56)

1.6 BCYRN1

Brain cytoplasmic RNA 1 (RNA citoplasmático cerebral 1), también llamado *BCYRN1* o *BC200*, se encuentra en la cadena positiva del brazo largo del cromosoma 2 humano (Localización: 2p21) (Figura 16). Contiene solo un exón y es una secuencia de 200 nt (Figura 17). Produce una pequeña proteína codificada en la familia de los DNA repetitivos intercalados, se cree que este gen fue generado por retroposición y reclutó una función para la regulación de la biosíntesis de proteínas dendríticas. Se ha estudiado en la ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva 1 y el síndrome de Perlman (55,57) y en distintos tipos de cáncer como pulmón, mama, cervix, estómago y colon está involucrado en la inducción o progresión de los mismos al regular proliferación celular, migración y resistencia apoptótica. Además se ha propuesto como biomarcador para cáncer ya que varios estudios han mostrado que su transcripción no se detecta en las etapas tempranas de la enfermedad o en tejido normal adyacente, pero aumenta de manera gradual cuando el tumor progresa a etapas más avanzadas, mostrando agresividad en las células cancerosas, también se ha observado que la alta expresión de *BCYRN1* se correlaciona con mal pronóstico y una supervivencia más corta para el paciente (58).

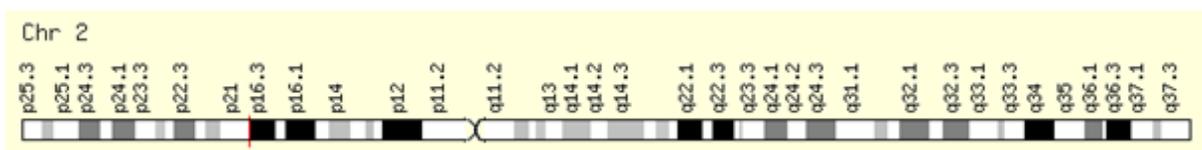


Figura 16. Mapa del cromosoma 2. Se puede observar la localización del RNA no codificante BCYRN1 en 2p21. Tomado de (55)

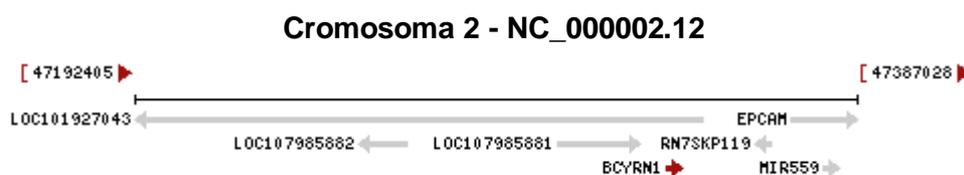
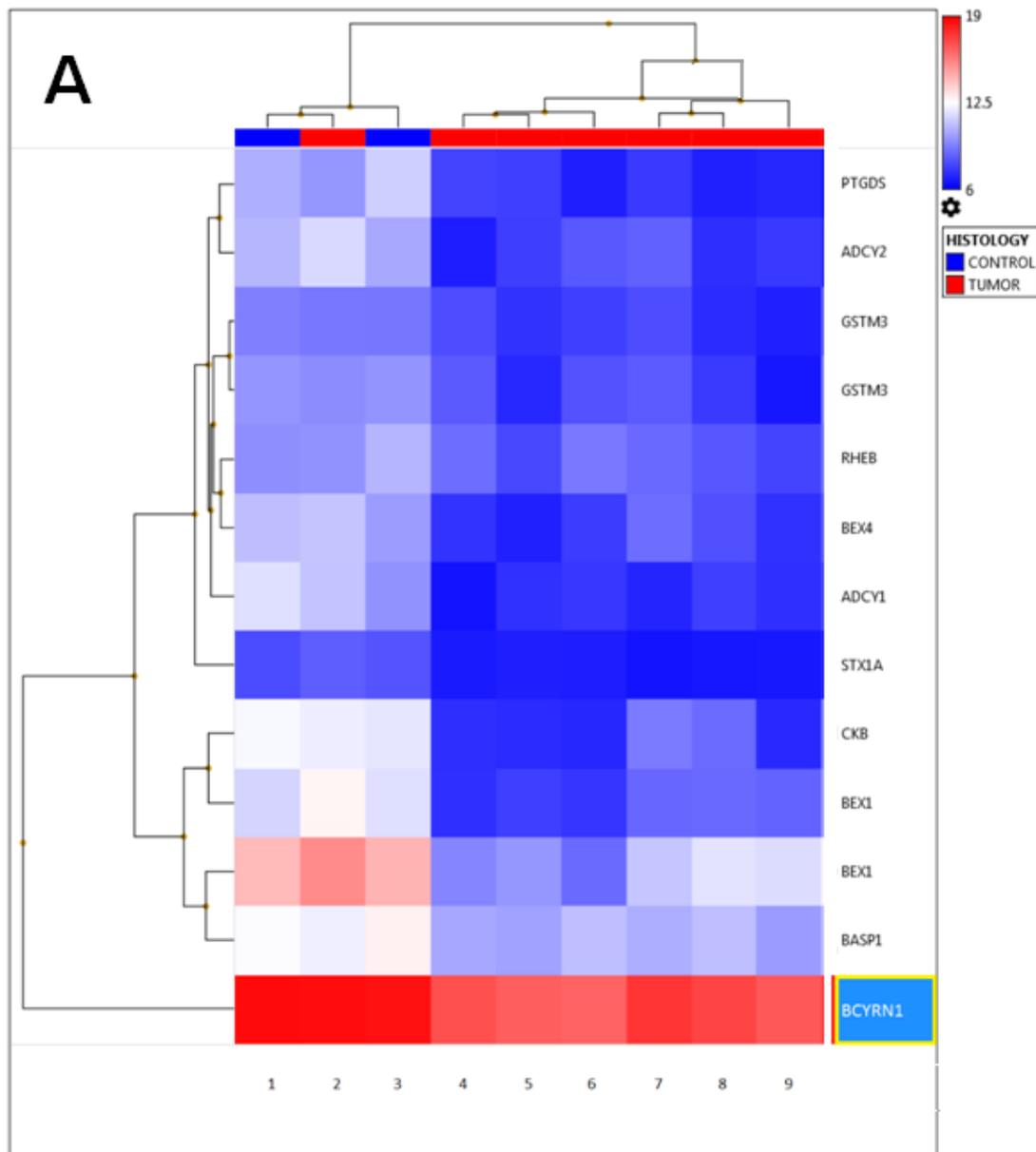


Figura 17. Mapa de la secuencia de BCYRN1. Tomado de (57)

II. Antecedentes directos

En un estudio realizado por Ruiz Esparza-Garrido R, *et al* 2017 (59), se analizaron 7 muestras de astrocitoma pediátrico de diferente grado histológico por medio de microarreglos de expresión (HTA 2.0, Affymetrix) y se obtuvieron cambios en la expresión de diferentes RNAs. Se encontró una gran cantidad de lncRNAs alterados, entre ellos *SOX2-OT* y *BCYRN1*, de los cuales se han registrado muy pocos estudios en astrocitomas, por esta razón es importante realizar más investigaciones sobre estos lncRNAs y su papel en estas neoplasias (Figura 18).



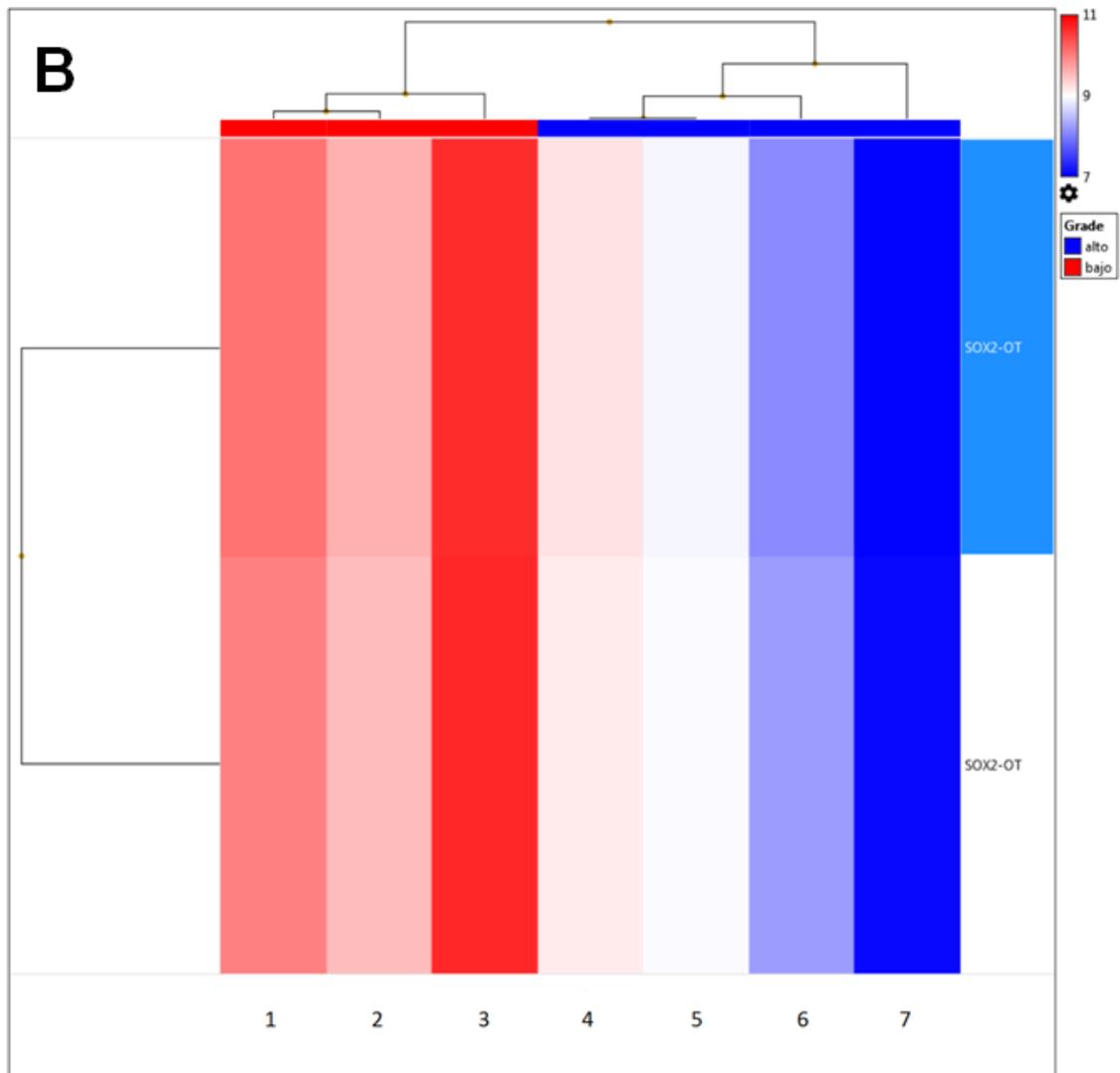


Figura 18. Mapas de calor de los lncRNAs BCYRN1 y SOX2-OT. A) Expresión de BCYRN1 en 9 muestras (dos controles y 7 tumores), notando una tendencia a la sobreexpresión (espectro rojo). **B)** Expresión de dos isoformas de SOX2-OT en siete muestras tumorales (tres de bajo grado y cuatro de alto grado), notando una tendencia a la sobreexpresión (espectro rojo) en las muestras de bajo grado y subexpresión (espectro azul) en las muestras de alto grado. En la parte superior del mapa de calor se presentan las muestras según su histología: control (azul) y tumor (rojo) en **A**, bajo grado (rojo) y alto grado (azul) en **B**.

III. Justificación y planteamiento del problema

Los astrocitomas son la principal causa de muerte por tumores sólidos en pacientes pediátricos (menores de 18 años). Aun cuando en los últimos años se han generado una gran cantidad de fármacos para tratar de mejorar la supervivencia de estos pacientes, esta no ha cambiado, por esta razón, el estudio de nuevas moléculas que puedan contribuir con el entendimiento de estas neoplasias es imperativo. Debido a que estos lncRNAs frecuentemente se encuentran desregulados en diferentes tipos de cáncer y ya que en experimentos previos se observó el cambio en su expresión en astrocitomas pediátricos, es fundamental validar estos cambios para posteriormente poder plantearlos como biomarcador para estas neoplasias.

IV. Hipótesis

La expresión de los lncRNAs *SOX2-OT* y *BCYRN1* será aberrante en los astrocitomas pediátricos en comparación a un tejido no neoplásico o entre los distintos grados tumorales

V. Objetivos

Validar la expresión de los lncRNAs *SOX2-OT* y *BCYRN1* en astrocitomas pediátricos de diferente grado histológico

- Determinar por qRT-PCR el patrón de expresión de los lncRNAs en astrocitomas pediátricos.
- Asociar los datos clínicos de los pacientes con la expresión de los lncRNAs estudiados.

VI. Materiales y Métodos

6.1 Obtención de muestras de Astrocitomas y tejidos control

Las muestras fueron proporcionadas por el Laboratorio de Tumores Cerebrales del Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund” de Centro Médico Nacional Siglo XXI. Se obtuvieron 14 muestras de astrocitoma pediátrico de distinto grado histológico, así como 3 muestras de pacientes con epilepsia que funcionaron como control. Los criterios de inclusión fueron: pacientes mexicanos de 1 a 16 años de edad, sin antecedentes familiares de cáncer, sin tratamiento previo y que la cantidad de tejido fuera suficiente para realizar los experimentos.

Tabla 3. Muestras de tejido control

Muestra	Histología
Control I	Gliosis (epilepsia)
Control II	Gliosis (epilepsia)
Control III	Gliosis (epilepsia)

Tabla 4. Características de las muestras analizadas (astrocitoma pediátrico)

Muestra	Histología	Grado OMS	Localización	Sexo	Edad
AstP I	Astrocitoma pilocítico	I	Tallo (Mesencéfalo)	F	7 años
AstP II	Astrocitoma pilocítico	I	Tallo (Mesencéfalo)	M	14 años
AstP III	Astrocitoma pilocítico	I	Fosa posterior	F	5 años
AstD I	Astrocitoma difuso fibrilar	II	Supratentorial	F	16 años
AstD II	Astrocitoma difuso fibrilar microquístico	II	Fosa posterior	F	11 años
AstD III	Astrocitoma difuso	II	Supratentorial	F	-
AstD IV	Astrocitoma difuso fibrilar	II	SIN LOCALIZACIÓN	F	4 años
AstD V	Astrocitoma difuso	II	Supratentorial	M	-
AstD VI	Astrocitoma difuso fibrilar	II	Tallo (Puente)	F	4 años
AstA I	Astrocitoma anaplásico	III	Tálamo	F	7 años
AstA II	Astrocitoma anaplásico	III	Supratentorial (Lóbulo frontal derecho)	F	14 años
GBM I	Glioblastoma multiforme	IV	Fosa posterior	M	14 años
GBM II	Glioblastoma multiforme	IV	Supratentorial (Lóbulo frontal derecho)	M	4 años
GBM III	Glioblastoma multiforme (brioplastico neuroepitelial)	IV	Supratentorial (Lóbulo parietal)	M	16 años

6.2 Extracción de RNA total a partir de tejido por medio de Trizol

Para extraer el RNA total, se colocó cada muestra de tejido en un tubo de 1.5 ml, en cada tubo se agregaron 800 μ L de Trizol y se conservaron a temperatura ambiente por 5 minutos. Pasado ese tiempo, el tejido se disgregó con minipistilos previamente lavados y esterilizados con luz UV en la campana de trabajo. Se agregaron 200 μ L de cloroformo, se agitaron los tubos vigorosamente por 15 segundos y se incubaron a 4°C por 15 minutos. Después, las muestras se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C y la fase acuosa obtenida se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL. A cada tubo se le agregó isopropanol volumen/volumen con el fin de precipitar el RNA y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente. La muestra se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 10 minutos y posteriormente se lavó la pastilla con 300 μ L de etanol al 75%, se agitaron los tubos y se dejaron a temperatura ambiente por 10 minutos. Los tubos se centrifugaron a 7500 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante, este paso se repitió dos veces con el fin de limpiar el RNA. Finalmente, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente dejando el tubo invertido sobre una toalla absorbente dentro de la campana y se resuspendió en 30 μ L de agua libre de nucleasas previamente calentada a 65°C.

6.3 Cuantificación de RNA total

El RNA total obtenido por la extracción se cuantificó con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 de Thermofisher Scientific, se seleccionó la opción de ácidos nucleicos y se activó con 1 μ L de agua inyectable. Se seleccionó la opción de RNA y calibró con una longitud de onda de 260 nm. Se utilizó 1 μ L de agua como blanco y cada muestra se analizó por duplicado, utilizando 1 μ L de las muestras en cada repetición.

6.4 Realización de electroforesis de RNA en gel de agarosa

Con el fin de conocer la integridad del RNA obtenido, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1.5%. Para el gel, se pesaron 0.45 g de agarosa en la balanza granataria y se diluyó en 30 mL de buffer TBE 1X en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. La mezcla se calentó a intervalos regulares en un horno de microondas cuidando que la mezcla no burbujeara. Se dejó de calentar hasta que la mezcla se tornó transparente y se dejó enfriar a temperatura ambiente unos minutos, después se le agregaron 2 μ L del colorante EpiQuik DNA Stain. La mezcla de agarosa se vació en la cámara de electroforesis, se colocó el peine y se dejó gelificar durante una hora. Cuando el gel estuvo listo, las muestras se prepararon para cargarlas: se colocó un trozo de parafilm sobre la mesa, se tomaron 5 μ L del Marcador de peso molecular de 10 kpb y para las muestras se tomaron 2 μ L de RNA y 2 μ L de colorante azul. Una vez que las muestras se cargaron, se conectaron los electrodos de la fuente de alimentación y se calibró a 70 V, se dejó correr aproximadamente 40 min. Una vez terminado el tiempo de corrida, el gel se observó con un transiluminador.

6.5 Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Para obtener el DNA complementario (cDNA) se utilizó el paquete “SCRIPT cDNA Synthesis Kit” de Jena Bioscience, según las indicaciones del fabricante. En microtubos para PCR se colocaron distintos compuestos hasta obtener 20 μ L totales: Agua libre de RNAsas (μ L variables), la muestra de RNA (aproximadamente 1000 ng de cada muestra), 0.5 μ L de primers random (hexámeros que delimitan secuencias aleatoriamente), 4 μ L de SCRIPT RT Buffer Complete, 1 μ L de dNTP Mix (desoxirribonucleótidos para formar el DNA), 1 μ L de DTT Stock Solution, 1 μ L del inhibidor de RNAsa y finalmente 1 μ L de la enzima SCRIPT Reverse Transcriptase que lleva a cabo la reacción de pasar el RNA a DNA, todas las sustancias necesarias se colocaron en hielo para evitar degradación.

Los tubos se taparon y se colocaron en el termociclador, se incubaron a 42°C durante 10 minutos para activar la enzima, a 50°C durante una hora para la síntesis de cDNA y finalmente a 70°C durante 10 minutos para inactivar la enzima.

El cDNA obtenido se cuantificó por duplicado utilizando el espectrofotómetro Nanodrop 1000 de Thermofisher Scientific y se utilizó agua inyectable como blanco. Una vez cuantificado, se realizaron diluciones 1:9 de cDNA (1 µL de cDNA con 9 µL de agua libre de nucleasas) que fueron cuantificadas para utilizarlas en qRT-PCR.

6.6 Diseño de Primers

Los primers fueron diseñados utilizando el programa Primer Blast (NCBI) y sintetizados posteriormente por T4Oligo (Guanajuato, México) (Tabla 5, Figura 19, 20).

Tabla 5. Secuencias de los primers utilizados

Primer con orientación		Secuencia
SOX2-OT	Forward	GCTCGTGGCTTAGGAGATTG
	Reverse	CTGGCAAAGCATGAGGAAGT
BCYRN1	Forward	CTGGGCAATATAGCGAGAC
	Reverse	TGCTTTGAGGGAAGTTACG
SOX2	Forward	CCATCCACACTCACGCAAAA
	Reverse	TATACAAGGTCCATTCCCCCG
B-Actina	Forward	TTAGTGCTGCTGCGATTCA
	Reverse	TGACAAACACCGGCTTTAGC

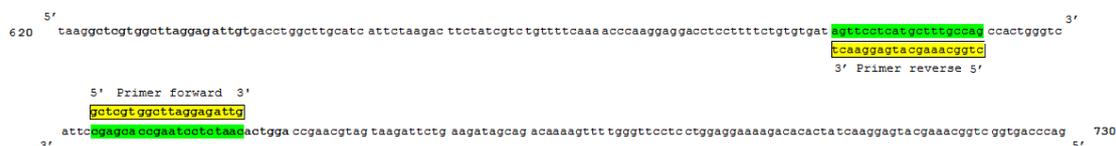


Figura 19. Secuencia de SOX2-OT y sus sitios de unión a los primers. Se observa la secuencia de SOX2-OT desde la base 620 a la 730 en orientación 5'-3', los primers (amarillo) se unen a sus bases complementarias en la cadena opuesta (verde), dando como resultado un producto de ~120 pb. [Secuencia tomada y modificada de (60)].

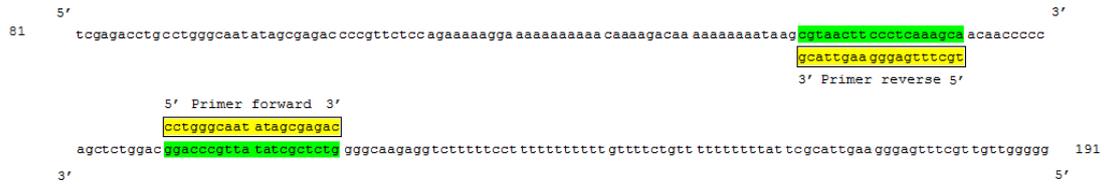


Figura 20. Secuencia de BCYRN1 y sus sitios de unión a los primers. Se observa la secuencia de *BCYRN1* desde la base 81 a la 191 en orientación 5'-3', los primers (amarillo) se unen a sus bases complementarias en la cadena opuesta (verde), dando como resultado un producto de ~100 pb. [Secuencia tomada y modificada de (61)].

6.7 Realización de qRT-PCR utilizando el cDNA obtenido para amplificar los diferentes lncRNAs a estudiar (*SOX2-OT* y *BCYRN1*), el gen *SOX2* y el gen constitutivo *B-Actina*

Para las reacciones de qRT-PCR se utilizó el Kit Real Q Plus 2x Master Mix Green, High Rox de Ampliqon. Las reacciones se realizaron por duplicado en microtubos para PCR, se colocaron 10 μ L de Master Mix, 1 μ L de primer Forward (*SOX2-OT*, *BCYRN1*), 1 μ L de primer Reverse (*SOX2-OT*, *BCYRN1*), 100 ng de la dilución de cDNA (μ L variables) y agua libre de nucleasas (μ L variables) para un total de 25 μ L. Simultáneamente, se amplificó un gen constitutivo, en este caso *B-Actina* en las mismas muestras. Se decidió probar el gen *SOX2* debido a que este gen se transcribe en la misma región que el lncRNA *SOX2-OT*. Los tubos se taparon y se colocaron en el termociclador Step One Plus de Applied Biosystems, que se calibró a 95°C durante 15 minutos, después a 95°C durante 30 segundos para desnaturalizar el cDNA y la temperatura para el alineamiento de los primers fue variable dependiendo del lncRNA, *SOX2* o *B-Actina*, durante 40 ciclos (Tabla 6).

Tabla 6. Temperatura de alineamiento de los primers utilizados

Primer (lncRNA o RNA)	Temperatura (°C)
SOX2-OT	64.5°C
BCYRN1	60.65°C
SOX2	66.2°C
B-Actina	64.1°C

6.8 Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por qRT-PCR

Con el fin de observar los productos de PCR, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 2%. Para el gel, se pesaron 0.6 g de agarosa en la balanza granataria y se diluyó en 30 mL de buffer TBE 1X en un matraz Erlenmeyer de 100 mL. La mezcla se calentó a intervalos regulares en un horno de microondas cuidando que la mezcla no burbujeara. Se dejó de calentar hasta que la mezcla se tornó transparente y se dejó enfriar a temperatura ambiente unos minutos. La mezcla de agarosa se vació en la cámara de electroforesis, se colocó el peine y se dejó gelificar durante una hora.

Cuando el gel estuvo listo, las muestras se prepararon para cargarlas: se colocó un trozo de parafilm sobre la mesa, se tomaron 5 μ L del marcador de peso molecular de 10 kpb al que se le agregaron 3 de SYBR Green, para las muestras se tomaron 2 μ L de RNA, 2 μ L de colorante azul y 1 μ L de SYBR Green. Una vez que las muestras se cargaron, se conectaron los electrodos de la fuente de alimentación y se calibró a 90 V, se dejó correr aproximadamente 40 min. Una vez terminado el tiempo de corrida, el gel se observó con un transiluminador.

6.9 Cálculo de la doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) para conocer las diferencias en los patrones de expresión de los lncRNAs en tumores gliales y en tejidos control

Se realizó el cálculo de la expresión diferencial de los lncRNA utilizando el método de Livak - Schmittgen (62). Los datos utilizados fueron el promedio de los valores de Ct (ciclo umbral) obtenidos en las reacciones de qRT-PCR con los lncRNAs o con *SOX2* y con el gen *B-Actina* que se utilizó como control, los valores de Ct se compararon entre las muestras control y las muestras tumorales. A partir de los datos de la $2^{-\Delta\Delta Ct}$, se realizó el análisis estadístico utilizando el software GraphPad Prism 7. Se utilizó un análisis de T de Student para comparar cada una de las muestras con el control, así como cada uno de los grados histológicos contra el grupo control. Los datos se consideraron estadísticamente significativos si presentaban un valor de *P* menor a 0.05.

VII. Resultados

En este trabajo se analizaron los patrones de expresión de los lncRNAs *SOX2-OT* y *BCYRN1* en astrocitomas pediátricos de los cuatro grados histológicos y tejidos control por medio de PCR cuantitativa por transcriptasa reversa (qRT-PCR) y el cálculo de la doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) por el método de Livak-Schmittgen.

Para lograrlo, primero se extrajo el RNA total de cada una de las muestras por medio del método de Trizol. El RNA obtenido se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop 1000 (ThermoFisher Scientific) y posteriormente se corrió en un gel de agarosa al 1.5% para observar la integridad del mismo. El gel de agarosa mostró que la mayoría de las muestras presentan íntegras las subunidades 28S y 18S del ribosoma, así como secuencias de RNAs pequeños al final de cada carril. Debido a que la integridad en algunas de las muestras presentó degradaciones, se pudo realizar la qRT-PCR.

7.1 Cuantificación de RNA total

Tabla 7. Cuantificación del RNA total obtenido.

Se observan los promedios de cada una de las muestras, analizadas por duplicado.

Muestra	Promedio de RNA (ng/ μ L)
Control I	254.35
Control II	3333.3
Control III	409.005
AstP I	203.05
AstP II	1359.7
AstP III	593.3
AstD I	172.25
AstD II	108.9
AstD III	232
AstD IV	453
AstD V	490
AstD VI	345
AstA I	299
AstA II	63.3
GBM I	46.3
GBM II	471.8
GBM III	312

7.2 Electroforesis de RNA en gel de agarosa

Se realizó con el fin de observar la integridad del RNA total de cada una de las muestras y controles. El experimento mostró que el RNA total se encuentra un poco degradado, observando las subunidades del ribosoma 28S y 18S en cinco muestras, los RNAs pequeños se observan en todas las muestras utilizadas (Figura 21).

La cantidad de muestra que se utilizó en este experimento fue por convención, ya que de cada tejido se obtuvo una concentración diferente de RNA y al tratar de homogeneizar las cantidades se obtenía un volumen muy grande o muy pequeño para ser sometido a este experimento.

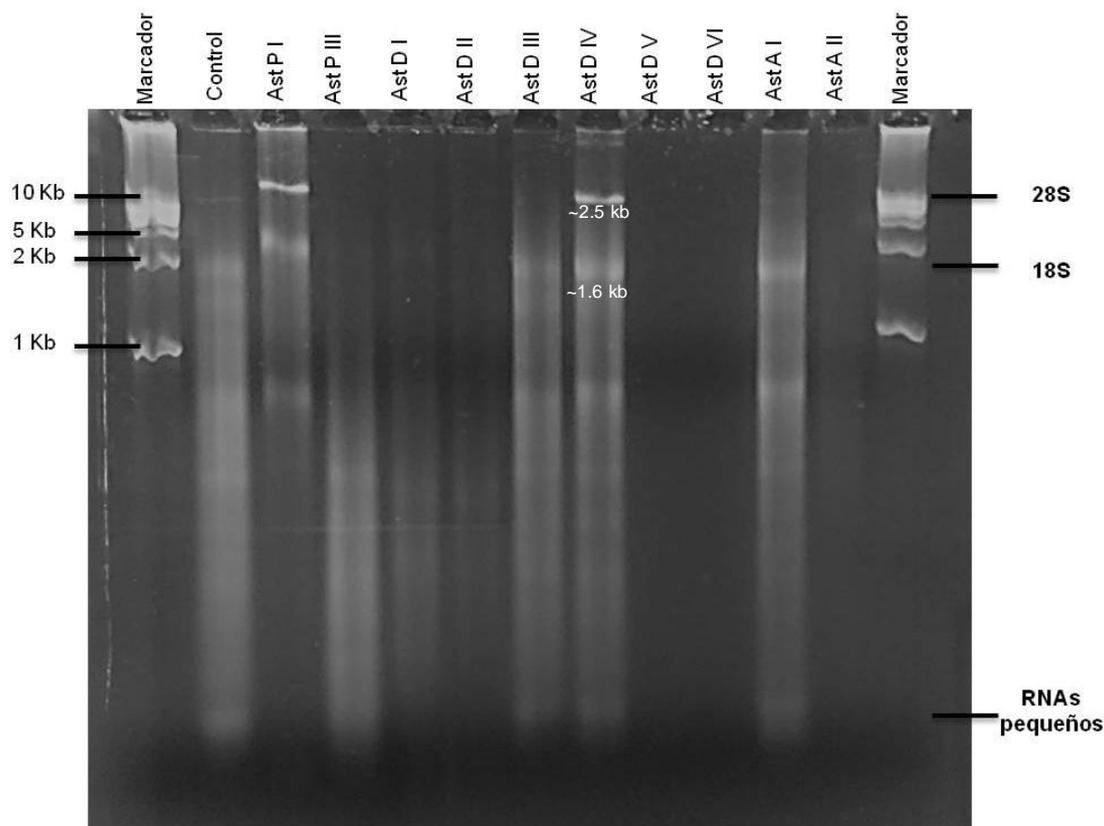


Figura 21. Electroforesis de RNA total en gel de agarosa al 1.5%. Carriles laterales: Marcador de peso molecular de 10 kpb, 5 μ L; carriles centrales: 2 μ L de cada una de las muestras tumorales + 2 μ L de buffer de carga. El gel contenía 2 μ L del colorante EpiQuik DNA Stain. Se puede observar la subunidad mayor del ribosoma (28S, ~2.5 kb), la subunidad menor del ribosoma (18S, ~1.6 kb) y RNAs pequeños (miRNAs, Lnc-RNAs, etc) menores a 1 kb. En los carriles AstP III, AstD I y II se observa degradación parcial del RNA y los carriles AstD V, VI y AstA II presentan una concentración muy baja de RNA.

A partir del RNA total, se sintetizó DNA complementario con el kit “SCRIPT cDNA Synthesis Kit” (Jena Bioscience), se cuantificó utilizando el equipo NanoDrop 1000 (Thermofisher Scientific) para conocer la concentración de cada muestra, a partir de las cuales se realizaron diluciones de 1 μ L de muestra con 9 μ L de agua libre de nucleasas con el fin de obtener los μ L necesarios que contuvieran 100 ng de cDNA para cada reacción.

7.3 Síntesis de cDNA a partir de RNA total

Tabla 8. Cuantificación del cDNA obtenido.

Se observan los promedios de cada una de las muestras, analizadas por duplicado.

Muestra	Promedio de cDNA (ng/ μ L)
Control I	617.3
Control II	899.1
Control III	431.79
AstP I	551.53
AstP II	451.95
AstP III	260.3
AstD I	521.2
AstD II	184.7
AstD III	336.2
AstD IV	372.45
AstD V	171.65
AstD VI	186.0
AstA I	339.6
AstA II	200.5
GBM I	458.4
GBM II	218.3
GBM III	254.2

Los datos de Ct (ciclo umbral) obtenidos del termociclador StepOne de cada una de las qRT-PCR realizadas se utilizaron para calcular la expresión diferencial de los lncRNAs en cada una de las muestras tumorales contra tejidos control utilizando el método de Livak de la doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$).

Para esto se realizaron los promedios por experimento de los Ct obtenidos de cada muestra tumoral y muestras control con *SOX2-OT*, *BCYRN1* o *SOX2* y *B-Actina*, estos se utilizaron con los algoritmos correspondientes y se obtuvo el valor de $2^{-\Delta\Delta Ct}$.

Los datos obtenidos de cada muestra fueron analizados con un análisis de T de Student para comparar cada una de las muestras con el control.

7.4 Estandarización de las condiciones de amplificación por qRT-PCR

Tabla 9. Resultados de la qRT-PCR con SOX2-OT en tejidos control y muestras tumorales, promedios por experimento e histología

Muestra	Promedio de Ct (Exp 1 y 2)	Promedio por histología
Control I	27.888	27.4813
Control II	28.4	
Control III	26.156	
AstP I	25.70125	28.841
AstP II	30.7225	
AstP III	29.8245	
AstD I	28.7785	28.07942
AstD II	26.6875	
AstD III	27.6845	
AstD IV	28.327	
AstD V	25.0655	
AstD VI	31.9335	
AstA I	26.731	28.65813
AstA II	30.5853	
GBM I	36.0465	32.40875
GBM II	32.9175	
GBM III	28.26225	

Tabla 10. Resultados de la qRT-PCR con B-Actina en tejidos control, promedios por experimento e histología

Muestra	Promedio de Ct (Exp 1 y 2)	Promedio por histología
Control I	31.435	32.1213
Control II	30.940	
Control III	33.989	

Tabla 11. Resultados de la qRT-PCR con SOX2 en tejidos control y muestras tumorales, promedios por experimento e histología

Muestra	Promedio de Ct (Exp 1 y 2)	Promedio por histología
Control I	30.31	29.7233
Control II	29.829	
Control III	29.031	
AstP I	23.649	25.59716
AstP II	20.415	
AstP III	32.7275	
AstD I	21.0825	27.4077
AstD III	33.978	
AstD IV	34.278	
AstD V	24.225	
AstD VI	23.475	
AstA I	31.413	
AstA II	24.93	28.1715
GBM I	23.79	
GBM II	27.8955	26.7565
GBM III	28.584	

Tabla 12. Resultados de la qRT-PCR con BCYRN1 en tejidos control y muestras tumorales, promedios por experimento e histología

Muestra	Promedio de Ct (Exp 1 y 2)	Promedio por histología
Control I	28.73	28.52
Control III	28.31	
AstP I	20.65	21.7158
AstP II	22.805	
AstP III	21.59	
AstD I	21.1875	24.1495
AstD III	26.7525	
AstD IV	20.9675	
AstD V	31.015	
AstD VI	20.825	
AstA I	25.98	23.6862
AstA II	21.3925	
GBM I	28.1475	25.2525
GBM II	26.0075	
GBM III	21.6025	

7.5 Gráficas de amplificación de SOX2-OT

En la Figura 22 se ilustran los resultados de una reacción de qRT-PCR para obtener el amplicón del lncRNA SOX2-OT. En cada una de las muestras SOX2-OT amplificó de manera diferente, en la Figura 22A se observa que el lncRNA amplificó antes que el Control y en la Figura 22B se observa que amplificó después. Esto se debe a la cantidad de cDNA molde que se encuentra en cada una de las muestras y la fluorescencia que emite para ser identificado por el termociclador.

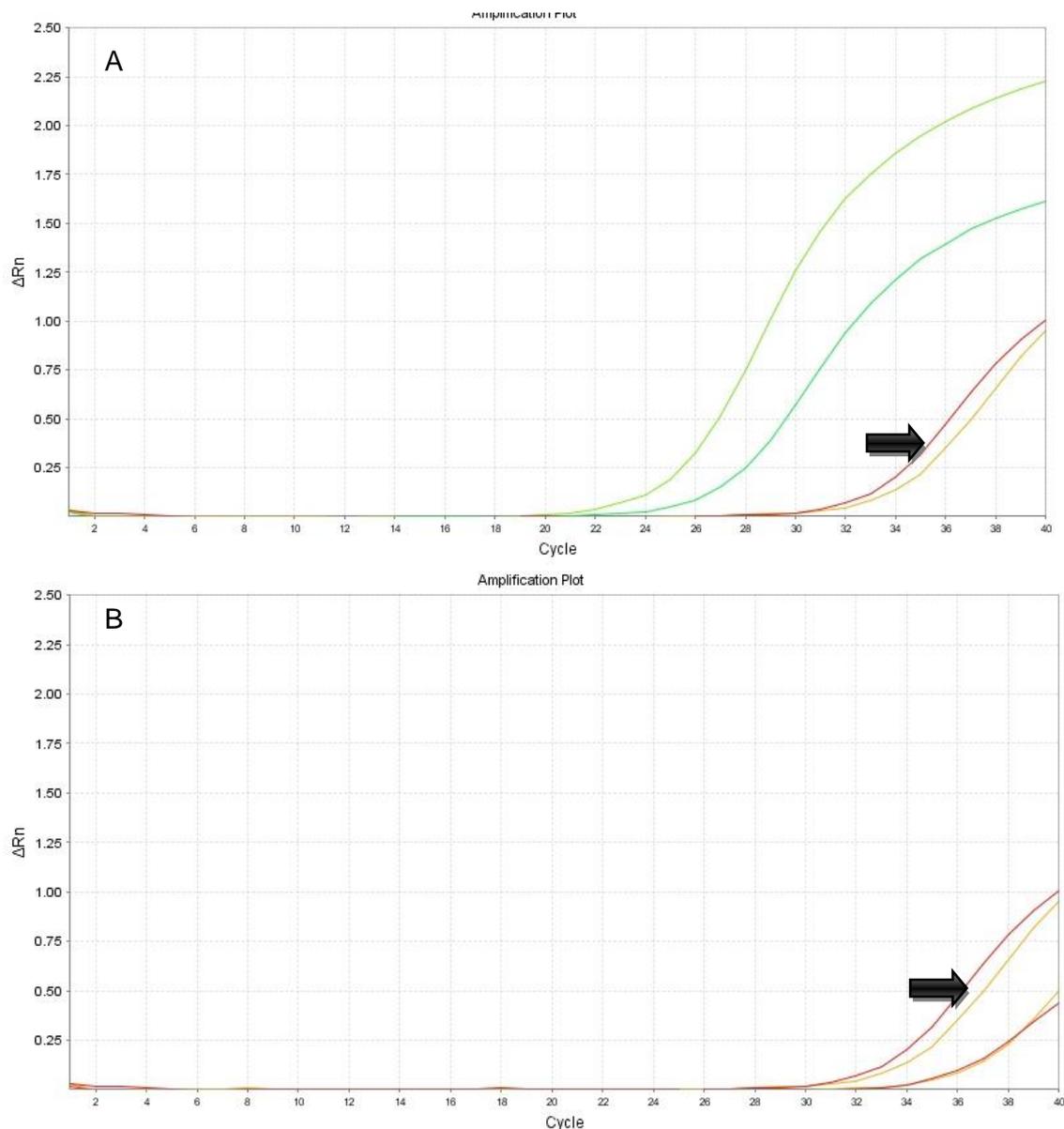


Figura 22. Gráficas de amplificación de SOX2-OT. A) AstP 1, 25.0075. B) GBM 1, 36.123. Se puede observar que algunas muestras amplifican antes que otras, el tejido Control se indica con una flecha negra. Eje Y = Cambio en la fluorescencia. Eje X = Ciclo de reacción.

La curva de disociación se utilizó para asegurarse de que el amplicón obtenido fue del lncRNA de interés (Figura 23). Se pudo suponer que la reacción ocurrió de manera correcta ya que solo se observó un pico en la temperatura de 79.62-79.77°C en cada una de las muestras analizadas. Después de la reacción de qRT-PCR se realizó una electroforesis para comprobar que se obtuvo el amplicón de 150 pb.

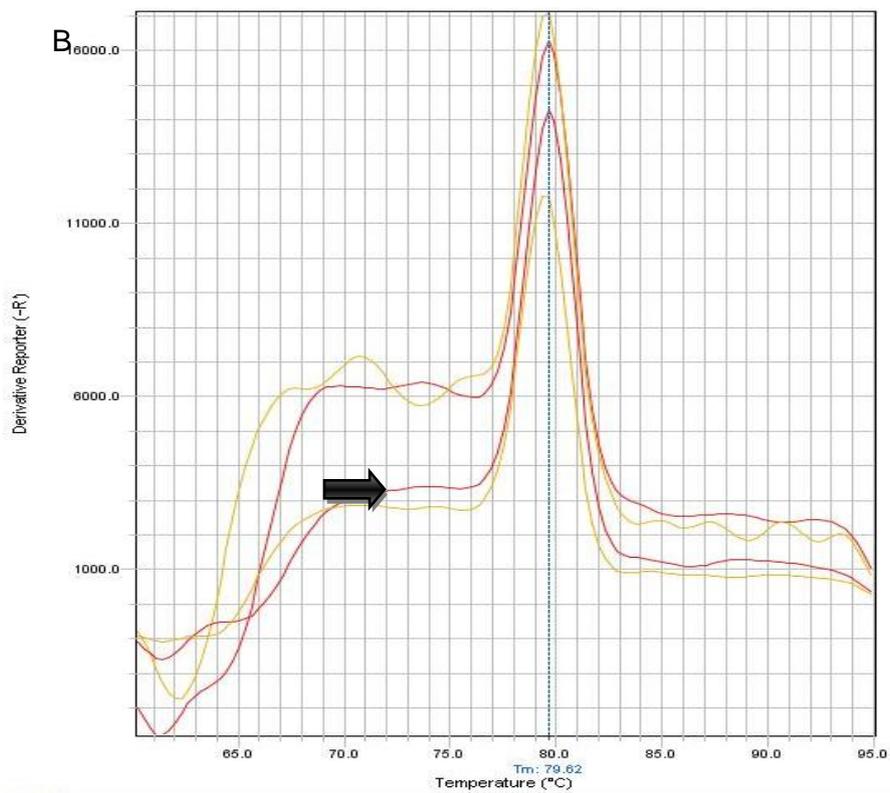
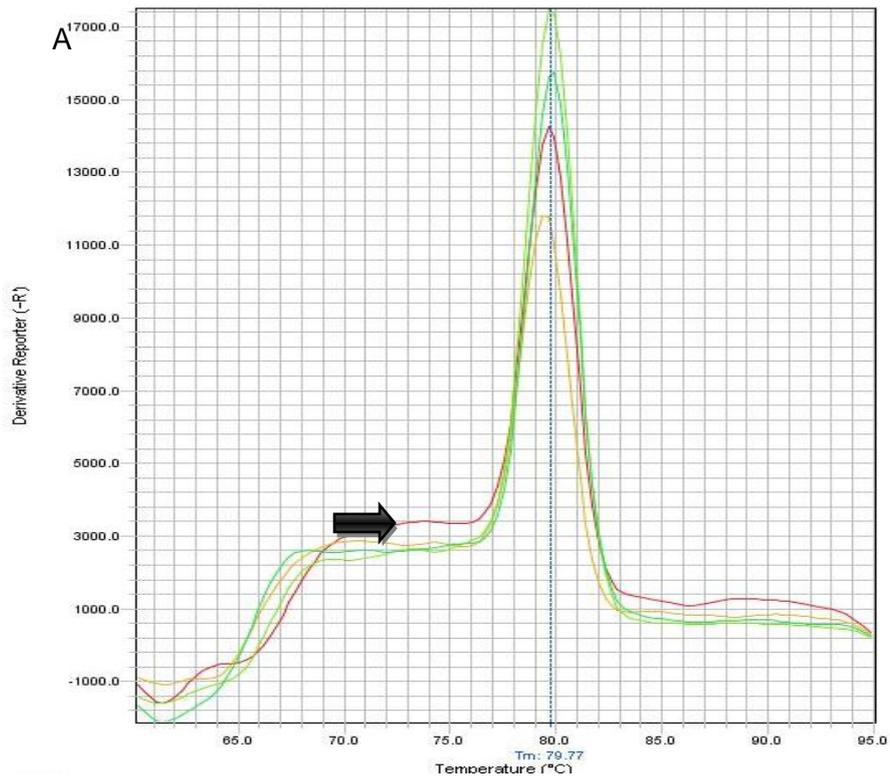


Figura 23. Gráficas de la curva melt o curva de disociación de SOX2-OT. A) Control I. B) GBM I. La gráfica muestra la especificidad de los primers en $T_m = 79.62-79.77^\circ\text{C}$ al presentarse solo un pico. El tejido control se indica con una flecha negra. Eje Y = Cambio en la fluorescencia. Eje X = Temperatura melting o temperatura de disociación.

7.6 Gráficas de amplificación de SOX2

Debido a que SOX2-OT se encuentra sobrelapado en la misma región con el gen SOX, se decidió medir su expresión en las muestras control y las muestras tumorales. En la Figura 24 se ilustran los resultados de una reacción de qRT-PCR para obtener el amplicón de SOX2. Cada una de las muestras de los distintos grados histológicos amplificó de manera diferente este gen, en la Figura 24B se observa la amplificación de SOX2 después que el control, en el caso de las muestras restantes, el gen amplificó antes en estas que en el control.

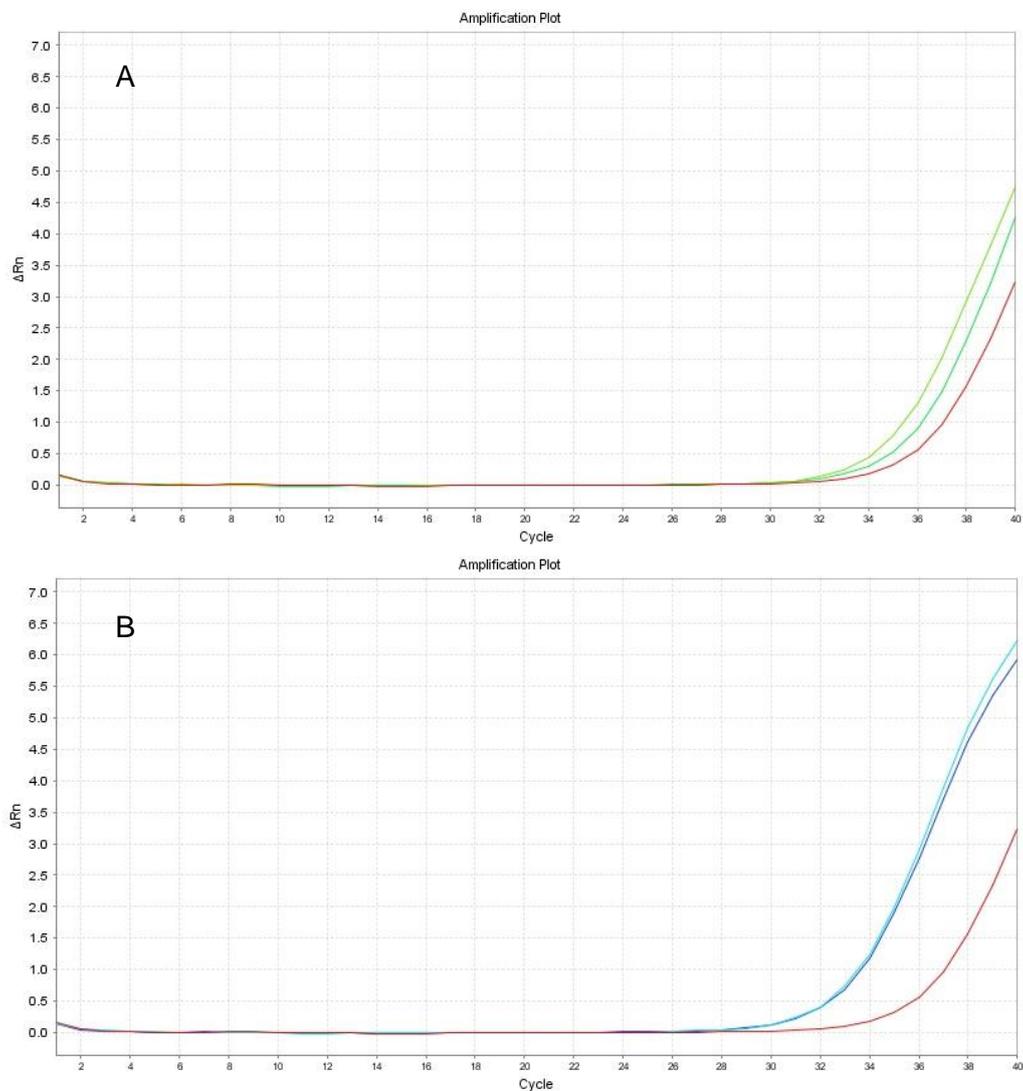


Figura 24. Gráficas de amplificación de SOX2. A) AstP III, 32.676. B) GBM I, 23.81. Se puede observar que algunas muestras amplifican antes que otras, el tejido Control se indica en color rojo. Eje Y = Cambio en la fluorescencia. Eje X = Ciclo de reacción.

De igual manera, para SOX2 se utilizó la curva de disociación para saber si se obtuvo el amplicón deseado (Figura 25), al observarse solo un pico en la temperatura de 89.88°C se supuso que la reacción ocurrió de manera correcta, posteriormente se realizó una electroforesis para comprobar que el amplicón obtenido fuera de ~550 pb.

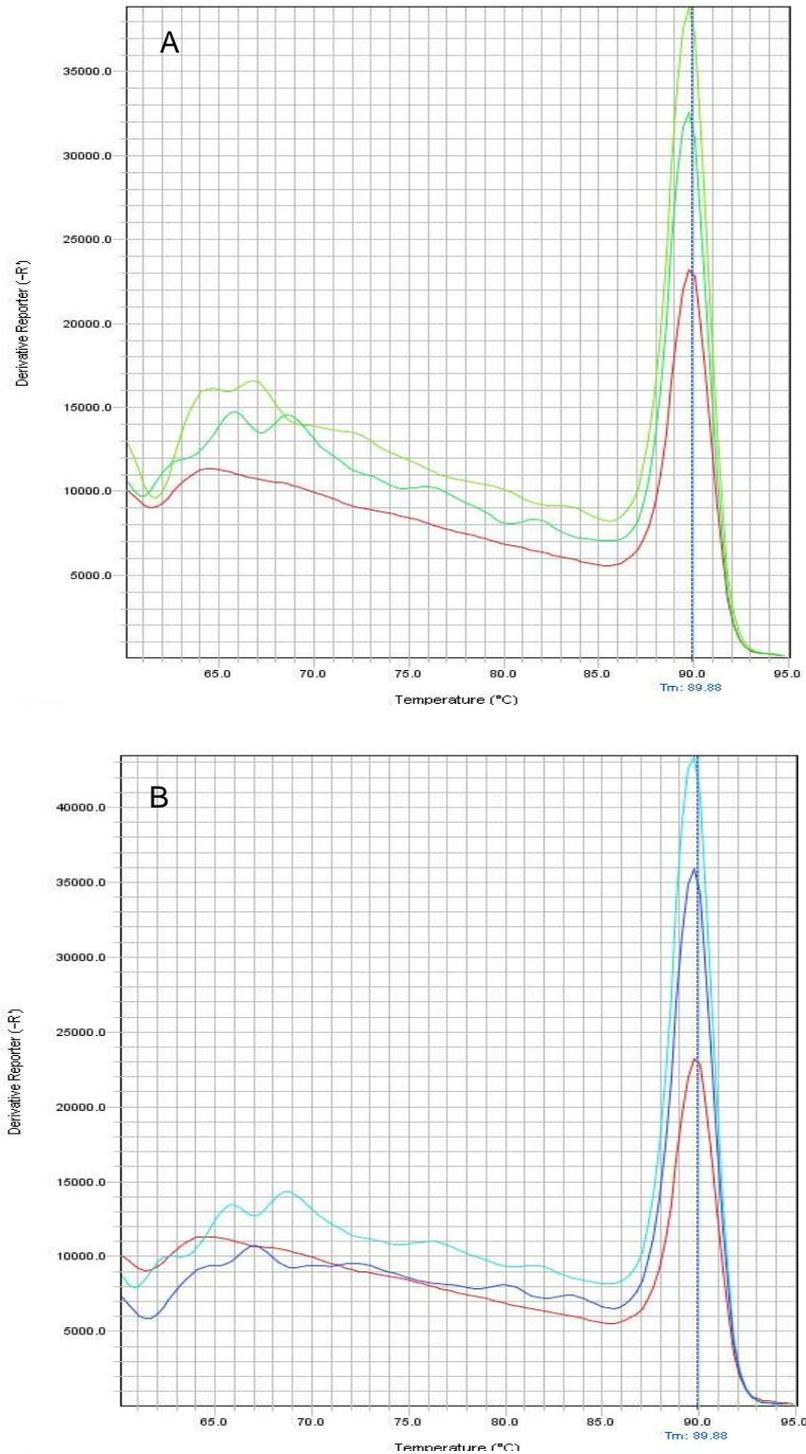


Figura 25. Gráficas de la curva melt o curva de disociación de SOX2. A) AstP III. B) GBM I. La gráfica muestra la especificidad de los primers en $T_m = 89.88^\circ\text{C}$ al presentarse solo un pico. El tejido control se indica en color rojo. Eje Y = Cambio en la fluorescencia. Eje X = Temperatura melting o temperatura de disociación.

7.7 Gráficas de amplificación de BCYRN1

Se ilustran los resultados de una reacción de qRT-PCR para obtener el amplicón del RNA largo no codificante BCYRN1. Se puede observar en la Figura 26 que en cada una de las muestras de los distintos grados histológicos el lncRNA amplificó de manera diferente, en la Figura 26A BCYRN1 amplificó después que el control y en el resto de las muestras amplificó antes, ejemplificado con la Figura 26B. Esto se debe a la cantidad de RNA molde presente en cada una de las muestras utilizadas.

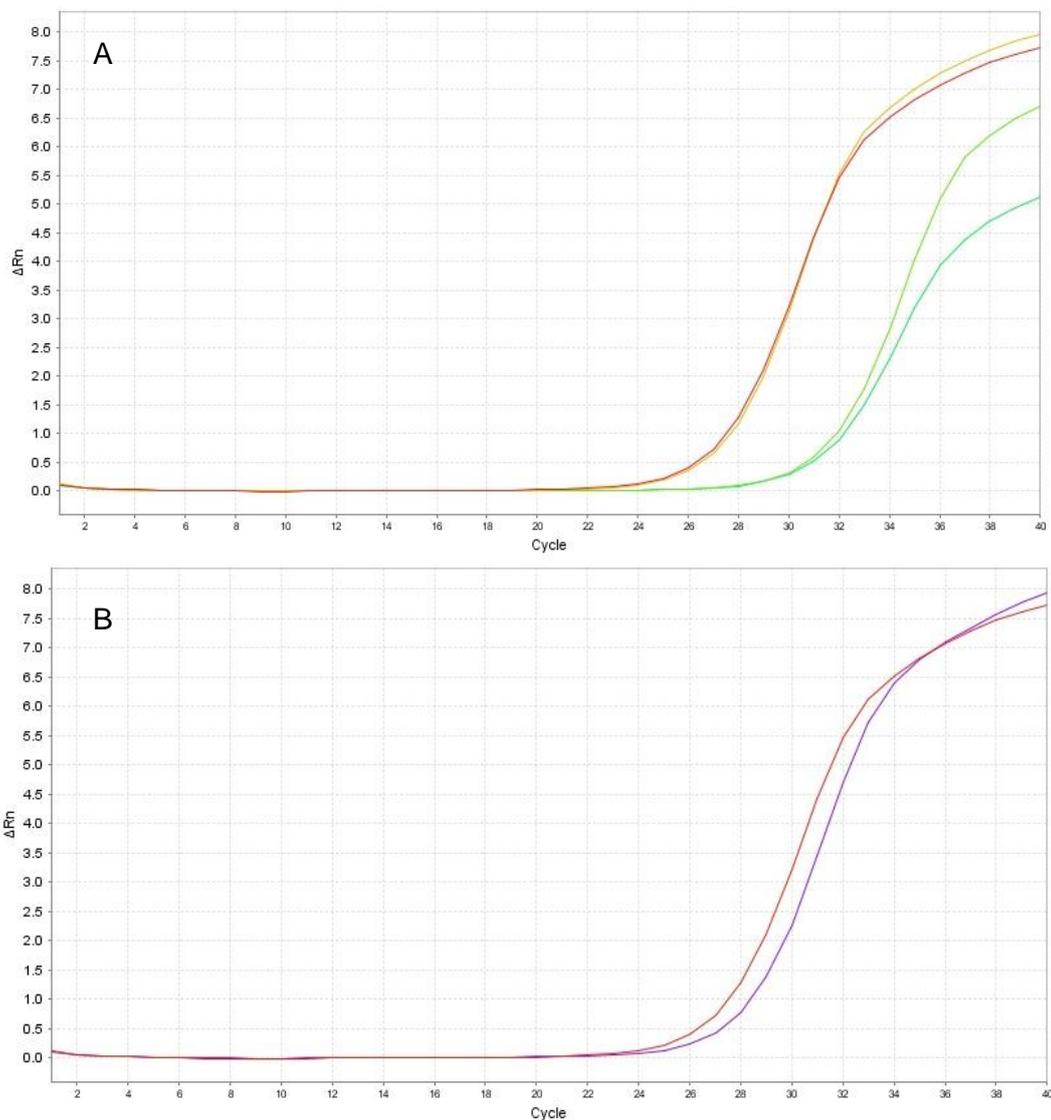


Figura 26. Gráficas de amplificación de BCYRN1. A) AstP III, 21.795. B) GBM III, 21.495. Se puede observar que algunas muestras amplifican antes que otras, el tejido Control se indica en color rojo. Eje Y = Cambio en la fluorescencia. Eje X = Ciclo de reacción.

La curva de disociación fue utilizada para observar la especificidad de la reacción, al observarse solo un pico en la temperatura 75.87°C se pudo suponer que se obtuvo el amplicón correcto (Figura 27). Para comprobar que el amplicón era de ~200 pb se realizó una electroforesis en gel de agarosa.

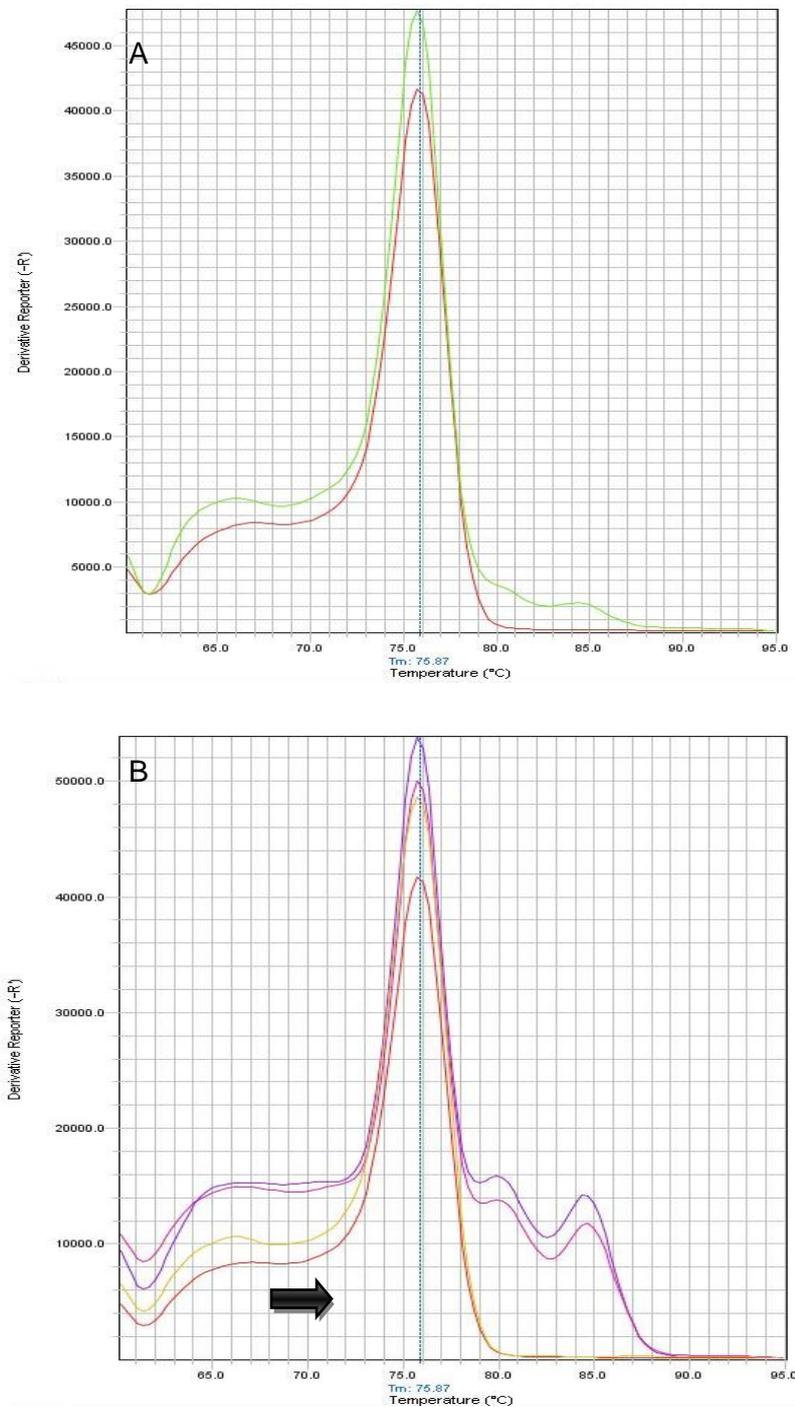


Figura 27. Gráficas de la curva melt o curva de disociación de BCYRN1. A) AstP III. B) GBM III. La gráfica muestra la especificidad de los primers en T_m = 75.87°C al presentarse solo un pico. El tejido Control se indica en color rojo (flecha negra). Eje Y = Cambio en la fluorescencia. Eje X = Temperatura melting o temperatura de disociación.

7.8 Electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos por qRT-PCR

Los geles de agarosa fueron analizados con el método de Rf que consistió en medir la distancia de los pozos a la banda dividiendo esta cantidad entre la distancia total de migración, el resultado fue interpolado con el marcador para conocer el tamaño de cada uno de los fragmentos.

Se puede observar en cada uno de los geles que en las muestras probadas se obtuvo el amplicón deseado, para SOX2-OT de ~150 pb (Figura 28), SOX2 de ~550 pb (Figura 29) y BCYRN1 de ~180 pb (Figura 30). En el caso del gel de SOX2, en el carril 2 se observa la muestra degradada, posiblemente debido al tiempo que permaneció almacenada la muestra.

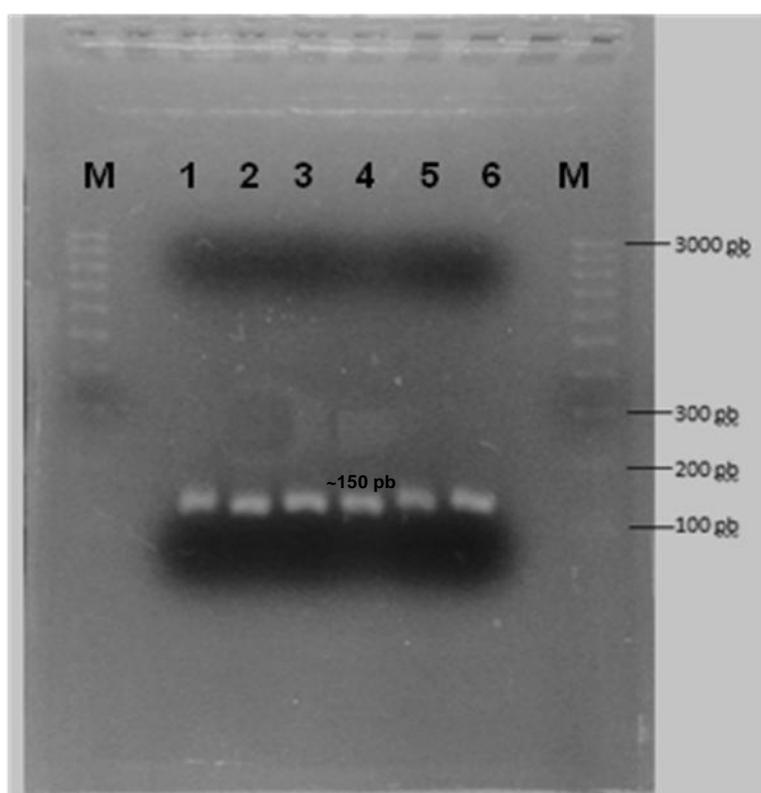


Figura 28. Electroforesis de los productos de SOX2-OT en gel de agarosa al 2%. Se observan algunas muestras y controles. Carriles laterales, M: Marcador de peso molecular de 1000 pb, 5 μ L + 3 μ L de SYBR Gold; carriles centrales: 2 μ L de cada una de las muestras tumorales + 1 μ L de colorante azul + 3 μ L de SYBR Gold. 1 = Control I, 2 = AstP I, 3 = AstD I, 4 = Control II, 5 = GBM I y 6 = AstP II. Solo se observa una banda de ~150 pb, el producto esperado.

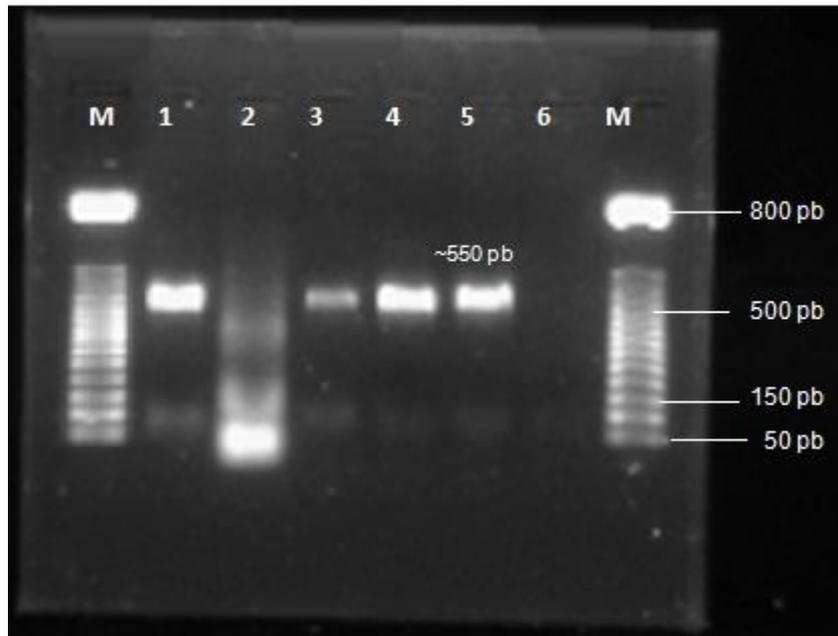


Figura 29. Electroforesis de los productos de SOX2 en gel de agarosa al 2%. Se observan algunas muestras y controles. Carriles laterales: Marcador de peso molecular de 50 - 800 pb, 5 μ L + 1 μ L de SYBR Gold; carriles centrales: 2 μ L de cada una de las muestras tumorales + 2 μ L de colorante azul + 1 μ L de SYBR Gold. M = Marcador, 1 = Controles, 2 = AstP I, 3 = AstP III, 4 = AstD III, 5 = AstD IV. Solo se observa una banda de ~550 pb.

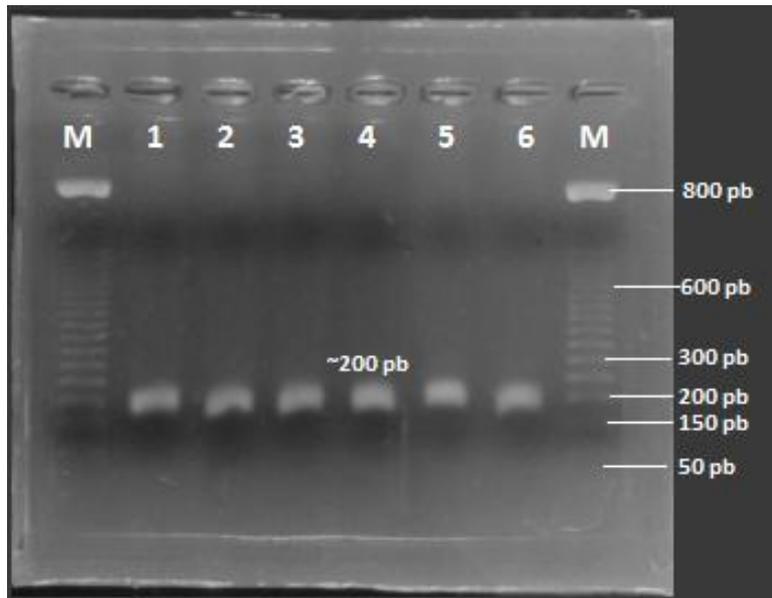


Figura 30. Electroforesis de los productos de BCYRN1 en gel de agarosa al 2%. Se observan algunas de las muestras y controles. Carriles laterales: Marcador de peso molecular de 50 - 800 pb, 5 μ L + 1 μ L de SYBR Gold; carriles centrales: 2 μ L de cada una de las muestras tumorales + 2 μ L de colorante azul + 1 μ L de SYBR Gold. M = Marcador, 1 = Control III, 2 = AstP I, 3 = AstD I, 4 = AstD II, 5 = AstA I, 6 = GBM I. Solo se observa una banda de ~180 pb.

7.9 Análisis de la expresión relativa de SOX2-OT, SOX2 y BCYRN1

Se utilizó el método de Livak - Schmittgen para conocer las diferencias relativas en los patrones de expresión de los lncRNAs en tumores gliales y en tejidos control.

Los cálculos mostraron que la expresión de *SOX2-OT* es heterogénea en cada una de las muestras y en los grados histológicos en general. El análisis estadístico de todas las muestras con T de Student se consideró significativo si los datos presentaban un valor de *P* menor a 0.05, los resultados mostraron cambios significativos entre el Control y las muestras AstP II, AstD VI, AstA I, GBM I y GBM II con un valor de *P* de 0.0009, 0.0114, 0.0279, <0.0001 y 0.0011 respectivamente (Figura 31). Cabe mencionar que las muestras AstP I y AstD II presentan una mayor expresión de *SOX2-OT* respecto al control, sin embargo no mostraron cambios estadísticamente significativos.

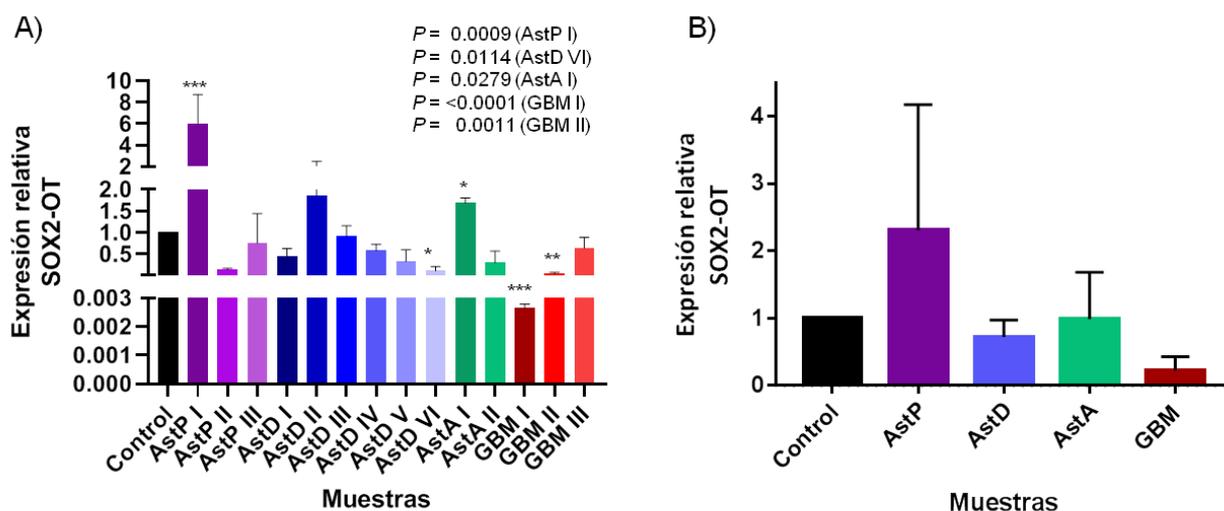


Figura 31. Gráficas de la expresión relativa del lncRNA SOX2-OT en astrocitomas vs controles.

A) Comparación de la expresión de SOX2-OT en todas las muestras de astrocitoma de distinto grado histológico con el control. Se observa la expresión heterogénea de SOX2-OT en todas las muestras.

B) Comparación global de la expresión de SOX2-OT en astrocitomas vs controles. Se observa que SOX2-OT se encuentra sobreexpresado en astrocitoma pilocítico (AstP) respecto al control y los grados histológicos más altos, esto debido a la muestra AstP I que eleva la expresión global. Los datos se analizaron con una prueba de T de Student y se consideraron estadísticamente significativos si presentaban un valor de *P* menor a 0.05. (Ver Anexo 1)

En el caso del gen SOX2, su expresión es heterogénea entre el tejido control y en los grados histológicos. Se realizó un análisis de T de Student para comparar cada una de las muestras con el control y se consideró estadísticamente significativo si los datos presentaban un valor de P menor a 0.05. Se encontraron cambios estadísticamente significativos entre el Control y las muestras AstP I, AstP II, AstP III, AstD I, AstD III, AstD IV, AstD V, AstA II, GBM I y GBM III con los valores de P de 0.0450, <0.0001, <0.0001, <0.0001, <0.0001, 0.0030, 0.0075, 0.0003, 0.0179, 0.0002 y 0.0250 respectivamente.

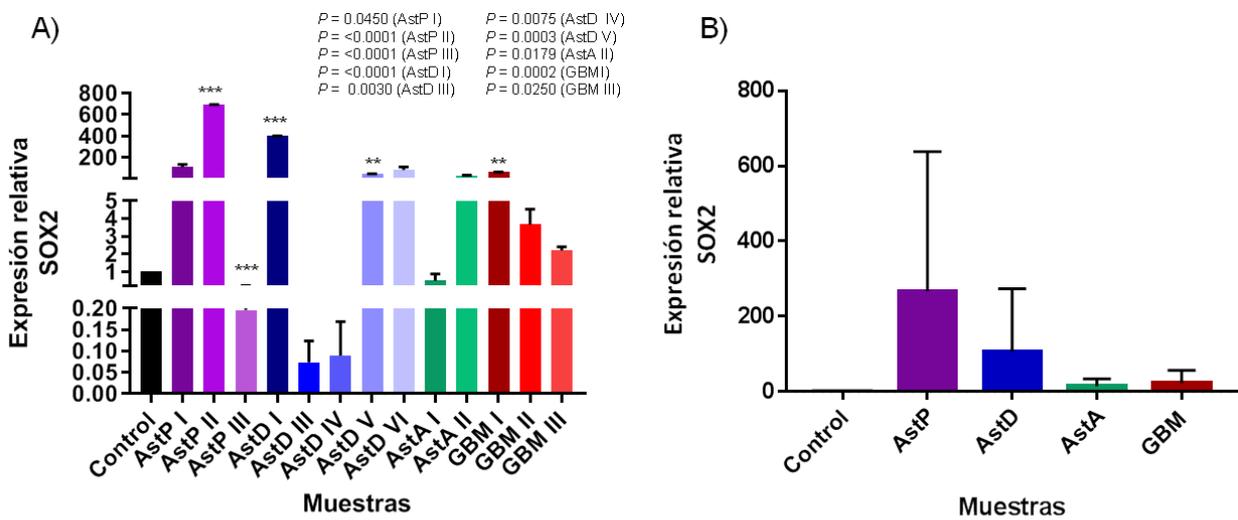


Figura 32. Gráfica de la expresión relativa del mRNA SOX2 en astrocitomas vs controles. A) Comparación de la expresión de SOX2 en todas las muestras de astrocitoma de distinto grado histológico con el control. Se observa la expresión heterogénea de SOX2 en todas las muestras. Las muestras Ast P II y AstD se encuentran mas sobreexpresadas que el resto. **B)** Comparación global de la expresión de SOX2 en astrocitomas vs controles. Se observa que SOX2 se encuentra sobreexpresado en astrocitoma pilocítico (AstP) respecto al control y los grados histológicos más altos, esto debido a la muestra AstP II que eleva la expresión global. Los datos se analizaron con una prueba de T de Student y se consideraron estadísticamente significativos si presentaban un valor de de P menor a 0.05. (Ver Anexo 2)

La expresión de *BCYRN1* es heterogénea en cada una de las muestras y en los grados histológicos en general. El análisis estadístico T de Student mostró cambios significativos entre el Control y nueve de las muestras: AstP I, AstP III, AstD I, AstD V, AstD VI, AstA I, AstA II y GBM II, GBM III, con un valor de P de 0.046, 0.0051, 0.0019, 0.0091, 0.0039, 0.0493, 0.0033, 0.0073 y 0.0056 respectivamente. En la grafica global se observa que la expresión de *BCYRN1* disminuye según aumenta el grado histológico (Figura 33).

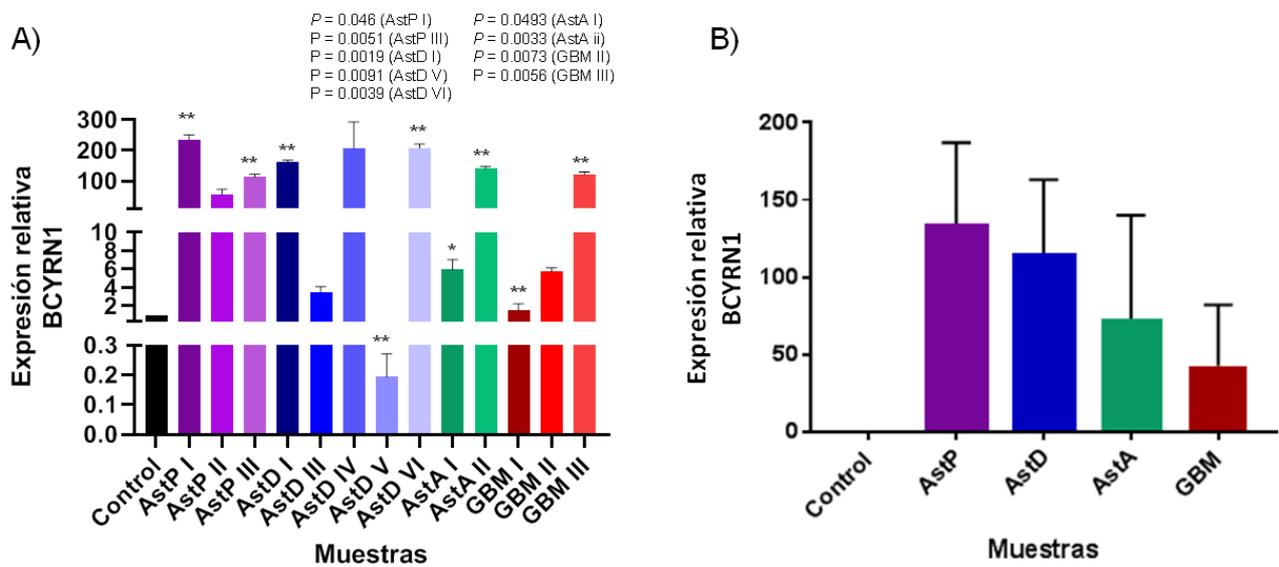


Figura 33. Gráficas de la expresión relativa del IncRNA BCYRN1 en astrocitomas vs controles.

A) Comparación de la expresión de BCYRN1 en todas las muestras de astrocitoma de distinto grado histológico con el control. Se observa la expresión heterogénea de BCYRN1 en todas las muestras.

B) Comparación global de la expresión de BCYRN1 en astrocitomas vs controles. Se observa que BCYRN1 se encuentra sobreexpresado en astrocitoma pilocítico (AstP) respecto al control y los grados histológicos más altos, esto debido a la muestra AstP I que eleva la expresión global. (Ver Anexo 3)

7.10 Análisis de la expresión relativa de SOX2-OT, SOX2 y BCYRN1 por localización tumoral

La expresión de *SOX2-OT*, *SOX2* y *BCYRN1* también se analizó por la localización del tumor en el SNC, cabe mencionar que las muestras solo se ordenaron por su localización y no por su grado histológico. La expresión de *SOX2-OT* es heterogénea en todas las localizaciones en general, encontrándose sobreexpresado en los tumores de tallo cerebral y subexpresado en los tumores supratentoriales (Figura 34).

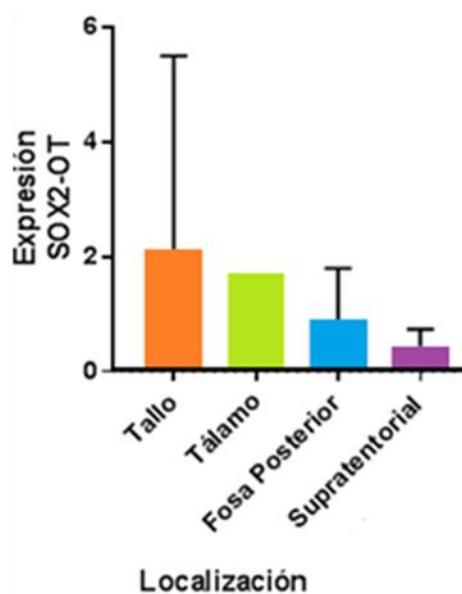


Figura 34. Gráfica de comparación de la expresión relativa del IncRNA SOX2-OT por localización tumoral

En el caso de *SOX2*, la expresión es heterogénea en todos los grupos (Figura 35), se observa sobreexpresión de las muestras de tallo cerebral de la misma manera que *SOX2-OT*, también se observa que *SOX2* en los tumores de tálamo se encuentra subexpresado.

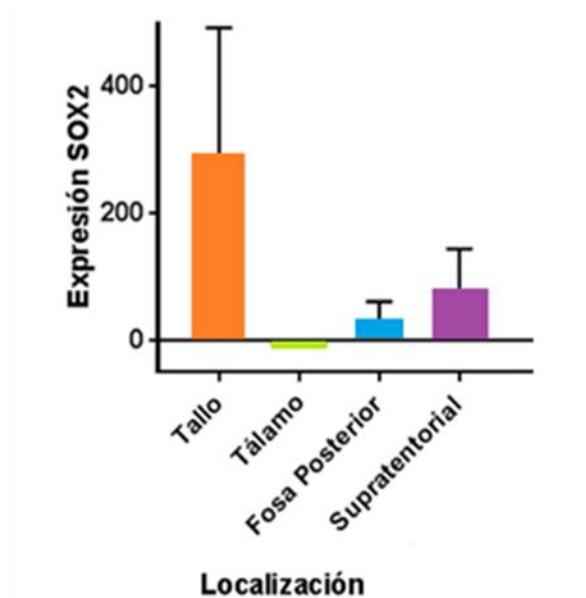


Figura 35. Gráfica de comparación de la expresión relativa del mRNA SOX2 por localización tumoral

Para *BCYRN1*, la expresión es heterogénea en todos los grupos (Figura 36), cabe mencionar que se observa sobreexpresión en los tumores de tallo de la misma manera que *SOX2-OT* y *SOX2*, también cabe mencionar que este lncRNA se encuentra subexpresado en los tumores de tálamo, muy parecido a la expresión de *SOX2*.

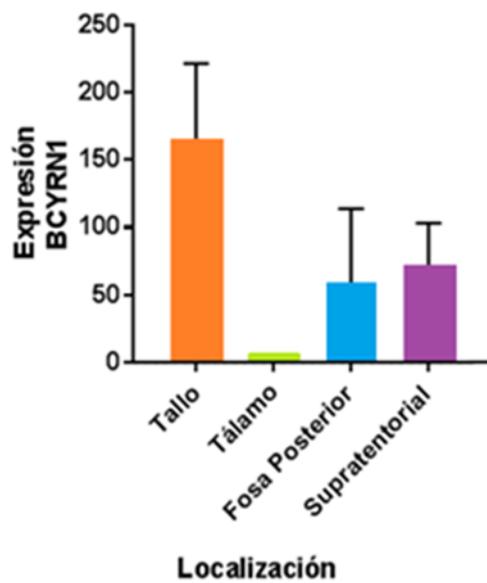


Figura 36. Gráfica de comparación de la expresión relativa del lncRNA BCYRN1 por localización tumoral

VIII. Discusión

Los astrocitomas pediátricos son la tercera causa de muerte infantil por cáncer en México (17,18). A pesar de ser histológicamente muy parecidos a un astrocitoma adulto, estos tumores se comportan molecularmente diferente, presentando distintas mutaciones de genes de histonas (por ejemplo *H3*) o genes involucrados en el crecimiento celular (por ejemplo *BRAF*) (22,23). Debido a que la sobrevida de los pacientes no ha mejorado a pesar de existir una gran cantidad de estudios y fármacos, se ha propuesto analizar la expresión de nuevas moléculas que puedan funcionar como biomarcadores, en este caso los lncRNAs *SOX2-OT* y *BCYRN1*.

SOX2-OT contiene en uno de sus intrones la secuencia del mRNA *SOX2* (localización 3q26.3), que funciona como un factor de transcripción involucrado en el mantenimiento y la auto-renovación de las células madre embrionarias-no diferenciadas y por la misma razón se considera como un marcador de pluripotencia (53). Ya que *SOX2* y *SOX2-OT* están relacionados porque se transcriben a partir de la misma región y la misma orientación, en el presente trabajo se decidió estudiar la expresión de ambos genes, encontrando que su expresión es heterogénea en todos los grados histológicos en general. Se ha observado que *SOX2-OT* y *SOX2* están sobreexpresados en células madre y que su expresión disminuye significativamente cuando comienza la diferenciación celular (53), también *SOX2-OT* se ha encontrado desregulado en distintos tipos de cáncer como carcinoma esofágico de células escamosas, carcinoma pulmonar de células escamosas y cáncer de mama al favorecer la metástasis, proliferación e invasión de las células cancerosas y se ha encontrado involucrado en la tumorigénesis del cáncer de hígado, páncreas, próstata, y estómago (53,63). Zhi Wang et al, 2017 (64) ha propuesto a *SOX2-OT* como posible biomarcador pronóstico para osteosarcoma, ya que al modular a *SOX2* favorece la motilidad y proliferación celular además de que presenta sobreexpresión en los pacientes con la enfermedad más avanzada (64). En el caso de los astrocitomas, se

ha estudiado en una gran cantidad de muestras tumorales y líneas celulares de adultos, encontrando que su expresión juega un rol oncogénico al favorecer la proliferación e invasión de las células, por otro lado se ha encontrado que la alta expresión está relacionado con un buen pronóstico para los pacientes que presentan un astrocitoma de bajo grado y en el caso de los GBM está relacionado con mal pronóstico para el paciente ya que las células presentan motilidad (54). Saghaeian et al (2015) encontró por medio de qRT-PCR nuevas variantes de *SOX2-OT* y al analizar este lncRNA en diferentes líneas celulares de cáncer como adenocarcinoma mamario (línea MCF7), carcinoma hepatocelular (línea HepG2), glioblastoma multiforme (línea U-87MG) y carcinoma embrionario (NT2) se encontró que *SOX2-OT* está asociado con la alta regulación de *SOX2*, presentando una expresión relativa casi idéntica en las muestras (63). En este trabajo se observa que la expresión de *SOX2-OT* es alta en los tumores de bajo grado y que se encuentra subexpresado en los tumores de alto grado, un hecho muy similar a lo reportado en la literatura (54). En este trabajo la expresión relativa de *SOX2-OT* y *SOX2* no es similar, ya que *SOX2* se encuentra altamente expresado en las muestras en comparación con *SOX2-OT*, hecho que no concuerda con los datos reportados en diferentes estudios (63,64), posiblemente se debe a que todos los análisis se han realizado muestras de pacientes adultos cuyo comportamiento molecular es diferente al de los tumores pediátricos (22,39).

BCYRN1 es el lncRNA más corto con 200 nt, cuya secuencia se encuentra entre dos genes codificantes de proteínas: el de la calmodulina 2 (*CALM2*) y el de la molécula de adhesión celular epitelial (*EPCAM*) (58). En tejidos normales, se encuentra sobreexpresado en las dendritas neuronales y en las gónadas, también se ha encontrado en diferentes tipos de cáncer, en enfermedades neurodegenerativas como el Alzheimer y en trastornos genéticos como el síndrome de Perlman y la ataxia espinocerebelosa autosómica recesiva 1 (55,57). En este trabajo la expresión relativa de *BCYRN1* es heterogénea en controles y tumores, mostrándose altamente expresado en los tumores de bajo grado y disminuyendo la expresión conforme

aumenta el grado histológico. *BCYRN1* se ha encontrado altamente expresado en carcinomas de mama, cérvix, esófago, pulmón, ovario y lengua sin ser detectado en tejido normal. Hu y Lu, 2015 reportaron en una línea de cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) que *c-Myc* (gen regulador y protooncogén) se une al promotor de *BCYRN1* e induce su expresión, también observaron que al hacer un knockout de *BCYRN1* la migración e invasión de estas células disminuye debido a la reducción de expresión de las metaloproteinasas de matriz MMP9 y MMP13 que son importantes para la invasión de células y metástasis (65). En líneas celulares de cáncer de mama se ha observado que *BCYRN1* está involucrado en la apoptosis, regulándola de manera negativa y evitando que las células cancerosas entren a muerte celular, también se ha observado que el receptor de estrógenos (ER) se une al promotor de *BCYRN1* regulando su expresión de manera positiva (58). Por otro lado, se ha propuesto a *BCYRN1* como un biomarcador para cáncer, por ejemplo en carcinoma ductal *in situ* se propuso como marcador de progresión ya que su expresión no se detecta en las primeras etapas de la enfermedad pero aumenta de manera gradual cuando el tumor progresa a etapas más avanzadas y a carcinoma invasivo (66). La expresión global de *BCYRN1* en este trabajo no resultó significativa, sin embargo se observa que la expresión decrece conforme aumenta la malignidad del tumor, por lo que podría funcionar como un marcador de progresión en Ast pediátricos. Cabe mencionar que estos datos no concuerdan con lo reportado en la literatura, pero se debe notar que no hay estudios de *BCYRN1* en Ast y que molecularmente los astrocitomas pediátricos son diferentes a los astrocitomas adultos, sin embargo lo ideal es analizar la expresión de este lncRNA en más muestras tumorales para validar esta propuesta de manera correcta.

Para los datos clínicos, se ordenó la expresión de los genes estudiados de acuerdo a la localización del tumor, encontrando que los dos lncRNAs y *SOX2* presentan una alta expresión en los tumores de tallo cerebral, *SOX2* y *BCYRN1* presentan baja expresión en los tumores de tálamo y particularmente *BCYRN1* y

SOX2 presentan una expresión muy parecida en los tumores supratentoriales, sin embargo es arriesgado llegar a una conclusión basándonos en la localización debido a que la muestra estudiada es muy pequeña y que al menos uno de los tumores de tallo cerebral sobrepresa a *SOX2-OT* y *SOX2* en comparación a las otras muestras que no son de su mismo grado histológico, por lo que es necesario realizar estudios en una muestra de mayor tamaño para poder considerar como biomarcador de localización a alguno de estos lncRNAs.

IX. Conclusión

- La expresión relativa de los RNAs largos no codificantes *SOX2-OT* y *BCYRN1* es heterogénea entre los controles y los grados histológicos de los tumores, cumpliendo la tendencia de expresión previamente observada en el estudio de Ruiz Esparza-Garrido *et al*, 2017.
- *SOX2-OT* se encuentra sobreexpresado en los tumores de bajo grado y subexpresado en los tumores de alto grado, de manera que podría funcionar como biomarcador de astrocitoma pilocítico o de glioblastoma multiforme
- *BCYRN1* presenta una tendencia de expresión que decrece dependiendo de la malignidad del tumor, por lo que podría funcionar como un biomarcador de progresión de astrocitomas por su grado histológico

X. Perspectivas

- Analizar la expresión de *SOX2-OT* y *BCYRN1* en un mayor número de muestras de astrocitoma pediátrico, todas con diferentes grados histológicos y localizaciones
- Realizar estudios de interacción de *SOX2-OT* con *SOX2* o con otros factores de transcripción en astrocitomas pediátricos de diferentes grados histológicos
- Realizar estudios de interacción de *BCYRN1* con *c-Myc* en astrocitomas pediátricos de diferentes grados

XI. Referencias

1. Tortora GJ, Derrickson B. (2018) Capítulo 12: Tejido nervioso. *Principios de anatomía y fisiología*. 14va edición, Médica Panamericana.
2. Universidad de Guanajuato (2018). *Unidad didáctica 1: El sistema nervioso*. Contenidos didácticos, Licenciatura en enfermería y obstetricia. Disponible en: <https://blogs.ugto.mx/enfermeriaenlinea/unidad-didactica-1-el-sistema-nervioso/>
3. Young B (Pathologist), O'Dowd G, Woodford P. (2013) *Wheater's functional histology: a text and colour atlas*. (pp. 130-131) 3ra edición, Churchill Livingstone, Longman Group Limited 1993.
4. Wang DD, Bordey A. (2008) The astrocyte odyssey. *Prog Neurobiol*, 86(4):342–67. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18948166>
5. Ross MH, Pawlina W, Negrete JH. (2007) *Histología : texto y atlas color con biología celular y molecular*. (pp. 265–268) 3ra edición, Médica Panamericana.
6. Laget P, Espadaler JM. (1976) Capítulo 1: La célula nerviosa y sus prolongaciones (Estructura y morfología), La neuroglía. *Biología y fisiología de los elementos nerviosos*. (pp. 20–26). 1º edición, Toray-Masson S.A Barcelona.
7. Ganong, WF (1982) Capítulo 2. Tejido excitable: Nervio. *Fisiología Médica*. (pp. 42-43) 8va edición, El Manual Moderno S.A. de C.V. México.
8. Antibodies-Incorporated. (2019) *Anti-Glial Fibrillary Acidic Protein (GFAP)*. Antibodies-Incorporated. Disponible en: <http://www.labome.es/gene/human/glia1-fibrillary-acidic-protein-antibody.html>
9. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Lesión isquémica reciente en la corteza cerebral*. Anatomía Patológica. Disponible en: <http://anatpat.unicamp.br/bineuisquemiaheih1.html>
10. Novus-Biologicals. (2019) *GFAP Antibody (5C10)*. Novus Biologicals. Disponible en: https://www.novusbio.com/products/gfap-antibody-5c10_nbp1-05197
11. Paul DH. (1977) *The physiology of nerve cells*. (pp. 12-13) 1º edición. Hermann Blume Ediciones.
12. Geneser F, Brüel A. (2015) *Histología* (pp. 288–290) Médica Panamericana S.A.
13. Wippold FJ 2nd, Perry A, Lennerz J. (2006) Neuropathology for the neuroradiologist: Rosenthal fibers. *AJNR Am J Neuroradiol*, (5):958-61.
14. Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. (2015) Astroцитos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*, 30(2):119–29.
15. Ruiz Esparza-Garrido R, Velázquez-Flores MÁ, Diegopérez-Ramírez J, López-Aguilar E, Siordia-Reyes G, Hernández-Ortiz M, Martínez-Batallare AG, Encarnación-Guevara S, Salamanca-Gómez F y Arenas-Aranda DJ. (2013) A proteomic approach of pediatric astrocytomas: MiRNAs and network insight. *J Proteomics*, 94:162–75.

16. López-Aguilar E, Carolina A, Vildósola S, Rioscovián-Soto AP, Gascón-Lastiri G, Rojas-Puentes F, Siordia-Reyes G, Diegopérez-Ramírez J, De la Cruz-Yáñez H y Barrientos-Salcedo C. (2010) Ki67 y astrocitomas de alto grado en niños Sobrevivida de los pacientes con astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki67, atendidos en un hospital de pediatría. *Gac Méd Méx*, 146(2).
17. Eguía-Aguilar P, Solís-Paredes M, Pérezpeña-Díazconti M, Chico-Ponce de León F, Méndez-García MÁ, Arenas-Huertero F. (2011) La expresión del gen BAX en astrocitomas de bajo grado en niños correlacionado con tumores recurrentes. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar*, (10):15.
18. México Secretaría de Salud. (2010) Guía de Práctica Clínica, Tratamiento de Astrocitomas y Meduloblastoma en Niños y Adolescentes en Tercer Nivel de Atención. Disponible en: www.cenetec.salud.gob.mx
19. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW y Kleihues P. (2007) *The WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, 4th ed. IARC Press. Lyon, France.
20. Instituto Nacional del Cáncer. (2018) *Tratamiento de los astrocitomas infantiles (PDQ®)–Versión para profesionales de salud*. National Institutes of Health (NIH) Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/cerebro/pro/tratamiento-astrocitomas-infantiles-pdq>
21. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW y Kleihues P. (2007) The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. *Acta Neuropathologica*, 114:97–109.
22. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P y Ellison DW. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*, 131:803–20.
23. Villa C, Miquel C, Mosses D, Bernier M, Di Stefano AL. (2018) The 2016 World Health Organization classification of tumours of the central nervous system. *Presse Med*, 47(11–12):e187–200.
24. Koeller KK, Rushing EJ. (2004) From the Archives of the AFIP Pilocytic Astrocytoma: Radiologic- Pathologic Correlation. *Radio Graphic*, 24(6):1693-1708
25. Reyes Oliveros F, Lema Bouzas M. (2007) Capítulo 4: Tumores astrocíticos. *Gliomas del encéfalo*. (pp. 69-101) Universidade de Santiago de Compostela, Instituto Universitario de Ciencias Neurológicas.
26. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Astrocitomas Pilocíticos*. Anatomía Patológica. <http://anatpat.unicamp.br/textoastropilo.html>
27. Docampo J, González N, Muñoz A, Bruno C, Morales C. (2014) Astrocitoma pilocítico. Formas de presentación. *Rev Argentina Radiol*, 78(2):68–81.

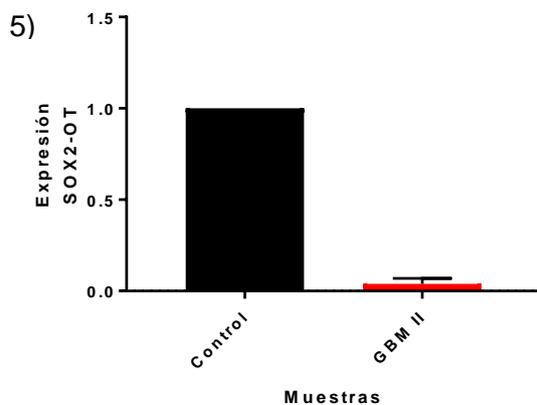
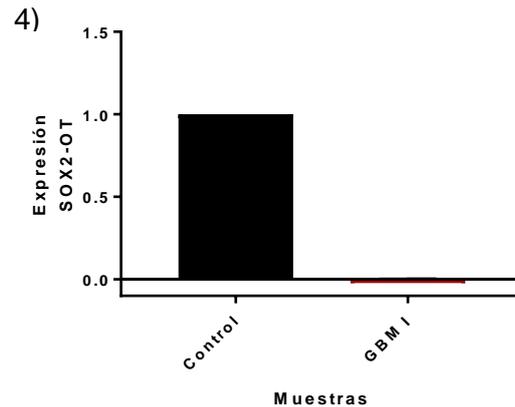
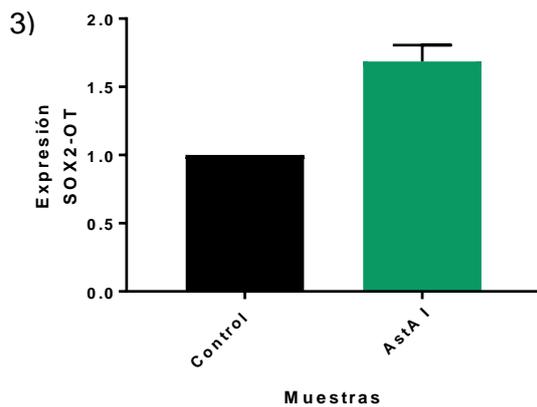
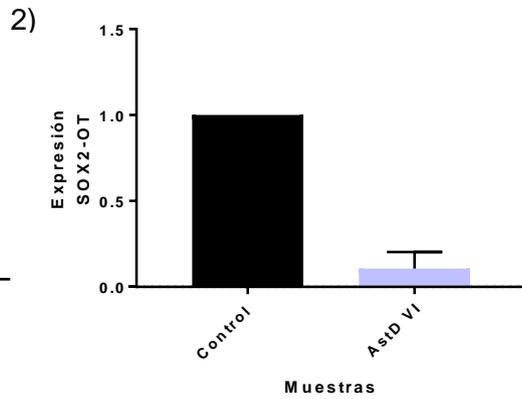
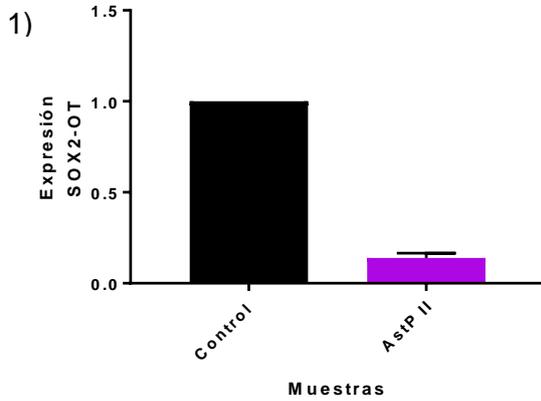
28. Martino J, Gómez E, García-Castaño A, Marco de Lucas E, Maldonado S, Martín-Láez R, Pomposo-Gaztelu I, Vázquez-Barquero A. (2012) Gliomas hemisféricos OMS grado II: revisión del manejo actual. *Neurocirugía*, 23(3):104–11.
29. Letier Pérez Ortiz D, Galarraga Inza J, Gómez Suárez H. (2001) Tumores Astrocíticos Malignos. Apuntes Histopatológicos. *Rev Cuba Oncol*, 17(3):180–7.
30. Ross A. (2012) Glioblastoma y astrocitoma maligno. *Am Brain Tumor Assoc*, 18.
31. DeAngelis LM. (2001) Brain Tumors. *N Engl J Med*, 344(2):114–23.
32. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Astrocitomas Difusos*. Anatomía Patológica. <http://anatpat.unicamp.br/bineuastrocitomamicro.html>
33. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Astrocitoma difuso con focos incipientes de anaplasia* [Internet]. Anatomía Patológica. Disponible en: <http://anatpat.unicamp.br/nptastrodifuso26a.html#he>
34. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Astrocitoma anaplásico de médula espinal*. Anatomía Patológica. Disponible en: <http://anatpat.unicamp.br/nptastrodifuso28.html>
35. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Astrocitoma anaplásico de hemisferio cerebral*. Anatomía Patológica. Disponible en: <http://anatpat.unicamp.br/nptastroana4.html>
36. Zhi F, Wang Q, Xue L, Shao N, Wang R, Deng D, Wang S, Xia X, Yang Y. (2015) The Use of Three Long Non-Coding RNAs as Potential Prognostic Indicators of Astrocytoma. *PLoS One*, 10(8):e0135242.
37. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Glioblastoma multiforme* [Internet]. Anatomía Patológica. Disponible en: <http://anatpat.unicamp.br/lamneuro14.html>
38. Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP. (2016) *Glioblastoma multiforme de hemisferio cerebral*. Anatomía Patológica. Disponible en: <http://anatpat.unicamp.br/radglioblastoma5.html>
39. Chhabda S, Carney O, D'Arco F, Jacques TS, Mankad K. (2016) The 2016 World Health Organization Classification of tumours of the Central Nervous System: what the paediatric neuroradiologist needs to know. *Quant Imaging Med Surg*, 6(5):486–9.
40. Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, Bjerke L, Clarke M, Vinci M, Nandhabalan M, Temelso S, Popov S, Molinari V, Raman P, Waanders AJ, Han HJ, Gupta S, Marshall L, Zacharoulis S, Vaidya S, Mandeville HC, Bridges LR, Martin AJ, Al-Sarraj S, Chandler C, Ng HK, Li X, Mu K, Trabelsi S, Brahim DH, Kisljakov AN, Konovalov DM, Moore AS, Carcaboso AM, Sunol M, de Torres C, Cruz O, Mora J, Shats LI, Stavale JN, Bidinotto LT, Reis RM, Entz-Werle N, Farrell M, Cryan J, Crimmins D, Caird J, Pears J, Monje M, Debily MA, Castel D, Grill J, Hawkins C, Nikbakht H, Jabado N, Baker SJ, Pfister SM, Jones DTW, Fouladi M, von Bueren AO, Baudis M, Resnick A, Jones C. (2017) Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell*, 32(4):520-537

41. Cao J. (2014) The functional role of long non-coding RNAs and epigenetics. *Biol Proced Online*, 16:11.
42. Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. (2016) Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 73(13):2491–509.
43. Guo X, Gao L, Wang Y, Chiu DKY, Wang T, Deng Y. (2016) Advances in long noncoding RNAs: identification, structure prediction and function annotation. *Brief Funct Genomics*, 15(1):38–46.
44. Wu T, Du Y. (2017) LncRNAs: From Basic Research to Medical Application. *Int J Biol Sci*, 13(3):295–307.
45. Luengo Gil G, Arroyo Rodríguez AB, Carmona-Bayonas A, Ayala de la Peña F. (2013) CircRNAs: Esponjas moleculares de MicroRNAs, ¿Futuro terapéutico en cáncer?. *Rev Eubacteria*, (32):1–12.
46. LNCipedia. (2019) *Transcript: SOX2-OT:1*. Disponible en: <https://lncipedia.org/db/transcript/SOX2-OT:17>
47. Wang KC, Chang HY. (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6):904–14.
48. Salviano-Silva A, Lobo-Alves SC, de Almeida RC, Malheiros D, Petzl-Erler ML. (2018) Besides pathology: Long non-coding RNA in cell and tissue homeostasis. *Non-coding RNA MDPI*, Vol. 4,3
49. Zhang X, Zhou Y, Mehta KR, Danila DC, Scolavino S, Johnson SR, Kibanski A. (2003) A Pituitary-Derived MEG3 Isoform Functions as a Growth Suppressor in Tumor Cells. *J Clin Endocrinol Metab*, 88(11):5119–26.
50. Zhang X, Rice K, Wang Y, Chen W, Zhong Y, Nakayama Y, Zhou Y, Kibanski A. (2010) Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: Isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology*, 151(3):939–47.
51. Jia LF, Wei SB, Gan YH, Guo Y, Gong K, Mitchelson K, Cheng J, Yu G. (2014) Expression, regulation and roles of miR-26a and MEG3 in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*, 135(10):2282–93.
52. Rao AKDM, Rajkumar T, Mani S. (2017) Perspectives of long non-coding RNAs in cancer. *Molecular Biology Reports. Springer Netherlands*, 4:203–18.
53. Shahryari A, Jazi MS, Samaei NM, Mowla SJ. (2015) Long non-coding RNA SOX2OT: expression signature, splicing patterns, and emerging roles in pluripotency and tumorigenesis. *Front Genet*, 6:196.
54. Zhang X-Q, Leung GK-K. (2014) Long non-coding RNAs in glioma: Functional roles and clinical perspectives. *Neurochem Int*, 77:78–85.
55. Weizmann Institute of Science. (2017) *SOX2-OT, BCYRN1*. GeneCards - The Human Gene Database. Disponible en: <https://www.genecards.org>
56. NCBI Gene. (2017) *SOX2-OT SOX2 overlapping transcript [Homo sapiens (human)]* - Gene - NCBI. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=LncRNA+SOX2-OT>

57. NCBI Gene. (2017) *BCYRN1 brain cytoplasmic RNA 1 [Homo sapiens (human)]* - Gene - NCBI. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=BCYRN1>
58. Samson J, Cronin S, Dean K. (2018) BC200 (BCYRN1) - The shortest, long, non-coding RNA associated with cancer. *Non-coding RNA Res*, 3(3):131–43.
59. Ruiz Esparza-Garrido R, Rodríguez-Corona JM, López-Aguilar JE, Rodríguez-Flrido MA, Velázquez-Wong AC, Viedma-Rodríguez R, Salamanca-Gómez F, Velázquez-Flores MA. (2017) Differentially Expressed Long Non-Coding RNAs Were Predicted to Be Involved in the Control of Signaling Pathways in Pediatric Astrocytoma. *Mol Neurobiol*, 54(8):6598–608.
60. NCBI (2014) *Homo sapiens SOX2OT transcript variant 7 lncRNA, complete sequence*. NCBI Gen Bank. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.1971>
61. NCBI (2018). *Homo sapiens brain cytoplasmic RNA 1 (BCYRN1), long non-coding RNA - Nucleotide - NCBI*. NCBI GenBank. Disponible en: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NR_001568.1
62. Livak KJ, Schmittgen TD. (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*, 25(4):402–8.
63. Saghaeian Jazi M, Samaei NM, Ghanei M, Shadmehr MB, Mowla SJ. (2016) Identification of new SOX2OT transcript variants highly expressed in human cancer cell lines and down regulated in stem cell differentiation. *Mol Biol Rep*, 43(2):65–72.
64. Wang Z, Tan M, Chen G, Li Z, Lu X. (2017) LncRNA SOX2-OT is a novel prognostic biomarker for osteosarcoma patients and regulates osteosarcoma cells proliferation and motility through modulating SOX2. *IUBMB Life*, 69(11):867–76.
65. Hu T, Lu Y-R. (2015) BCYRN1, a c-MYC-activated long non-coding RNA, regulates cell metastasis of non-small-cell lung cancer. *Cancer Cell Int*, 15(1):36.
66. Iacoangeli A, Lin Y, Morley EJ, Muslimov IA, Bianchi R, Reilly J, Weedon J, Diallo R, Böcker W, Tiedge H. (2004) BC200 RNA in invasive and preinvasive breast cancer. *Carcinogenesis*, 25(11):2125–33.

XII. Anexos

1. LncRNA SOX2-OT. Se presentan las gráficas individuales de las muestras que presentaron cambios significativos en comparación con el control.

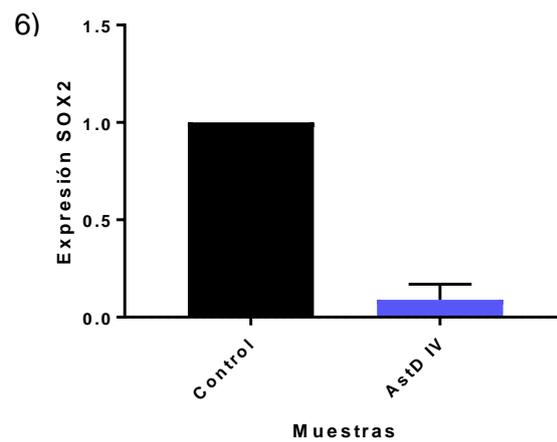
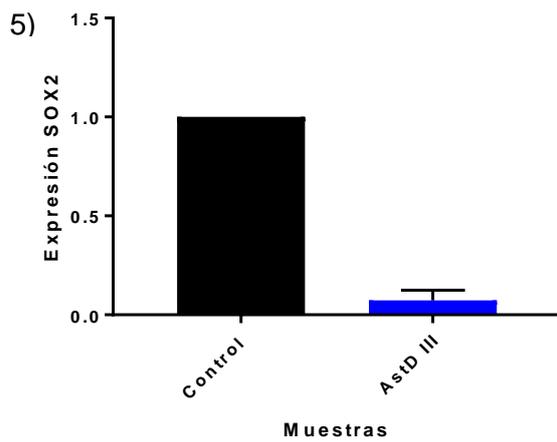
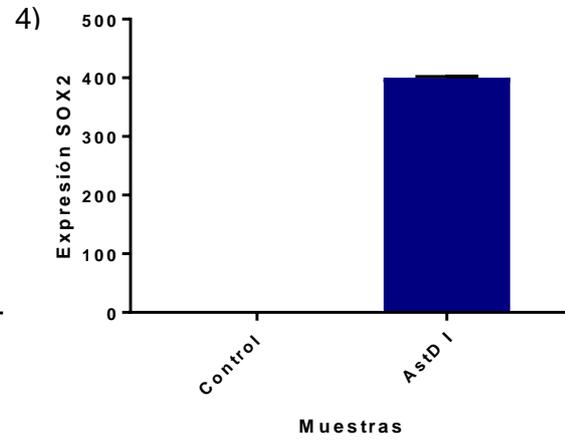
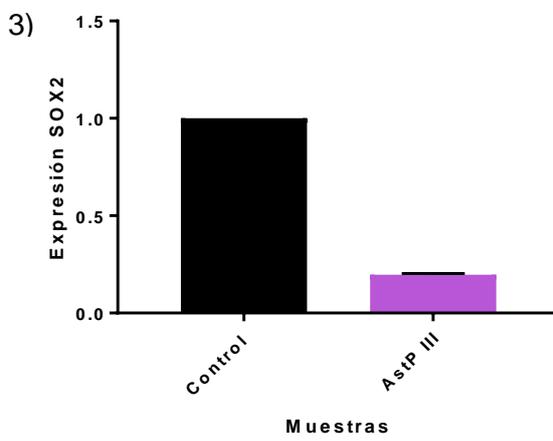
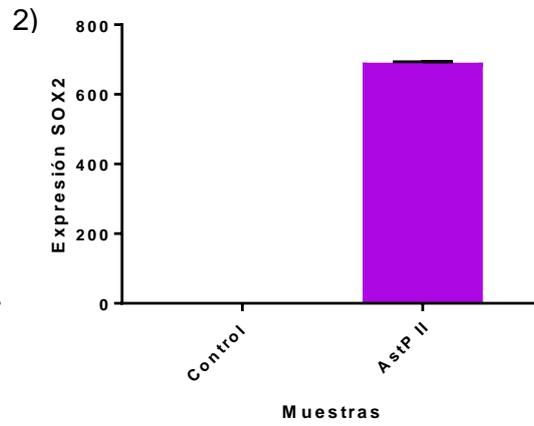
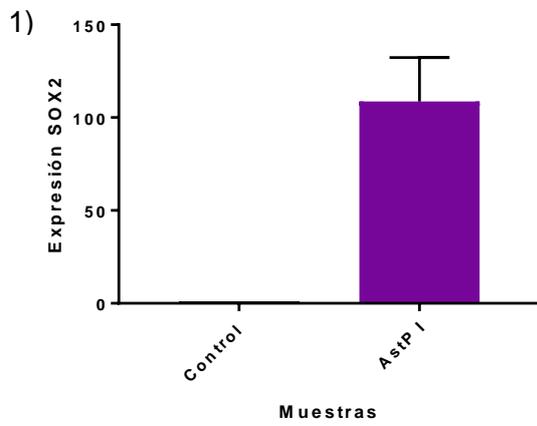


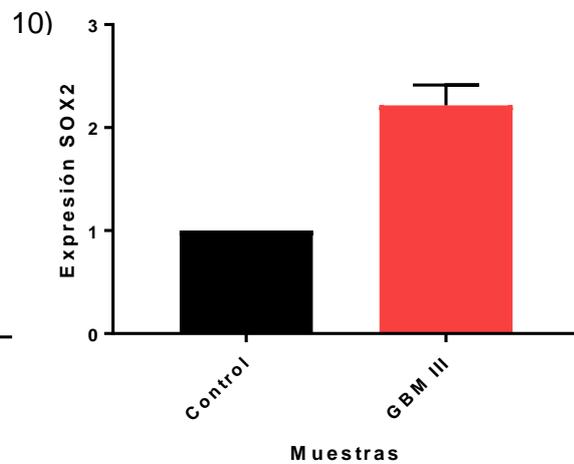
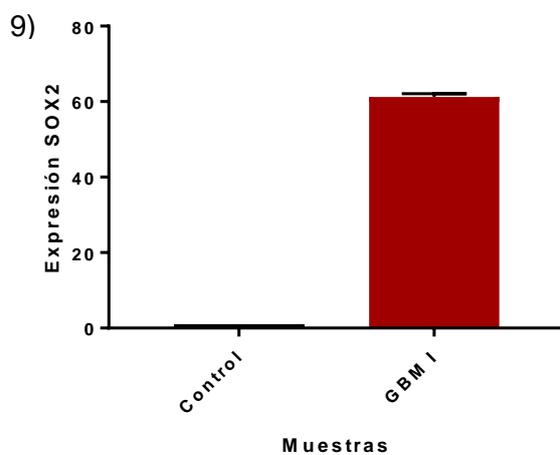
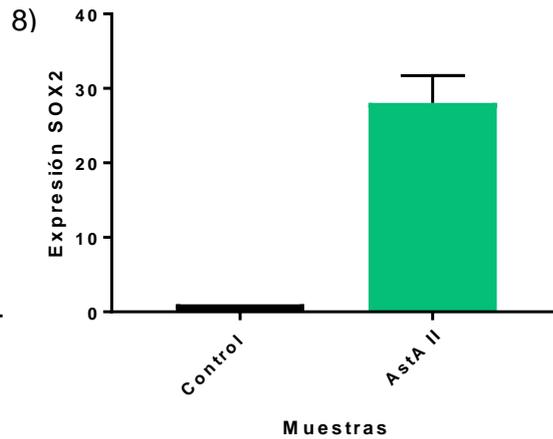
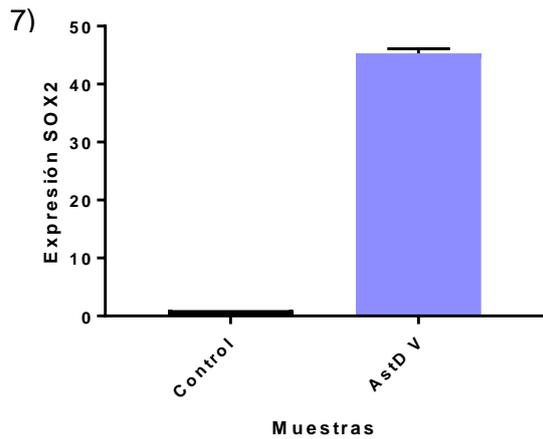
Gráficas de la expresión del lncRNA SOX2-OT en astrocitomas vs controles.

1) Comparación de la muestra Control con AstP I, mostró diferencias significativas con P de 0.0009 ($n=2$, 0.1398 ± 0.02631). 2) Comparación de la muestra Control con AstD VI mostró diferencias significativas con P de 0.0114 ($n=2$, 0.1066 ± 0.09634).

3) Comparación de la muestra Control con AstA I mostró diferencias significativas con P de 0.0279 ($n=2$, 1.686 ± 0.199). 4) Comparación de la muestra Control con GBM I mostró diferencias significativas con P de <0.0001 ($n=2$, 0.0026 ± 0.0001). 5) Comparación de la muestra Control con GBM II mostró diferencias significativas con P de 0.0011 ($n=2$, 0.03881 ± 0.03118). Los datos se analizaron con una prueba T de Student y los datos se consideraron estadísticamente significativos si presentaban un valor de P menor a 0.05

2. mRNA SOX2. Se presentan las gráficas individuales de las muestras que presentaron cambios significativos en comparación con el control.

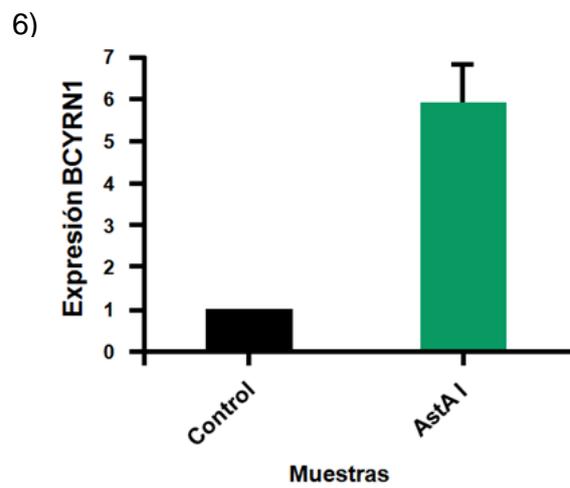
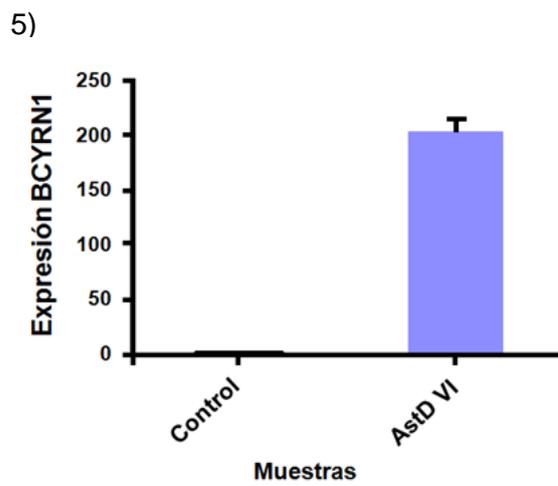
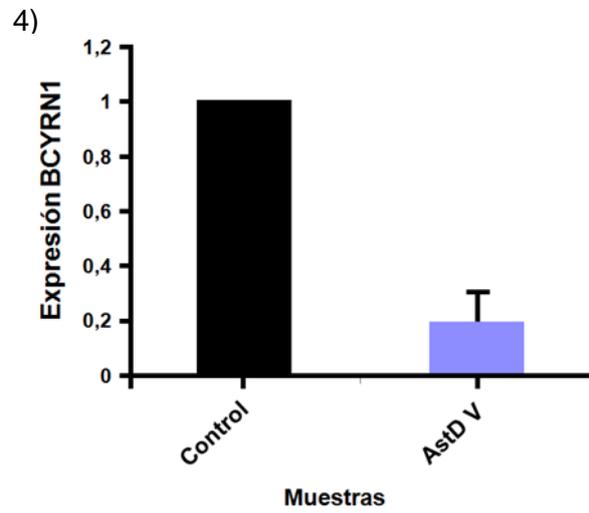
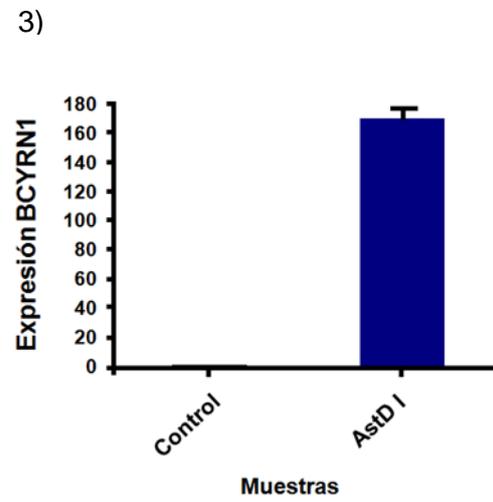
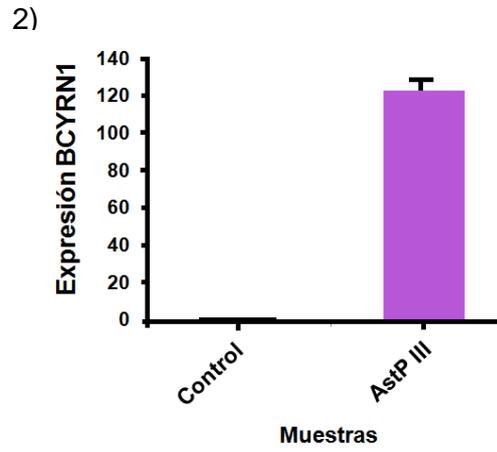
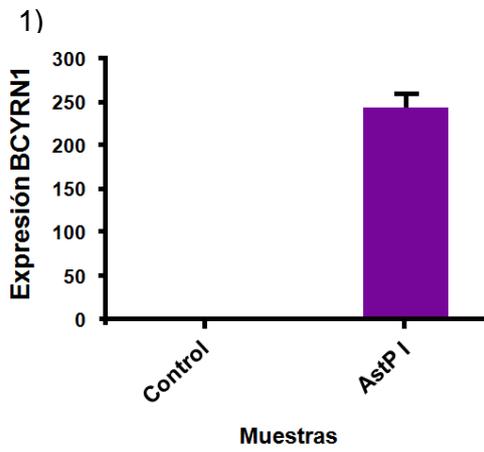


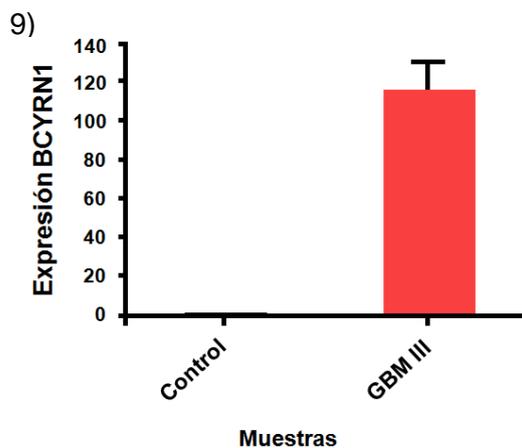
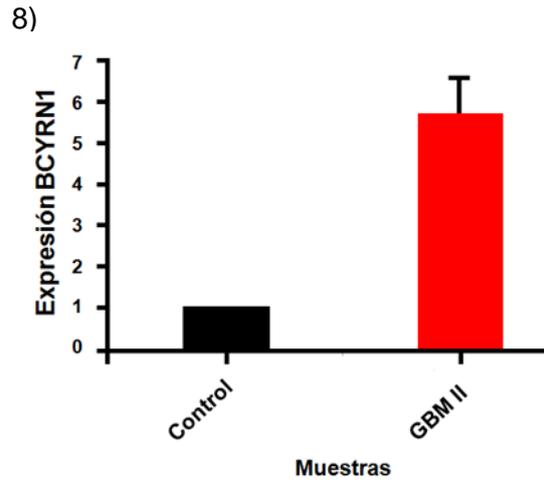
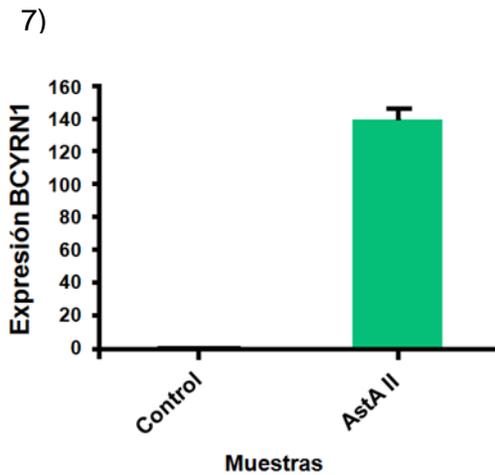


Gráficas de la expresión del mRNA SOX2 en astrocitomas vs controles.

1) Comparación de la muestra Control con AstP I, mostró diferencias significativas con P de 0.0450 ($n=2$, 108.7 ± 23.65). **2)** Comparación de la muestra Control con AstP II, mostró diferencias significativas con P de <0.0001 ($n=2$, 691.2 ± 2.396). **3)** Comparación de la muestra Control con AstP III, mostró diferencias significativas con P de <0.0001 ($n=2$, 0.1963 ± 0.0070). **4)** Comparación de la muestra Control con AstD I, mostró diferencias significativas con P de <0.0001 ($n=2$, 400.1 ± 2.08). **5)** Comparación de la muestra Control con AstD III, mostró diferencias significativas con P de 0.0030 ($n=2$, 0.07316 ± 0.05095). **6)** Comparación de la muestra Control con AstD IV, mostró diferencias significativas con P de 0.0075 ($n=2$, 0.08991 ± 0.07915). **7)** Comparación de la muestra Control con AstD V, mostró diferencias significativas con P de 0.0003 ($n=2$, 45.31 ± 0.7851). **8)** Comparación de la muestra Control con AstA II, mostró diferencias significativas con P de 0.0179 ($n=2$, 28.03 ± 3.671). **9)** Comparación de la muestra Control con GBM I, mostró diferencias significativas con P de 0.0002 ($n=2$, 61.26 ± 0.08491). **10)** Comparación de la muestra Control con GBM III, mostró diferencias significativas con P de 0.0250 ($n=2$, 2.217 ± 0.1961). Los datos se analizaron con una prueba T de Student y se consideraron estadísticamente significativos si presentaban un valor de P menor a 0.05.

3. **LncRNA BCYRN1.** Se presentan las gráficas individuales de las muestras que presentaron cambios significativos en comparación con el control.





Gráficas de la expresión del lncRNA BCYRN1 en astrocitomas vs controles.

1) Comparación de la muestra Control con AstP I, mostró diferencias significativas con P de 0.0001 ($n=2$, 233.1 ± 15.79). **2)** Comparación de la muestra Control con AstP III, mostró diferencias significativas con P de 0.0051 ($n=2$, 112.9 ± 8.076). **3)** Comparación de la muestra Control con AstD I, mostró diferencias significativas con P de 0.0019 ($n=2$, 160.3 ± 6.984). **4)** Comparación de la muestra Control con AstD V, mostró diferencias significativas con P de 0.0091 ($n=2$, -0.8065 ± 0.07726). **5)** Comparación de la muestra Control con AstD VI, mostró diferencias significativas con P de 0.0039 ($n=2$, 206.6 ± 12.93).

6) Comparación de la muestra Control con AstA I, mostró diferencias significativas con P de 0.0493 ($n=2$, 4.926 ± 1.136). **7)** Comparación de la muestra Control con AstA II, mostró diferencias significativas con P de 0.0033 ($n=2$, 139.1 ± 8.00). **8)** Comparación de la muestra Control con GBM II, mostró diferencias significativas con P de 0.0073 ($n=2$, 4.720 ± 0.4057). **9)** Comparación de la muestra Control con GBM III, mostró diferencias significativas con P de 0.0056 ($n=2$, 120.2 ± 9.016).

Los datos fueron analizados con una prueba T de Student y se consideraron estadísticamente significativos si presentaban un valor de P menor a 0.05.