



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“RNA’S NO CODIFICANTES COMO POTENCIALES MARCADORES  
MOLECULARES EN LA TUMOROGÉNESIS DE ADENOMAS HIPOFISARIOS  
CLÍNICAMENTE NO FUNCIONANTES”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:**

**JUAN EDUARDO PEÑA MARTÍNEZ**

**ASESORES:**

**M. EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**DR. DANIEL MARRERO RODRÍGUEZ**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 2022**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **Agradecimientos**

A Dios por permitirme llegar a donde estoy y poder compartir esta vida con las personas que me acompañan en este viaje, te estaré siempre agradecido.

Para mi mamá por todos los sacrificios y todo lo que has soportado para sacar a dos hijos adelante y aunque siempre lo has dicho que es por amor yo siempre te estaré agradecido por ese amor tan puro e incondicional. Gracias más que nada por no darte por vencida ante nada ni por nadie y por siempre confiar en mí y por conocer la capacidad que tengo.

A mi hermana por siempre escucharme y alentarme a seguir adelante, sin importar nada sé que siempre estarás ahí para mí.

A mi padre por apoyarme en cada uno de los proyectos que emprendo y porque siempre estas para mí cuando lo necesito.

A mi abuelita Prisca que siempre estuvo orgullosa de mi alentándome a seguir adelante y volar muy alto como siempre lo dijo, te extraño mucho.

A mis profesores que siempre me han alentado a seguir aprendiendo más, por apoyarme a desarrollar todo mi potencial y aunque todavía me falta ya que nunca se deja de aprender, sé que ustedes siempre vieron en mí una cualidad que no tienen muchas personas gracias.

A mis amigos sobre todo a los de la universidad que son personas tan afines a mí gracias por su amistad y compañía en estos años y en próximos.

A mi constancia, perseverancia, resistencia a la frustración, al no rendirme jamás y por nadie.

## **La suerte sonrío a los valientes**

**“No hay que temer a nada en la vida, solo hay que comprender”**

**Este trabajo fue parcialmente apoyado por subsidios 289499 de los Fondos Sectoriales del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología R-2015-785-015, R-2019-785-052 y del Instituto Mexicano del Seguro Social.**

## ÍNDICE GENERAL

### Índice Figuras

#### Abreviaturas

1. Resumen.....	1
2. Introducción .....	2
3. Marco Teórico .....	4
3.1 Hipófisis.....	4
3.2 Anatomía de la Hipófisis .....	5
3.2.1 Estructuras Anatómicas y adyacentes de la hipófisis .....	6
3.3 Embriogénesis de la glándula hipofisaria .....	7
3.3.1 Desarrollo de la hipófisis .....	8
3.4 Irrigación sanguínea o Perfusión Hipofisaria.....	11
3.5 Comunicación Hipotálamo- Hipófisis .....	12
3.6 Estirpes celulares de Adenohipófisis.....	14
3.7 Ejes hormonales hipotálamo-adenohipofisarios.....	15
3.7.1 Eje Lactotropo.....	17
3.7.1.2 Regulación PRL.....	17
3.7.1.3 Fisiología.....	19
3.7.2 Eje Corticotropo ACTH .....	20
3.7.2.1 Células adrenocorticotropas .....	20
3.7.2.2 Regulación de ACTH .....	20
3.7.2.3 Fisiología.....	21
3.7.3 Eje somatotropo GH.....	22
3.7.3.1 Células Somatotropas .....	22
3.7.3.2 Regulación.....	22
3.7.3.3 Fisiología.....	23
3.7.4 Eje Tirotrópico.....	23
3.7.4.1 Células Tirótropas.....	24
3.7.4.2 Regulación.....	24
3.7.4.3 Fisiología.....	25
3.7.5 Eje Folículo estimulante-luteinizante.....	25
3.7.5.1 Células Folículo estimulantes .....	25
3.7.5.2 Regulación.....	25

3.7.5.3	Fisiología.....	27
<b>3.8</b>	<b>Adenomas hipofisarios.....</b>	<b>27</b>
3.8.1	Etiología.....	28
3.8.2	Fisiopatología.....	29
3.8.3	Clasificación.....	29
3.8.4	Epidemiología.....	30
3.8.5	Incidentalomas hipofisarios.....	31
3.8.6	Actividad trófica hipofisaria.....	31
3.8.7	Factores hormonales.....	31
3.8.8	Adenomas Hipofisarios Clínicamente No Funcionantes (AHNF).....	32
<b>3.9</b>	<b>RNA no codificantes.....</b>	<b>33</b>
3.9.1	RNA pequeños no codificantes.....	33
3.9.2	MicroRNA´s.....	34
3.9.2.1	Importancia biológica de los microRNA's.....	34
3.9.2.2	Localización y estructura de los microRNA´s en el genoma.....	35
3.9.2.3	Procesamiento de los microRNA´s.....	35
3.9.2.4	Biogénesis de microRNA´s vía canónica.....	36
3.9.3	LincRNA RNA largos no codificantes.....	37
3.9.3.1	Funciones e importancia biológica de los LincRNA´s.....	38
3.9.3.3	Localización y estructura de los LincRNA`s en el genoma.....	39
3.9.3.4	Biogénesis y procesamiento de los LincRNA`s.....	39
3.9.3.5	LincRNA´s en cáncer.....	40
<b>3.10</b>	<b>miRNA´s y LincRNA´s.....</b>	<b>40</b>
3.10.1	Hsa-mir-21.....	41
3.10.1.1	PTEN y Hsa-mir-21.....	42
3.10.1.2	Respuestas Inmune.....	42
3.10.1.3	Adhesión celular.....	43
3.10.2	Hsa-mir-22.....	45
3.10.2.1	Papel de miR-22 en la angiogénesis tumoral.....	45
3.10.2.2	Mir-22 y la senescencia.....	46
3.10.3	Hsa-mir-181.....	46
3.10.4	LINC RNA00672.....	47
<b>3.11</b>	<b>Transcriptome Analysis Console TAC.....</b>	<b>48</b>

<b>4</b>	<b>Objetivos</b> .....	49
4.1	Objetivo general .....	49
4.2	Objetivos particulares.....	49
<b>5</b>	<b>Justificación</b> .....	49
<b>6</b>	<b>Hipótesis</b> .....	50
<b>7</b>	<b>Metodología</b> .....	50
7.1	Diseño Experimental .....	51
7.2	Microarreglo .....	51
7.3	Adquisición y procesamiento (Minería de datos).....	51
7.4	Plan de estadístico .....	52
<b>8.</b>	<b>Resultados</b> .....	53
<b>9.</b>	<b>Discusión</b> .....	66
<b>10.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	77
<b>11.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	78
<b>12</b>	<b>ANEXO</b> .....	83

## Índice de Figuras

Figura No.1 Anatomía de la Hipófisis.

Figura No.2 Relación anatómica de la hipófisis y del hipotálamo

Figura No. 3 Desarrollo embrionario de los lóbulos anterior y posterior

Figura No. 4 embriogénesis de la hipófisis a partir de la cuarta semana de gestación

Figura No.5 Etapas generales de la embriogénesis

Figura No. 6 Representación esquemática de la irrigación sanguínea

Figura No. 7 Comunicación entre el hipotálamo y la Adenohipófisis y Neurohipófisis

Figura No.8 Estirpes celulares de la adenohipófisis.

Figura No. 9 Regulación de la secreción de hormonas en la adenohipófisis

Figura No.10 Ejes hormonales hipotálamo-adenohipofisarios

Figura No.11 Regulación de la secreción de prolactina

Figura No.12 Retroalimentación eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal.

Figura No.13 Eje hipotálamo-hipófisis- somatotropo

Figura No. 14 Retroalimentación del eje tirótopo

Figura No. 15 Regulación del eje Hipotálamo- Hipófisis - Gónadas

Figura No. 16 Biogénesis de microRNA´s

Figura No. 17 Metodología *in silico*

Figura No.18. Análisis de los Componentes Principales

Figura No.19 Clúster Jerárquico

Figura No.20 Expresión del Hsa-mir-22 en AHNF

Figura No.21 Posible participación del Hsa-mir-22

Figura No.22 Expresión del Hsa-mir-21 en AHNF

Figura No.23 Posible participación del Hsa-mir-21

Figura No.24 Expresión del LincRNA00672 en AHNF

Figura No.25 Posible participación del LincRNA00672

Figura No.26 Expresión del Hsa-mir-181a en AHNF

Figura No.27 Posible participación del Hsa-mir-181a

Figura No.28 Mapa de Calor de LincRNA´s y microRNA´s en AHNF

Figuras No.29 Rede de coexpresión de microRNA´s y LincRNA´s en AHNF

Figuras No.30 Base de datos de miRTarBase

Figuras No.31 Base de datos de DIANA Tools TarBase v.8

## Abreviaturas

AH	Adenoma Hipofisario	TSH	Hormona estimulante de tiroides
AHNF	Adenomas Hipofisarios no Funcionantes	KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kioto
ACTH	Hormona adenocorticotrópica	LH	Hormona luteinizante
ANOVA	Análisis de la varianza	LHRH	Hormona liberadora de hormona luteinizante
DGCR8	Subunidad del complejo microprocesador	LIMMA	Modelado lineal para microarrays
Dicer	Ribonucleasa de la familia de las RNAasa III	LincRNA's	Ácidos Ribonucleicos largos intergénicos no codificantes
Drosa	Eenzima ribonucleasa III de clase 2	miRISC	Complejo silenciador inducido por microRNA's,
E2F1	Factor de transcripción E2F	miRNA's	Micro ácidos ribonucleicos
FSH	Hormona folículo estimulante	NCBI	Centro Nacional para la Información de Biotecnología
GEO	Ómnibus de expresión genética	ncRNA's	Ácidos Ribonucleicos no codificantes
GH	Hormona del crecimiento	POMC	Proopiomelanocortina
GHRH	hormona liberadora de hormona del crecimiento	pRB	Proteína del retinoblastoma
PCA	Análisis de Componente Principales	PRL	Prolactina
TRH	Hormona liberadora de tirotopina	PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa
PIF	Factor inhibidor de prolactina	TAC	Consola de Análisis de Transcriptómica

## 1. Resumen

En México los adenomas hipofisarios representan la segunda neoplasia intracraneal con mayor frecuencia.

Los adenomas hipofisarios no funcionantes no pueden ser diagnosticados por la hipersecreción de hormonas y por lo general no se diagnostican hasta que la neoplasia crece en tamaño dando lugar a signos y síntomas característicos de esta neoplasia. Los marcadores moleculares en los adenomas hipofisarios no funcionantes son deficientes. Por lo que la búsqueda e identificación de estos marcadores en la tumorigénesis de los adenomas hipofisarios no funcionantes parece crítica y oportuna.

La identificación de RNA's no codificantes como potenciales marcadores moleculares permitiría conocer las posibles vías moleculares en las que participan o qué genes blancos podrían estar implicados (silenciamiento génico post-transcripcional). Así como dilucidar su probable participación en la tumorigénesis de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes.

En el presente trabajo se descargaron bibliotecas transcriptómicas de *Gene Expression Omnibus*, de las que se obtuvieron archivos. CEL que fueron analizados con la Consola de Análisis de Transcriptómica.

De los RNA largos no codificantes y microRNA's obtenidos, se realizó un análisis bioinformático con la base de datos de Metascape en la búsqueda de interacciones de microRNA-mRNA; posteriormente se realizó la búsqueda en bases de datos bioinformáticas para microRNA's y LincRNA's como: *miRecords*, *miTarget*, *The NONCODE*, *RNA central*, *LNCipedia*, para conocer características propias de cada uno de ellos y así dilucidar una posible vía molecular implicada en los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes.

Se obtuvieron 54,000 genes totales (codificantes y no codificantes) de los cuales al aplicar los criterios estadísticos se consiguió filtrarlos obteniendo un total de 35 miRNA's y LincRNA's como potenciales marcadores moleculares. Por mencionar algunos. El Hsa-mir22 que juega un papel regulador clave en la promoción del proceso tumoral a través de la inhibición de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa involucrada en la promoción del complejo de PI3K/AKT. Hsa-mir18, involucrado en la proliferación celular al inhibir a la proteína similar a la fosfatasa pequeña y desfosforila a proteína del retinoblastoma liberando así al factor de transcripción E2F1 el cual aumenta y promueve el ciclo celular. LincRNA0672 es un potencial ongén involucrado en la regulación de la proteína supresora p53 la cual frena a la proteína LASP1 que participa en la quimioresistencia, invasión y migración tumoral.

Se logró la identificación de RNA no codificantes (microRNA's y LincRNA's) en la tumorigénesis de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes. Particularmente oncomiRNA's lo que sugiere que los ncRNA's juegan un papel importante en la proliferación, transformación y homeostasis celular.

## 2. Introducción

Los adenomas hipofisarios son un grupo heterogéneo de neoplasias que constituyen el 15% de las neoplasias del Sistema Nervioso Central. Constituyen la segunda neoplasia por orden de frecuencia de todas las neoplasias intracraneales primarias detrás de los meningiomas (1).

Corresponde a neoplasias benignas que surgen por la proliferación monoclonal, que se origina en las células del parénquima de la adenohipófisis y son clasificados por el tipo de origen de sus células; estas incluyen células corticotropas, 10%, que producen hormona adrenocorticotrópica o ACTH, tiotropas, 3-5%, que genera hormona estimulante de la tiroides (TSH), somatotropas, aproximadamente 50%, que produce hormona de crecimiento (GH), gonadotropas 15-20%, que produce hormonas estimulantes de las glándulas sexuales y lactotropas 10-30%, producen prolactina (2) (3).

En México los adenomas hipofisarios constituyen la neoplasia intracraneal con mayor frecuencia, representando el 15% de los tumores intracraneales con una prevalencia de un 1 caso por cada 10,000 habitantes, de los cuales aproximadamente el 30% de todos los adenomas hipofisarios son considerados clínicamente no funcionales que se caracterizan por no secretar hormonas hipofisarias excesivas (4) (5) (6) (7).

Los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes (AHNF) como tal no producen signos ni síntomas por lo tanto no pueden ser diagnosticados por la hipersecreción de hormonas clínicas y por lo general no se diagnóstica hasta que la neoplasia crece en tamaño y comprime los nervios craneales y los tejidos del cerebro dando lugar a signos y síntomas característicos por mencionar algunos como: visión borrosa, disfunción eréctil en hombres, cefalea, aturdimiento, náuseas, vómitos y déficits hormonales y alteración en el eje FHS/LH. Hasta el momento solo se logra diagnosticar con técnicas de imagenología ya que estas son consideradas el estándar de oro (8) (6) (9).

A pesar de un nivel constante de interés tanto en investigación y clínica, la comprensión de los mecanismos moleculares que causan los AHNF sigue siendo deficientes. Esto se evidencia en parte por el hecho de que actualmente no hay fármacos eficaces biodisponibles para estos adenomas, ni tampoco se han establecido marcadores moleculares para el diagnóstico de los adenomas clínicamente no funcionantes antes de que aparezcan los signos y síntomas (6).

En la búsqueda de estos marcadores moleculares implicados en tumorigénesis se encuentran los RNA no codificantes (ncRNA's) cuya participación es expresada diferencialmente en muchas neoplasias, sin embargo, en los AHNF, los ncRNA's no han sido evaluados a profundidad (6).

La necesidad de identificar potenciales marcadores moleculares en la tumorigénesis de AHNF, coincide con el reconocimiento muy reciente de una nueva clase de moléculas involucradas en la tumorigénesis: RNA largos no codificantes (LincRNA's) y microRNA's (miRNA's). Esta clase de RNA no codificantes (LincRNA's y miRNA's) se ha implicado en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético, transcripcional o postranscripcional, a pesar de que no codifican ningún producto proteico.

La regulación de la expresión génica por LincRNA's y miRNA's afecta las decisiones celulares críticas como la división celular y la apoptosis, aumentando inmediatamente la posibilidad de su participación en la tumorigénesis. De hecho, varios LincRNA's y miRNA's ahora fungen como marcadores moleculares establecidos de tumorigénesis y son sujetos de intensa investigación (6) (5).

Por lo que la búsqueda e identificación los marcadores moleculares para la tumorigénesis de los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes parece crítica y oportuna (6) (10).

### 3. Marco Teórico

#### 3.1 Hipófisis

La glándula pituitaria, o hipófisis, es la principal glándula del sistema endocrino, debido a que controla las funciones de otras glándulas endocrinas. La glándula hipófisis es del tamaño de un chícharo, está situada en la base del cerebro, unida al hipotálamo por fibras nerviosas. Está compuesta por tres secciones anatómicas muy claras: por un lóbulo anterior (adenohipófisis), un lóbulo posterior (neurohipófisis) y un lóbulo intermedio, el cual, en humanos, es rudimentario y no ejerce ninguna función biológica conocida, sin embargo, en los mamíferos permite la habilidad de camuflaje por el cambio de pelaje (11) (12).

Cada lóbulo de la glándula pituitaria produce ciertas hormonas. La adenohipófisis produce la hormona del crecimiento (GH), la prolactina (PRL), la hormona adenocorticotrópica (ACTH), la hormona estimulante de la tiroides (TSH), la hormona folículo-estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH); el lóbulo intermedio produce principalmente melatonina (hormona estimulante de melanocitos); mientras que la neurohipófisis es un reservorio de arginina vasopresina (AVP o también conocida como vasopresina) y oxitocina, que son producidas en el hipotálamo (12) (13).

A su vez, se debe recordar que la hipófisis está bajo el control del hipotálamo, el cual produce un buen número de mediadores químicos, los cuales viajan hasta la hipófisis vía sistema vascular portal, a través del tallo hipofisario.

La secreción de las hormonas hipofisarias es pulsátil y refleja el estímulo ejercido por un conjunto de factores liberadores hipotalámicos específicos. Cada una de estas hormonas hipofisarias provoca respuestas específicas en otros tejidos glandulares periféricos. A su vez, las hormonas producidas por estas glándulas periféricas regulan la función de la hipófisis por retroalimentación positiva o negativa (feed back +/-) a nivel del hipotálamo y de la misma hipófisis (13) (14).

La mayoría de los factores hipotalámicos que controlan la secreción de las hormonas hipofisarias son péptidos e incluye la hormona liberadora de la hormona del crecimiento GHRH, la somatostatina, la hormona liberadora de la hormona luteinizante LHRH o también llamada la hormona liberadora de las gonadotropinas GnRH, la hormona liberadora de la tirotrópina TRH, la hormona liberadora de la corticotropina CRH y la dopamina o el factor inhibidor de la prolactina PIF (11) (13) (14).

Como se mencionó anteriormente, existe un estrecho mecanismo de retroalimentación entre la adenohipófisis y sus glándulas endocrinas blanco (glándulas periféricas o tejidos glandulares periféricos) que al disminuir la secreción de una de estas hormonas hipofisarias hay una disminución concomitante de la hormona producida por este órgano blanco; lo mismo ocurre cuando aumenta su secreción, hay un incremento en la secreción hormonal a nivel del órgano blanco o diana. La deficiencia o exceso hormonal se consideran secundarios, pues ocurre a nivel de la

hipófisis. En cambio, cuando la deficiencia o exceso hormonal ocurre a nivel de la glándula blanco, se observa un aumento o disminución en la concentración sérica de las hormonas hipofisarias respectivamente, este tópico se abordará a detalle en cada uno de los ejes hipotalámicos-adenohipofisarios más adelante (11) (13) (12).

### **3.2 Anatomía de la Hipófisis**

La glándula (Figura 1) se sitúa contenida dentro en la silla turca del esfenoides y está recubierta por el diafragma de la silla dural a través del cual el tallo se conecta con la eminencia mediana del hipotálamo. Está conectada con la base del encéfalo, mediante el tallo hipofisario y presenta una forma ovalada, su forma se asemeja a un cereza de 10X6X13 mm (ancho, anteroposterior y altura) 13 mm aproximadamente de diámetro transversal mayor, 6-9 mm de altura y unos 10 mm anteroposterior y un peso en adultos de unos 600 mg aproximadamente (aunque varía de 400-900 mg) sin embargo, se pueden encontrar variaciones estructurales en mujeres multíparas, aumentando también el volumen de la glándula durante el ciclo menstrual y durante el embarazo estos diámetros pueden aumentar en cualquier dirección y el peso aumenta hasta 1g (15) (16) (17) (18).

Desde un punto de vista estructural se distinguen dos zonas en la hipófisis un lóbulo anterior o adenohipófisis, otro posterior o neurohipófisis y existe un intermedio de escasa relevancia en el hombre, pero no menos importante (16) (17) (19).

- Lóbulo anterior o adenohipófisis: proviene del estomodeo, invaginación del ectodermo que dará lugar a la cavidad bucal, que formará la llamada bolsa de Rathke.
- Lóbulo posterior o neurohipófisis: tiene un origen diencefalo, es decir, nervioso. Está unido al diencefalo por el infundíbulo.

Los senos cavernosos, que contienen los pares craneales III-VI, se encuentran a los lados de la glándula hipofisaria (15).

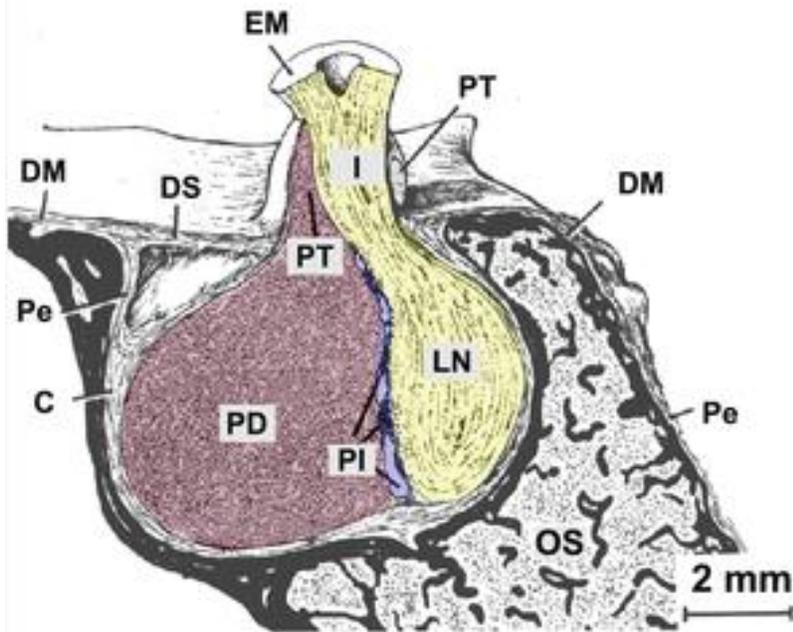


Figura No.1 Anatómica de la Hipófisis. La Hipófisis se sitúa contenida en la silla turca del esfenoides (OS), la hipófisis se encuentra estructuralmente dividida en: adenohipófisis (PD), una región intermedia (PI) y neurohipófisis (LN). Otras estructuras como la cápsula (C) de la hipófisis va seguida del periostio (Pe) del hueso esfenoides y su duramadre (DM). Por el tallo hipofisario (infundíbulo, I), los axones nerviosos de diferentes núcleos hipotalámicos alcanzan la hipófisis. (Eminencia media, EM) y la parte superior de la hipófisis anterior también conocida como pars tuberalis (PT) (10).

### 3.2.1 Estructuras Anatómicas y adyacentes de la hipófisis

La silla turca (Figura 2), localizada en la base del cráneo, forma el delgado techo del seno esfenoides. Las paredes laterales están constituidas por tejido óseo o dural alrededor de los senos cavernosos, que son atravesados por los pares craneales tercero, cuarto y sexto, y las arterias carótidas internas. El techo dural protege la glándula hipofisaria de la compresión por los cambios de presión del líquido cefalorraquídeo LCR (15) (10).

El quiasma óptico (Figura 2), localizado anterior al tallo hipofisario, está situado directamente por encima del diafragma de la silla turca. Los tractos ópticos y las estructuras centrales resultan, por tanto, vulnerables a los efectos generados por la presión de una masa hipofisaria en expansión como es el caso de los AHNF, que sigue típicamente el trayecto de menor resistencia tisular. La neurohipófisis, a diferencia de la adenohipófisis, está inervada directamente por los tractos nerviosos supraóptico hipofisario y tuberohipofisario del tallo posterior (18) (14).

Otra estructura anatómica bastante importante es el hipotálamo (Figura 2) ya que rige a la hipófisis debido a que contiene, diferentes poblaciones neuronales de las cuales destacan, los cuerpos neuronales que sintetizan las hormonas liberadoras e inhibidoras hipofisarias, además de las hormonas neurohipofisarias (18).

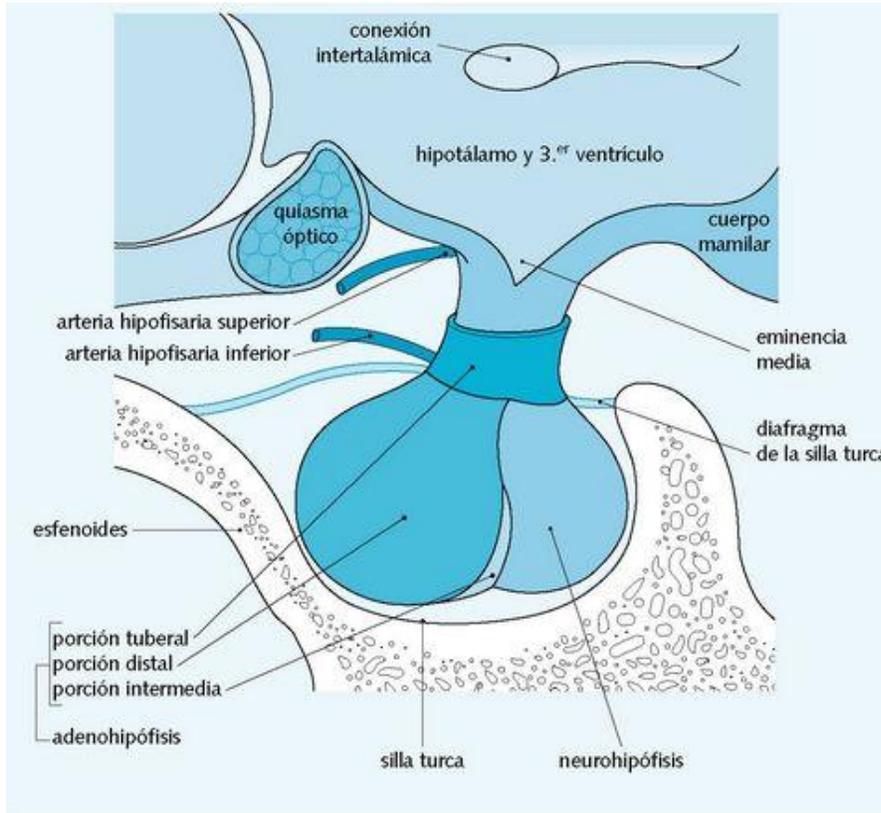


Figura No.2 Relación anatómica de la hipófisis y del hipotálamo con estructuras adyacentes (17).

### 3.3 Embriogénesis de la glándula hipofisaria

La embriología (Figura 4) de la glándula hipofisaria se origina a partir de dos partes discretas del embrión en desarrollo a partir de la tercera y cuarta semana de gestación. La bolsa de Rathke, una evaginación dorsal del estomodeo (tejido glandular) inmediatamente anterior a la membrana bucofaríngea, y el infundíbulo (tejido nervioso), una exención ventral del diencéfalo caudal al quiasma óptico. Otra evaginación dorsal del estomodeo, la bolsa de Sessel, surge justo por detrás de la membrana bucofaríngea esta estructura contribuye a la formación de la hipófisis en invertebrados inferiores, pero no en primates (18) (20) (21).

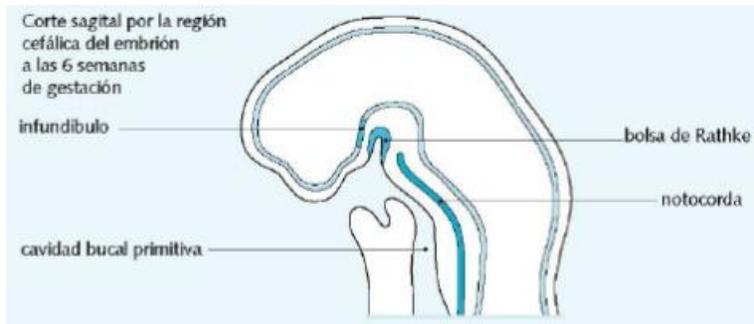


Figura No. 3 Desarrollo embrionario de los lóbulos anterior y posterior de la hipófisis (17).

La bolsa de Rathke (Figura 3) y el infundíbulo son ambos derivados de la capa de células germinales ectodérmicas, pero se van diferenciando (plasticidad celular) generando en última instancia diferentes patrones estructurales, anatómicos, histológicos y celulares. El primero se diferencia en el epitelio glandular característico de otros órganos endocrinos, mientras que el último se organiza como tejido exocrino (sin ductos) (18).

### 3.3.1 Desarrollo de la hipófisis

Su desarrollo comienza entre la tercera y cuarta semana de gestación cuando los primordios glandulares y neurales son inducidos por el extremo anterior de la notocorda (evaginación saciforme de la región bucal), que se encuentra justo caudal al estomodeo (Figura 4 y 3). Las interacciones recíprocas entre estos constituyentes guían la embriogénesis posterior. Durante la tercera semana de gestación, el infundíbulo se desarrolla como un divertículo ventral en el suelo del tercer ventrículo. Se extiende desde la eminencia media como el vástago infundibular y termina en una expansión llamada proceso infundibular. Simultáneamente, un “placode ectodérmico” aparece en el techo del estomodeo donde se evagina para formar la bolsa de Rathke, que crece dorsalmente (18).

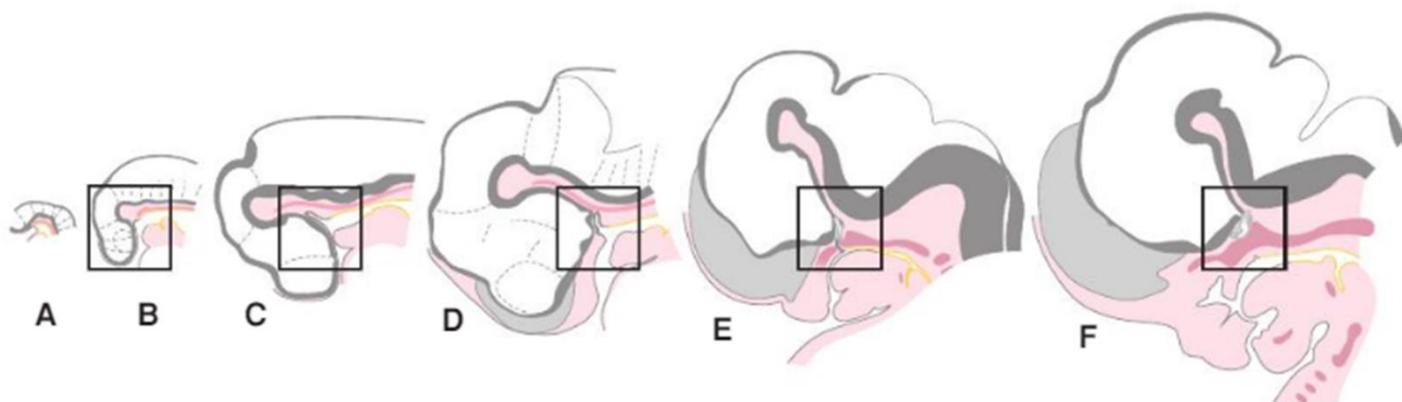


Figura No. 4 embriogénesis de la hipófisis a partir de la cuarta semana de gestación (22).

En el segundo mes de desarrollo, la bolsa de Rathke se aplana alrededor de las superficies anterior y lateral del infundíbulo, y estas dos estructuras se integran posteriormente. La conexión entre la bolsa de Rathke y la cavidad bucal pasa entre los centros de condricación (formación de cartílago) de los huesos pre-esfenoides en desarrollo y los huesos del esfeno del cráneo. La expansión del mesénquima (tejido embrionario) esfenoidal en la sexta semana de gestación hace que esta conexión regrese (involucione) en la mayoría de los casos. Sin embargo, en aproximadamente en el 1% de los cráneos de recién nacidos, se ha encontrado un remanente, el canal basifaríngeo que es visible en autopsias o por radiografías. Del mismo modo, pequeños restos de la bolsa de Rathke pueden persistir ocasionalmente en el techo de la orofaringe como hipófisis faríngea. Con un mayor desarrollo, las células en la pared anterior de la bolsa de Rathke (pars distalis) proliferan rápidamente y forman el lóbulo anterior de la glándula hipofisaria. El crecimiento diferencial de estas células en relación con el mesénquima circundante produce una pequeña cuenca, abierta y separada en dos compartimentos por un tabique celular medio o fosa de Atwell, la cual se llena inicialmente con mesénquima. Estas fosas desaparecen posteriormente como resultado de una mayor proliferación celular por los derivados de la bolsa de Rathke (18) (23).

El tabique mediano forma el pars medial, mientras que las porciones laterales forman el pars lateralis del lóbulo anterior. La migración de elementos mesenquimatosos desde las fosas de Atwell a la superficie anterior del infundíbulo, lleva los elementos mesodérmicos, que eventualmente forman los vasos sanguíneos del sistema portal hipofisario. Una pequeña extensión del tabique mediano, la pars tuberalis, se desarrolla a partir de la fusión de germinaciones pareadas, en forma de alas que crecen a lo largo del tallo del infundíbulo y eventualmente lo rodean. Las células de la pared posterior de la bolsa de Rathke no proliferan ampliamente, sino que se diferencian en el lóbulo medio de la glándula hipofisaria, la pars intermedia. La cavidad de la bolsa de Rathke entre ellos los lóbulos anterior y medio involucionan en la mayoría de los casos por la incorporación de células de las paredes anterior y posterior, pero pueden persistir como una hendidura estrecha (luz residual, también conocida como fisura hipofisaria) (14) (18) (24) (25).

Junto con la pars tuberalis, el vástago infundibular comprende el tallo hipofisario. El proceso infundibular da lugar al lóbulo posterior de la glándula hipofisaria, también conocida como pars nervosa o neurohipófisis. Este último consiste en células neurogliales (pituicitos), así como en las fibras nerviosas y terminales de las células que se originan en los núcleos hipotalámicos. Los pituicitos se adaptan específicamente a apoyar la secreción y transporte de hormonas. Liberado por la neurohipófisis. También tienen propiedades fagocíticas. La luz del infundíbulo se borra durante el desarrollo, pero un pequeño hoyo proximal, el receso infundibular, persiste en el suelo del tercer ventrículo (18) (14) (26).

La bolsa de Rathke (Figura 5) se ve desde la tercera a cuarta semana de gestación y acaba perdiendo su comunicación con la cavidad bucal y su irrigación hacia la octava semana de gestación; a partir de ese momento, la perfusión de la adenohipófisis corre a cargo de los vasos portales hipotalámicos. Cuando se pierde la conexión con la boca primitiva, quedan a veces agregaciones de células epiteliales. En ocasiones, estas células poseen funciones y secretan hormonas ectópicas sin embargo, tienen un comportamiento benigno (20) (26) (27).

Poco después de nacer, la adenohipófisis empieza a secretar cantidad de gonadotropinas LH y FSH cercanas a las del adulto. Los dos primeros años, la secreción desciende rápidamente hasta cifras muy bajas, que se mantienen hasta la pubertad. La maduración sexual se encuentra detenida en ese momento (17).

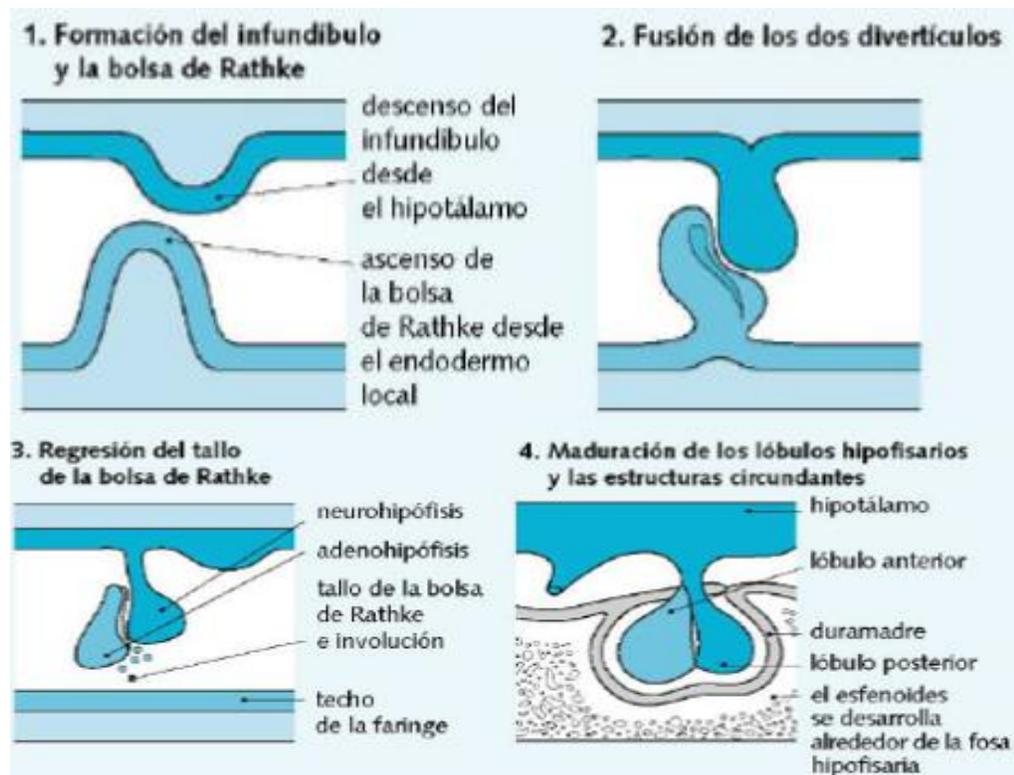


Figura No.5 Etapas generales de la embriogénesis. La hipófisis tiene dos orígenes embrionarios diferentes. La bolsa de Rathke es una evaginación ascendente de la cavidad bucal primitiva. Se compone de ectodermo y crea la adenohipófisis, que no se comunica directamente con el hipotálamo. El infundíbulo del diencefalo crece hacia abajo y se acompaña de neuroectodermo. Crea la neurohipófisis, que se comunica directamente con el hipotálamo. Los axones de las células neurosecretoras del hipotálamo descienden por el tallo hipofisario y terminan en la neurohipófisis. La secreción fetal hipofisaria se detecta ya en la semana 12 e incluso algo antes (17) (20).

### 3.4 Irrigación sanguínea o Perfusión Hipofisaria

La irrigación vascular de la hipófisis es rica, a cargo de las arterias hipofisarias, superior e inferior procedentes de la carótida interna; las venas hipofisarias son varias y terminan en el seno cavernoso (28) (10) (15).

Se conocen dos sistemas porta venosos (Figura 6), entre los capilares arteriales y las venas hipofisarias, uno superior y otro inferior por el que llegan a la adenohipófisis las hormonas hipotalámicas estimuladoras e inhibitoras. En menor cuantía tiene lugar una transmisión ascendente desde la adenohipófisis al hipotálamo que interviene un servomecanismo (feed back) de la secreción hormonal entre ambas glándulas (17) (10).

La hipófisis se conecta con la eminencia media del hipotálamo mediante el tallo hipofisarios (Figura 6) que atraviesa el diafragma selar por un foramen menor a 1,5 mm. Por el tallo hipofisario discurren, a través del sistema porta, las hormonas y factores tróficos hipotalámicos y, directamente, las fibras eferentes que terminan en la neurohipófisis (15) (28) (17) (10).

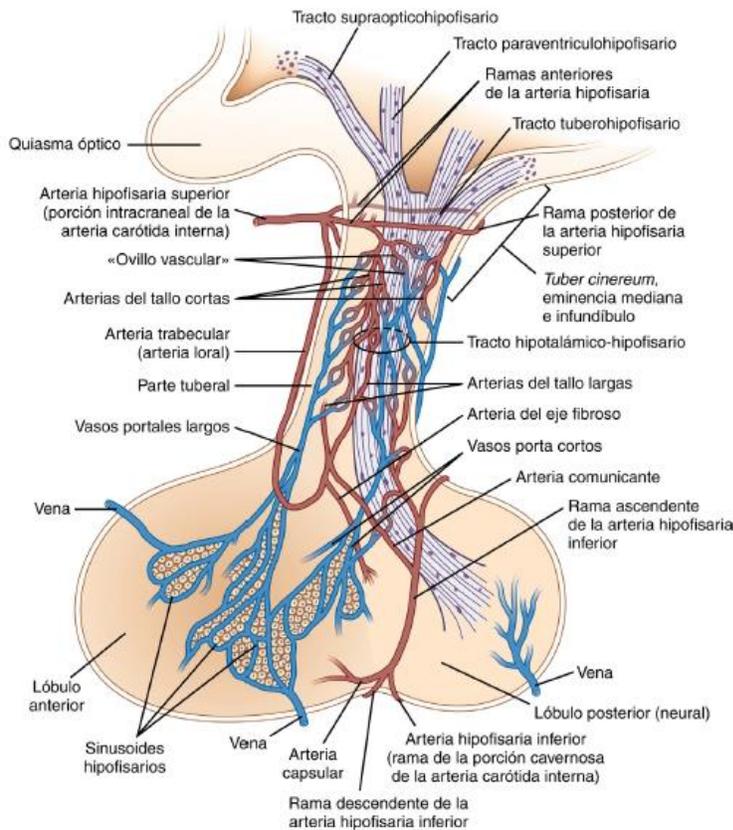


Figura No. 6 Representación esquemática de la irrigación sanguínea de la hipófisis. La hipófisis dispone de una rica irrigación derivada de varias fuentes. Las arterias hipofisarias superiores son ramas de las carótidas internas que irrigan el hipotálamo, donde forman una red capilar en la eminencia mediana,

externa a la barrera hematoencefálica. Los vasos porta hipofisarios largos y cortos se originan en los plexos infundibulares y el tallo, respectivamente. Estos vasos forman la circulación porta hipofisaria, el principal riego de la adenohipófisis. También se produce un flujo retrógrado hacia la eminencia mediana, lo que facilita las interacciones bidireccionales entre el hipotálamo y la hipófisis (15).

### **3.5 Comunicación Hipotálamo- Hipófisis**

El hipotálamo y la hipófisis conforman, en lo funcional, una unidad que participa en la regulación de varias glándulas endocrinas, contribuyendo a la homeostasis del estado hídrico y metabólico (28).

La glándula hipófisis no se gobierna sola, depende directamente del hipotálamo (Figura 7) por lo que la comunicación de estas dos estructuras es decisiva para el funcionamiento del sistema endocrino.

La hipófisis presenta dos modos diferentes de relacionarse con el hipotálamo:

- **Conexión hipotálamo-adenohipófisis (Figura 7a):** en este tipo de conexión, las neuronas hipotalámicas sintetizan péptidos estimuladores, sin embargo, también se liberan sustancias inhibitoras, que mediante transporte axoplasmático llegarán hasta la eminencia media, donde serán liberadas. Estas sustancias penetran en el sistema porta y mediante irrigación sanguínea llegarán hasta las células adenohipofisarias modulando la liberación de las hormonas adenohipofisarias (20) (29).
- **Conexión hipotálamo-neurohipófisis (Figura 7b):** para este tipo de conexión, las neuronas hipotalámicas sintetizarán péptidos que viajarán mediante transporte axoplasmático hasta la neurohipófisis, donde se liberarán como hormonas neurohipofisarias (20) (29).

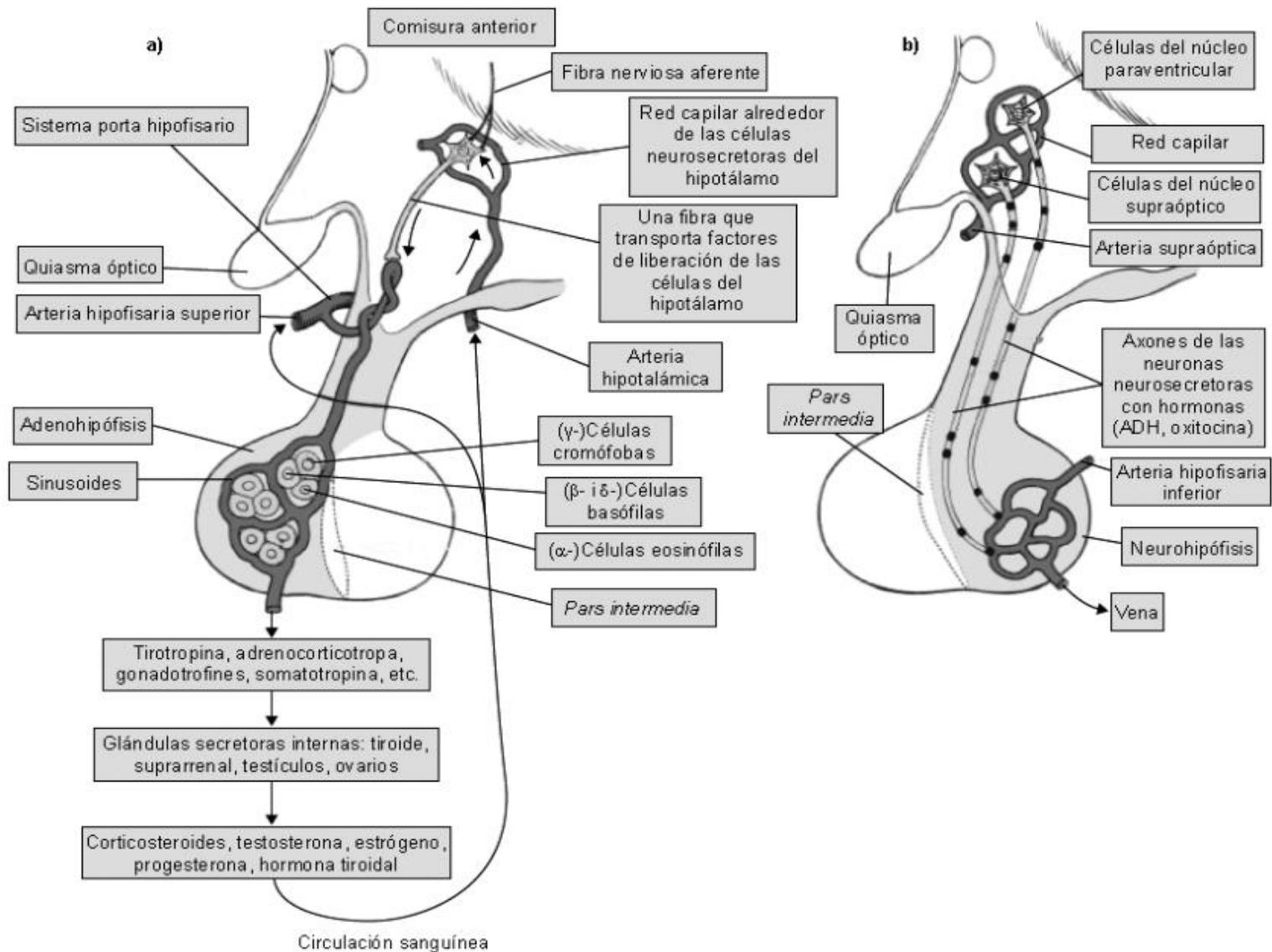


Figura No. 7 Comunicación entre el hipotálamo y la Adenohipófisis (A) y Neurohipófisis (B) (20) (2)

### 3.6 Estirpes celulares de Adenohipófisis

Los estudios citológicos, microscópicos, inmunohistoquímicos y de secuenciación del mRNA permite la diferenciación en la adenohipófisis de las siguientes extirpes celulares (Figura 8) (16).

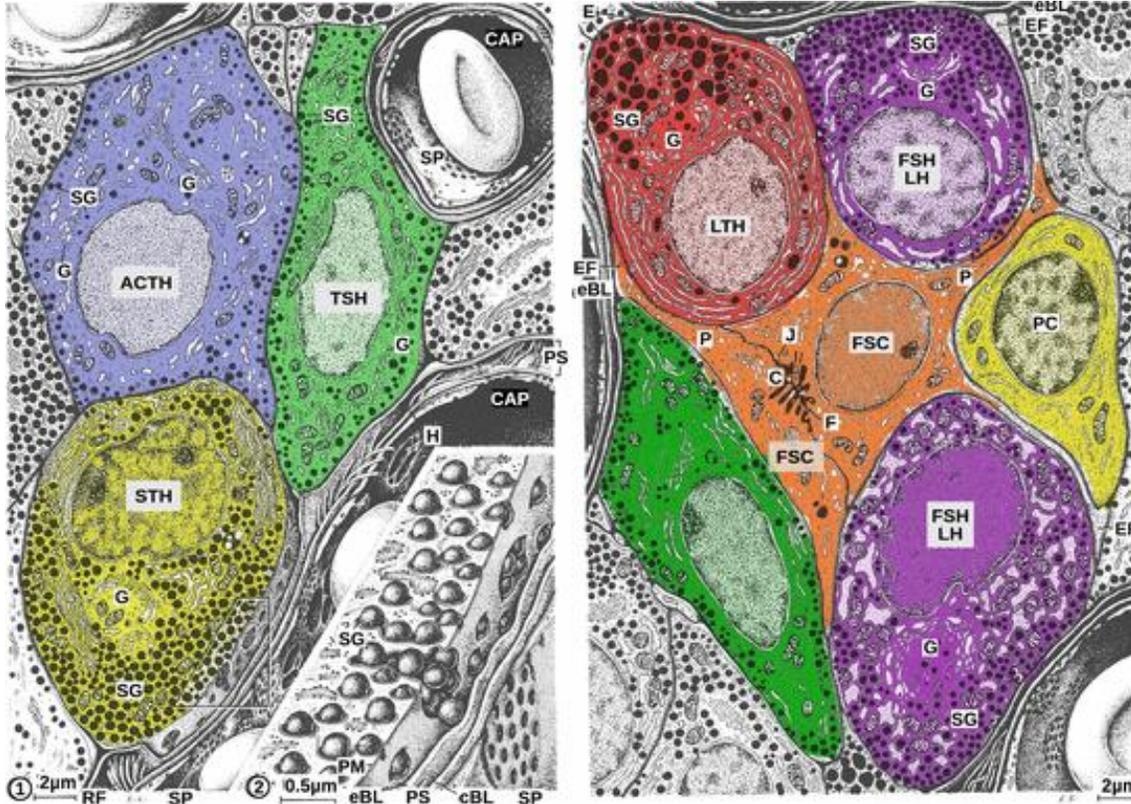


Figura No.8 Estirpes celulares de la adenohipófisis. Se pueden distinguir los siguientes tipos de células: células adrenocorticotrópicas (ACTH), células somatotrópicas (STH), células lactotrópicas (LTH), células gonadotrópicas (FSH y LH) y células tirotrópicas (TSH). Además, hay células foliculares estrelladas, estas se caracterizan por no secretan secretagogos (FSC) y células precursoras (PC) sin síntesis hormonal detectable. Todas estas células productoras de hormonas se caracterizan por un aparato de Golgi (G) visible, numerosas mitocondrias, pronunciado retículo endoplásmico rugoso y una enorme cantidad de vesículas secretoras (SG). Al ser estimuladas por las hormonas liberadoras del hipotálamo, estas vesículas se fusionan con la membrana celular y liberan su contenido. Las hormonas secretadas solo necesitan pasar la corta distancia a través de la lámina basal y el espacio perivascular (PS) antes de llegar a los capilares a través de placas de tamiz (SP). En él, los capilares de tipo fenestrados permiten la rápida absorción de hormonas (Imagen izquierda). Las placas de tamiz son rasgos característicos de los órganos endocrinos. (C) cilios, (CAP) capilares, (CBL) capilar lamina basal, (E) exocitosis, (EBL) lamina basal externa, procesos citoplasmáticos (P), membrana plasmática (PM), fibras reticulares RF (10).

### 3.7 Ejes hormonales hipotálamo-adenohipofisarios

Dado que la secreción de las hormonas hipofisarias está controlada por los péptidos hipotalámicos, se habla de la existencia de ejes funcionales hipotálamo-hipofisario y su tejido secundario glandular o células diana sin embargo el término eje es ambiguo y con el tiempo se ha introducido el término de “redes hormonales”. La adenohipófisis, a través de tipos celulares específicos, libera a la circulación una serie de hormonas determinadas que ejercen sus acciones periféricas de manera difusa sobre varios tejidos o focalmente sobre otra glándula. El resultado de la acción hormonal hipofisaria (Figura 9) puede ser la génesis de una acción biológica, la liberación de una nueva hormona, que a su vez origina otra acción biológica, o ambas cosas. La acción biológica iniciada o la hormona liberada cierran el circuito mediante un mecanismo de retroalimentación negativa “feed back”, inhibiendo la liberación hipofisaria de la hormona que inicio el proceso (20) (30).

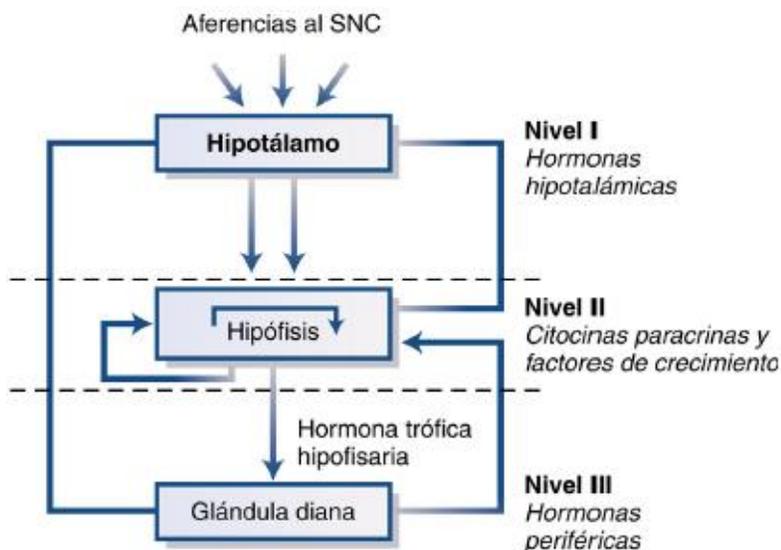


Figura No. 9 Regulación de la secreción de hormonas en la adenohipófisis con 3 niveles de control. Las hormonas hipotalámicas atraviesan el sistema portal y actúan directamente sobre sus células dianas correspondientes. Las citocinas y los factores de crecimiento intrahipofisarios regulan la función trófica de las células por un control paracrino y autocrino. Las hormonas periféricas ejercen una acción de inhibición mediante retroalimentación negativa de la síntesis y secreción de las correspondientes hormonas trópicas (15)

Las hormonas hipotalámicas que llegan a la adenohipófisis a través de los vasos porta hipofisarios tienen acción trófica sobre las células hipofisarias, sitúan el nivel de operación o de equilibrio (set point) del sistema y son, a su vez, reguladas por la hormona o por la acción biológica periférica, que envía información comparativa al hipotálamo y a los centros superiores (20) (30) (28).

Las hormonas hipotalámicas que regulan la función hipofisaria con relevancia clínica son las siguientes (Figura 10):

- GH-RH. 44 aminoácidos. Hormona hipotalámica estimulante de la secreción de la hormona de crecimiento GH.
- CRH. 41 aminoácidos. Hormona hipotalámica estimulante de la secreción de adrenocorticotropina ACTH.
- TRH. 3 aminoácidos. Hormona hipotalámica estimulante de la secreción de hormona tirotropina. Estimula la secreción hipofisaria de la hormona tiroestimulante o tirotrona TSH y de prolactina PRL.
- Gn-RH. 10 aminoácidos. Hormona hipotalámica liberadora de gonadotropina. estimula liberación de la hormona luteinizante LH y de la foliculoestimulante FSH.
- GHRIH. 14 aminoácidos. Somatostatina, su función fisiológica básica es inhibir la liberación de GH, pero también inhibe la secreción de una variedad de hormonas tan extensa que le ha valido el nombre alternativo de paninhibina.
- Dopamina es una amina biógena y su acción fisiológica es inhibir la secreción de PRL.
- 

Las hormonas adenohipofisarias con relevancia clínicas son las siguientes (Figura 10):

- GH. 191 aminoácidos. Hormona del crecimiento u hormona somatotropa. Actúa sobre receptores periféricos; promueve el crecimiento somático y modula el metabolismo.
- PRL. 199 aminoácidos. Prolactina. Promueve la producción de proteínas de la leche por la glándula mamaria.
- ACTH. 39 aminoácidos Hormona corticótropa o adrenocorticotrópica, cuya función es estimular la corteza suprarrenal.
- TSH. 201 aminoácidos. Hormona tiroestimulante, estimulante de tiroides o tirotrona estimula la liberación de hormonas tiroideas y el trofismo de los folículos tiroideos.
- LH. 204 aminoácidos. Hormona luteinizante o luteoestimulante. Estimula las células de Leydig y la función del cuerpo lúteo.
- FSH. 204 aminoácidos. Hormona foliculoestimulante o estimulante del folículo, estimula el folículo De Graaf y las células de Sertoli.

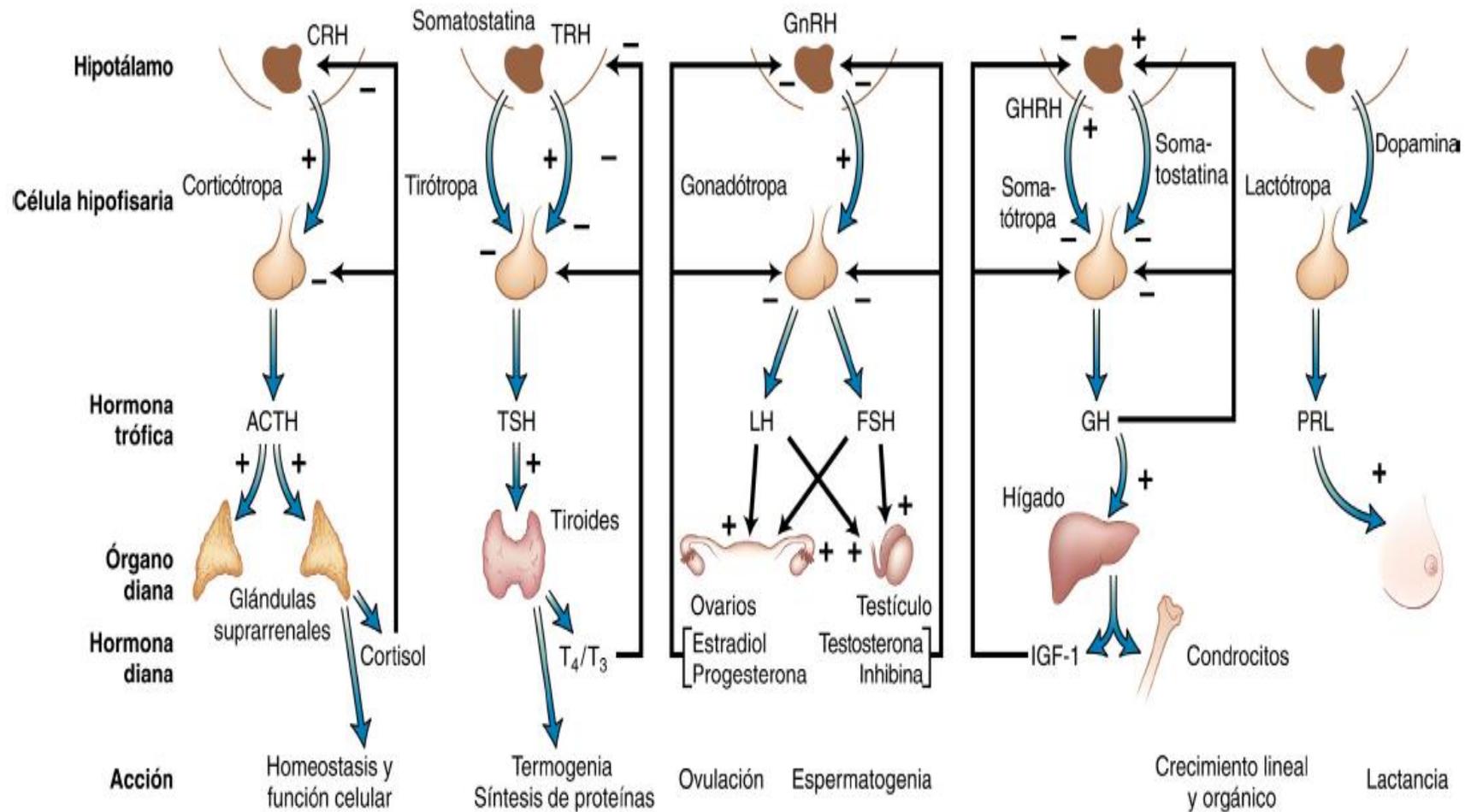


Figura No.10 Ejes hormonales hipotálamo-adenohipofisarios; CRH, hormona liberadora de corticotropina; GnRH, Hormona liberadora de gonadotropina; GHRH, hormona liberadora de hormona de crecimiento; TRH, hormona liberadora de tirotropina; ACTH, hormona adenocorticotrópina; MSH, hormona estimulante del melanocito; FSH, hormona foliculoestimulante; LH, hormona luteinizante; GH, hormona del crecimiento; TSH, TRH hormona estimulante de la tiroides y PRL, prolactina (28) (

### **3.7.1 Eje Lactotropo**

La prolactina es una hormona estimulante de la lactación, prepara las mamas durante la gestación (junto con los estrógenos y la progesterona) facilitando así la lactación después del parto. Producida por las células lactotropas bajo el control de un gen específico ubicado en el cromosoma 6, sin embargo, también es regulado por el gen *Pit-1*, del cromosoma 3, que regula la expresión no solo de PRL, sino que también de GH y TSH; considerándose que las tres tienen un origen filogenético común (derivan de un gen ancestral común). La prolactina estructuralmente posee 199 aa en una sola cadena con tres puentes de disulfuro y pertenece a la familia de las GH y la hormona somatomotropina coriónica o lactógeno placentario (HPL) (16) (30) (14) (11).

Posee un ritmo circadiano con pico nocturno sobre las 5:00 hrs. En la circulación predomina la forma monomérica de 23 kDa, pero también circula otra dimerica y polimérica. Su acción biológica principal es sobre la lactancia sin embargo no es la única, ya que está involucrada en la estimulación del sistema inmunitario y su exceso inhibe la función ovárica y testicular (16) (11).

#### **3.7.1.1 Células Lactotrópicas**

Los lactotropos constituyen aproximadamente el 15-20% de las células de la adenohipófisis, y llegan a ocupar el 70% de la glándula durante el embarazo, sintetizan y segregan prolactina. Son pequeñas y poliédricas. Unas poliédricas están dispersas por la hipófisis, y otras más pequeñas y con gránulos menores se localizan en el centro o partes laterales. Se origina de células progenitoras comunes a las células somatotropas y persisten a veces células con capacidad de segregar ambas hormonas: hormona del crecimiento y prolactina (15) (11) (16).

#### **3.7.1.2 Regulación PRL**

Su regulación la realiza el hipotálamo (Figura 10) de forma predominante por la acción inhibitoria de la dopamina que se produce en las células tuberoinfundibulares y actúan a través de los receptores D<sub>2</sub> de las células lactótropas (16).

La PRL es la única hormona hipofisaria que se halla sometida a un control negativo por el hipotálamo (Figura 11). Es la única hormona hipofisaria cuyo regulador hipotalámico no es un péptido sino una amina, la dopamina.

La secreción de PRL se regula exclusivamente por variaciones en la secreción hipotalámica de dopamina que inhibe la liberación de PRL a través de los receptores específicos de la célula lactótropa. La secreción de PRL se produce en pulsos a lo largo del día y, en especial, al comienzo de la noche sin relación con las fases del

sueño. Los estrógenos estimulan la liberación de PRL y la hiperplasia de las células lactótropas, con lo que aumenta el volumen de la hipófisis en situaciones como el embarazo.

La lactación, el coito en la mujer, y el hipotiroidismo en ambos géneros, eleva las concentraciones circulantes de PRL, por lo cual el parámetro utilizado en la práctica clínica es la determinación de PRL en plasma (30) (15).

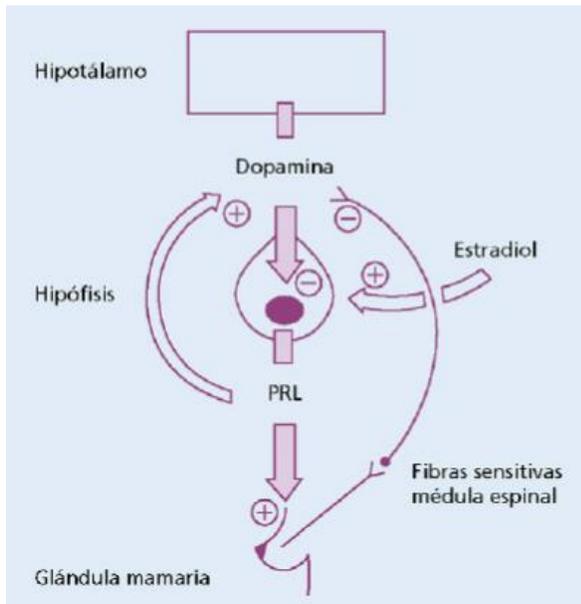


Figura No.11 Regulación de la secreción de prolactina donde la dopamina es la que actúa como un factor inhibitorio, está llega a través de los vasos porta a la célula lactotropa e inhibe la secreción de PRL. Al aumentar la prolactina se estimula la liberación de dopamina en el hipotálamo. El estradiol y la progesterona actúan en forma de retroalimentación positiva estimulando así su secreción directamente (30).

### 3.7.1.1 Fisiología

La prolactina es clave para la supervivencia de la especie humana, dado que es responsable de la producción de leche durante el embarazo y la lactancia. Durante el embarazo, la prolactina prepara la lactación y, tras el parto, mediante concentraciones adecuadas de estrógenos y progesterona, estimula la síntesis de proteínas específicas de la leche. Después del parto y durante el amamantamiento, el estímulo de succión sobre el pezón produce una señal nerviosa que se transmite por vía espinal hasta el hipotálamo, donde provoca una inhibición de la secreción de dopamina y la siguiente descarga de PRL. Este estímulo provoca también una descarga de oxitocina que contrae los folículos mamarios para su eyección. Cuando cesa el amamantamiento, el sistema vuelve a la situación anterior al parto. Otras funciones que seleccionan a la prolactina incluyen los efectos metabólicos y reproductores, el desarrollo de las mamas, la supervivencia en agua dulce, la síntesis de melanina, la muda y el comportamiento

parental. Su ausencia impide la lactación y su hipersecreción produce hipogonadismo en ambos géneros, al suprimir la secreción hipotalámica Gn-RH (30) (15) (11).

### **3.7.2 Eje Corticotropo ACTH**

La ACTH es un péptido monocatenario de 39 aa producido por las células corticotropas de la hipófisis, a partir de un péptido de mayor tamaño la proopiomelanocortina (POMC). Su biosíntesis tiene lugar a partir de un precursor de 241 aa, POMC. Su control genético radica en un gen del cromosoma 2 (2p23). La función de la ACTH es estimular la corteza suprarrenal para la producción de hormonas esteroideas principalmente cortisol (30) (10) (31).

#### **3.7.2.1 Células adrenocorticotropas**

Las células corticotropas constituyen un 20% de las células funcionales de la adenohipófisis y son el tipo de células que se detectan en la hipófisis fetal humana, apareciendo hacia la 8ª semana de gestación. Las células corticotropas se agrupan principalmente en la cuña hipofisaria mediana central. Se trata de células grandes regulares, y sus rasgos ultraestructurales incluyen gránulos de neurosecreción prominentes, retículo endoplasmático e inclusive pueden contener vacuolas. Son células poligonales, ovoides o angulares con un núcleo celular excéntrico; sus gránulos secretores se encuentran en los márgenes celulares. La secreción de ACTH está controlada por la hormona estimulante de corticotropina (10) (15) (11) (32).

#### **3.7.2.2 Regulación de ACTH**

La secreción de ACTH es pulsátil y sigue un ritmo circadiano característico con un patrón de sueño normal, la concentración de ACTH alcanza su punto máximo a las 6:00 hrs y un mínimo a medianoche, la secreción de glucocorticoides suprarrenales, mediada por la ACTH, sigue un patrón diurno paralelo. La regulación negativa del eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal (Figura 10 y 12) mediada por los flujos glucocorticoides es resultado tanto de la supresión de la CRH hipotalámica como de la atenuación directa de la expresión del gen POMC en la hipófisis y la liberación de ACTH. En contraste, cuando se pierde la inhibición por retroalimentación que realiza el cortisol, la concentración de ACTH es excesiva (14) (15).

En cualquier momento, una situación estresante puede provocar una descarga de ACTH-cortisol, que es más intensa si el estrés es imprevisto. Fuera de situaciones de estrés o circadianas, el sistema se mantiene estable mediante la retroalimentación ejercida por el cortisol. Aunque el sistema puede regularse exclusivamente a través del complejo ACTH-cortisol, el CRH establece el nivel de equilibrio de su funcionamiento y provoca su activación ante del estrés. A pesar de que la ACTH libera otras hormonas

adrenales como andrógenos y mineralocorticoides, la variable reguladora es el cortisol cuya acción inhibitoria sobre el hipotálamo es de menor importancia que la ejercida sobre la hipófisis (30) (33).

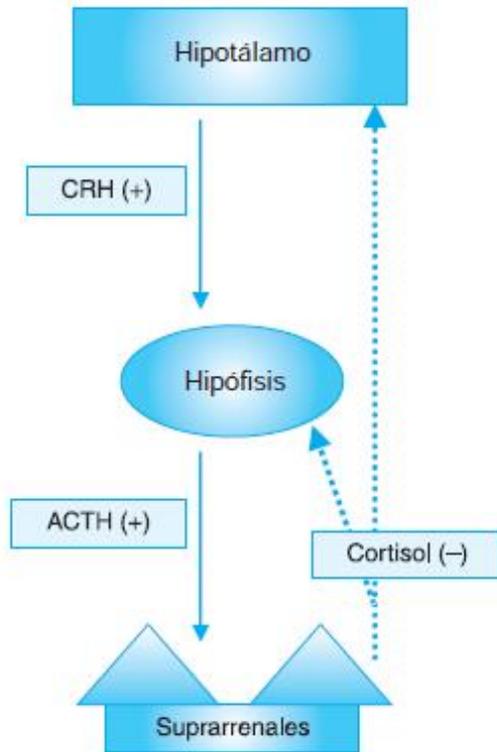


Figura No.12 Retroalimentación “*feedback*” (+/-) Eje hipotálamo-hipófisis-suprarrenal. Donde el hipotálamo estimula a la hipófisis con la liberación de CRH (+) hormona estimuladora de corticotropina que producirá ACTH hormona corticotropina (+) la cual se irrizará al torrente sanguíneo para llegar a las glándulas suprarrenales y ahí estimular la producción de cortisol (-) que permitirá su auto regulación siendo este un inhibidor de la liberación de CRH en el hipotálamo y la hipófisis (28) (33).

### 3.7.2.3 Fisiología

La función principal del eje es conservar la homeostasis del metabolismo y mediar la reacción neuroendocrina al estrés. La ACTH induce esteroidogénesis al conservar la proliferación y la función de las células suprarrenales, se encuentra implicada en la regulación del apetito, pigmentación de la piel, mantenimiento del crecimiento, inmunomodulación (modula la función de las células presentadoras de antígeno y de los linfocitos T), homeostasis del estrés etc. (13).

Las manifestaciones de la deficiencia de ACTH no se pueden diferenciar clínicamente de la deficiencia de glucocorticoides de otro origen. Estas sustancias tienen efectos pleiótopos sobre el metabolismo, el apetito, la función cardiovascular, la homeostasis de los líquidos y la inflamación (15) (33).

### **3.7.3 Eje somatotropo GH**

La hormona de crecimiento se sintetiza en la célula somatótropas de la adenohipófisis a partir de precursores mayores y regulados por un gen localizado en el brazo largo del cromosoma 17q22-24. Representa casi el 10% del total hormonal hipofisario y posee 191 aminoácidos en cadena única, con dos puentes de disulfuro. La mayoría con un peso molecular de 22 KDa y un 5-10% como 20 KDa. Es monocatenaria y presenta numerosas similitudes con la PRL y el lactógeno placentario o somatomotropinas, todos ellos pertenecen a la gran familia de las interleucinas y regulan el crecimiento somático y el metabolismo general. La secreción de GH tiene lugar en varias descargas a lo largo del día que dura entre 1-2hrs. Una de las descargas más características es la que ocurre durante el sueño profundo o sueño III-IV. Las concentraciones de GH y su subproducto, son más altas en la adolescencia y en las mujeres y decrece paulatinamente con la edad (15) (30).

#### **3.7.3.1 Células Somatótropas**

Las células somatótropas sintetizan y segregan hormonas de crecimiento o somatotropina. Constituyen el 35-45 % del total de células y se localizan en las alas laterales de la adenohipófisis (30).

#### **3.7.3.2 Regulación**

La regulación de la hormona de crecimiento es pulsátil y se hace fundamentalmente por dos hormonas hipotalámicas (Figura 10 y 13), una estimulante la hormona liberadora de la GH (GHRH) y otra inhibidora SST (somatostatina). Los cuales promueven la síntesis y liberación de la GH inhibe la liberación de esta, respectivamente.

Recientemente se descubrió otro péptido estimulador de la GH llamado Ghrelina, el cual potencia la acción de la GHRH.

El factor de crecimiento insulínico IGF-I, producido por el hígado como respuesta de la GH circulante, inhibe la secreción de la GH por dos mecanismos, aumentando la síntesis de somatostatina y actuando directamente sobre la hipófisis al contrario una disminución de los niveles del IGF-I, como ocurre durante el ayuno prolongado, lleva a un aumento compensatorio de la secreción de la GH (15) (16).

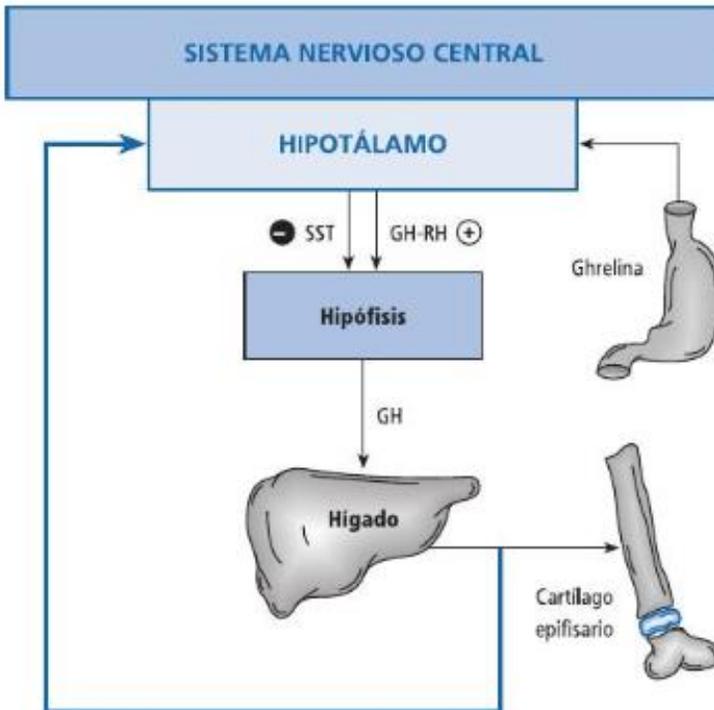


Figura No.13 Eje hipotálamo-hipófisis- somatotrofo, GH hormona de crecimiento, IGF-I factor de crecimiento insulínico tipo I (16).

### 3.7.3.3 Fisiología

La hormona de crecimiento posee funciones biológicas anabólicas, diabetógenas, y lipolíticas. Su acción es directa en el hígado, los músculos, el tejido adiposo y sobre el metabolismo hidrocarbonado. Pero su acción estimulante del crecimiento es mediada por la somatomedina C o factor de crecimiento insulínico tipo1 (16).

### 3.7.4 Eje Tirotrópo

El sistema hipotalámico-hipofisario-tiroideo juega un papel esencial en el desarrollo, el crecimiento y el metabolismo celulares, y la disponibilidad y la acción de la hormona tiroidea vienen controladas por mecanismos complejos a nivel tisular (15) (34).

La TSH es una hormona glucoproteica, corresponde a un heterodímero de 28 kDa que comprende dos subunidades alfa (localizado en el cromosoma 6) y beta (localizado en el cromosoma 1) (15).

Este eje interviene en tres escalones hormonales sucesivos como etapa previa a la acción biológica en los tejidos periféricos. Así, mediante la secreción de TRH el

hipotálamo regula la producción de TSH por las células tirotropas. La TSH, a través de la circulación general, estimula los folículos para liberar las hormonas tiroideas  $T_3$  y  $T_4$ , las cuales ejercen sus acciones biológicas en los tejidos periféricos e inhiben la operación de TSH en la hipófisis, con lo que se cierra el circuito (30) (34).

### 3.7.4.1 Células Tirótropas

Las células tirotropas representan aproximadamente un 5% de todas las células funcionantes de la adenohipófisis y se localizan principalmente en las regiones anteromediales de la glándula. Son más pequeñas que otros tipos celulares y tienen forma irregular, con núcleos aplanados y gránulos de secreción relativamente pequeños, que oscilan entre 120 y 150  $\mu\text{m}$  (15).

### 3.7.4.2 Regulación

La TSH exhibe un ritmo de circadiano, con concentraciones más elevadas en la noche. Además de las hormonas tiroideas, la TSH (Figura 10 y 14) se regula negativamente por glucocorticoides y somatostatina y positivamente por los estrógenos. La relevancia de estas regulaciones secundarias se desconoce. La administración de TRH provoca una respuesta secretora de TSH indicativa de que las células secretoras de TSH de la hipófisis funcionan normalmente. Las células tirotropas hipofisarias actúan no solo como el lugar de regulación, sino también como un comprador, ya que el organismo considera que las concentraciones de hormonas tiroideas en la hipófisis son representativas de las que existen en otros tejidos (30) (34)

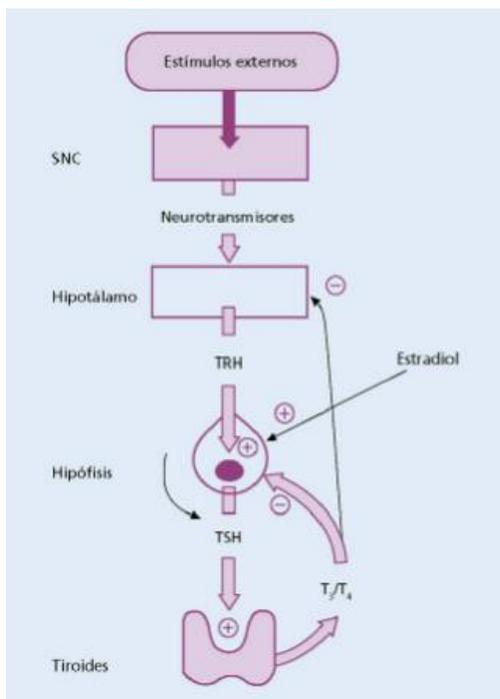


Figura No. 14 Retroalimentación del eje tirotrópico

### **3.7.4.3 Fisiología**

Las funciones en las que están implicadas las hormonas tiroideas son regulación de la termogénesis, regulación de la frecuencia cardiaca, regula la velocidad en la que se quema calorías lo cual afecta en la pérdida o aumento de peso, interviene en el proceso de motilidad intestinal y metabolismo basal (16).

### **3.7.5 Eje Folículo estimulante-luteinizante**

El eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HHG) está constituido en el hipotálamo por la neurohormona Gn-RH que actúa mediante la liberación en la hipófisis de dos hormonas bicatenarias, glucoproteicas y producidas en la misma célula (célula gonodotrópa), la LH y la FSH. Estas hormonas actúan sobre las gónadas e intervienen en un gran número de procesos y la secreción de una vasta cantidad de hormonas peptídicas y esteroideas. La regulación de este eje es diferente en la mujer y el varón (30).

La LH y la FSH actúan sobre los ovarios y testículos para dirigir la gametogenia y la síntesis de hormonas esteroideas sexuales. Como muestra de su importante papel, la síntesis y la secreción de LH y FSH están sometidas a una regulación compleja por las aferencias hipotalámicas mediante retroalimentación negativa y positiva ejercida por las hormonas esteroideas sexuales y peptídicas gonadales y mediante la modulación paracrina por factores locales elaborados dentro de la propia hipófisis (15).

#### **3.7.5.1 Células Folículo estimulantes**

Las células gonadótropas representan aproximadamente un 10-15% de todas las células funcionales de la adenohipófisis; son ovoides, de tamaño pequeño o mediano, se localizan en su mayoría en la pars distalis. Las gonadótropas son una estirpe celular heterogénea que tiene cuerpos celulares grandes con prominente retículo endoplásmico rugoso y aparato de Golgi, sintetizan y secretan gonadotropinas (hormona foliculoestimulante FSH, hormona luteinizante LH), activina y folistatina (15) (16).

#### **3.7.5.2 Regulación**

Unos pocos miles de neuronas hipotalámicas productoras de Gn-RH que integran señales de neurotransmisores, regulan la secreción hipofisaria de LH y FSH (Figura 10). El patrón pulsátil de Gn-RH es variable y su actividad está sometida a la acción de *Feedback* tanto estimuladora como inhibidora de los glucocorticoides y de las hormonas proteicas gonadales. La pulsatilidad de Gn-RH se traduce en una pulsatilidad secretora de LH y FSH por la hipófisis y, finalmente, en un patrón pulsátil en las gónadas (Figura 15). Las concentraciones de gonadotropinas son muy bajas en niños y en la pubertad se hacen pulsátiles durante la noche y, posteriormente, durante todo el día.

En la mujer, la pulsatilidad de Gn-RH controla tanto la actividad del sistema reproductivo como su inhibición. Una exposición elevada de Gn-RH tiene el efecto paradójico de desensibilizar los receptores hipofisarios y bloquear la liberación de LH y FSH (15)

Aunque la FSH y la LH se secretan en forma pulsátil, la primera tiene una vida media más larga, de modo que los niveles de FSH fluctúan durante el día.

La FSH y la LH regulan la función ovárica y testicular. La FSH estimula el crecimiento de las células de la granulosa de los folículos ováricos y regula la aromatasas responsable de la formación de estradiol en estas células. La LH estimula las células de la teca ovárica para producir andrógenos, los cuales difunden a las células de la granulosa para convertirse en estrógenos. La concentración de LH es máxima 12 a 24 horas después del pico de estradiol, el principal estrógeno, lo que induce la ovulación. Después de esta, la LH contribuye a la formación del cuerpo lúteo (15)

Los pulsos de LH y FSH tienen gran relevancia en la mujer. Durante la fase folicular, la mayoría de los pulsos de LH se siguen de un pulso de estrógenos, y durante la fase media y avanza de la fase lútea los pulsos de LH estimulan la secreción de progesterona y de estradiol por el folículo. El estradiol, que junto a la progesterona ejerce normalmente una retroalimentación negativa sobre la secreción de LH, se transforma en estimulante, en esta fase del ciclo, e induce una descarga elevada de LH que provoca la ovulación (15) (30).

Por otro lado, en los varones no hay retroalimentación positiva ni tampoco está descargada de LH; el sistema, por tanto, es más simple y solo es operativa la retroalimentación negativa.

La testosterona y su metabolito activo, la dehidrotestosterona, inhibe la liberación de LH y de FSH, a través de acciones hipofisarias y también hipotalámicas. La retroalimentación negativa de la gónada sobre la secreción de FSH se ejerce a través de una hormona peptídica, la inhibina, que se sintetiza en las células de la capa granulosa ovárica y en las células de Sertoli. La producción gonadal de otra hormona proteica, la activina, estimula la liberación de FSH por la hipófisis (30).

El control hipotalámico de LH y FSH es muy sensible a condiciones ambientales como estrés o cambios nutricionales o de la homeostasis energética. El estrés mental o psicológico o una reducción en la ingesta calórica habitual inhiben la secreción de Gn-RH, lo cual se traduce en una reducción de LH y FSH y su pulsatilidad y se manifiesta tanto en hombres como en mujeres en signos y síntomas como disminución de la fertilidad, reducción de la actividad sexual, retraso de la pubertad, atrofia gonadal y ovárica (30).

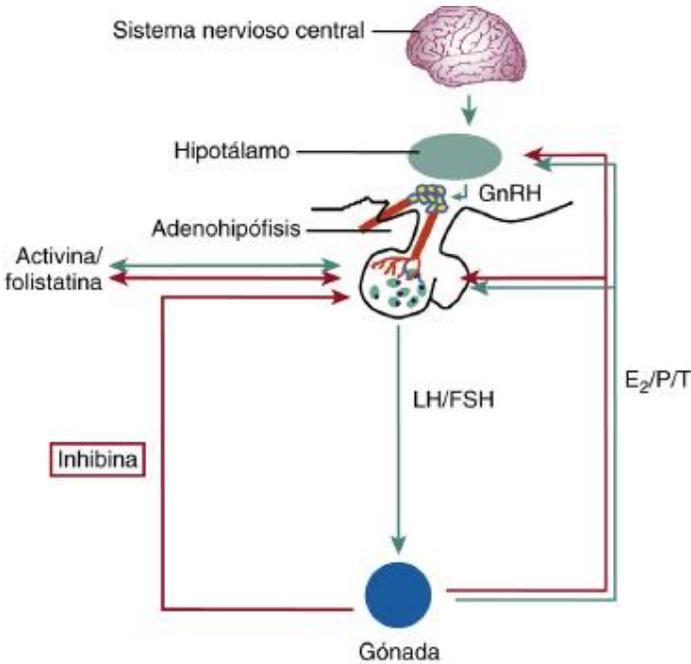


Figura No. 15 Regulación del eje Hipotálamo- Hipófisis - Gónadas (15).

### 3.7.5.3 Fisiología

Las principales dianas de FSH y LH son las gónadas y, por eso, sus dianas y efectos son distintos en el hombre y la mujer. De forma muy general estas juegan un papel clave en el desarrollo reproductor, la pubertad y la fertilidad. La reproducción es una función muy controlada, que depende de factores genéticos, nutricionales, ambientales etc. (15)

### 3.8 Adenomas hipofisarios

Al igual que cualquier otro órgano en el cuerpo humano, la hipófisis no está exenta de generar neoplasias; en las cuales tiende a predominar un tipo de célula cuya secreción hormonal específica obviamente altera, en sentido positivo o negativo, la función del órgano blanco correspondiente (3) (15).

Los adenomas de la hipófisis son los tumores intracraneales más frecuentes del sistema nervioso central, representan la segunda neoplasia intracraneal en orden de frecuencia y se originan a partir de células productoras de hormonas en la hipófisis anterior.

En condiciones normales, la hipófisis controla la secreción de hormonas producidas por otras glándulas endocrinas por efecto de TSH, ACTH, FSH, LH, GH y PRL. Por lo general, la secreción hormonal se mantiene en concentraciones adecuadas

a través de mecanismos que condicionan inhibición o estimulación para su liberación. Este control se logra mediante asas de retroalimentación entre los ejes hipotálamo-hipófisis-órgano diana.

Sin embargo, los adenomas que se desarrollan en la glándula hipofisaria denominados funcionantes se caracterizan por una secreción excesiva de hormonas hipofisarias que dan lugar a un síndrome clínico característico, cuya repercusión, en ocasiones grave, compromete la calidad y las expectativas de vida de los pacientes no solo por la propia enfermedad, sino, por sus secuelas. Además de los tumores secretores, se encuentran los denominados no funcionantes porque no expresan ningún síndrome clínico relacionado con hipersecreción hormonal, excepto los síntomas relacionados con el efecto masa debido al aumento del tamaño tumoral (7) (28)

Es imprescindible conocer la patogenia de los tumores hipofisarios: si muestran alteraciones moleculares en factores hipotalámicos, elementos de traducción de señal o proteicas, rutas secretoras alteradas y así permitir determinar el fenotipo y las características específicas del comportamiento tumoral. En la actualidad, la casi totalidad de los fármacos disponibles para el tratamiento de los diferentes tumores funcionales de la hipófisis se refiere a la utilización de análogos de somatostatina, agonistas de dopamina y, en el caso de los pacientes con acromegalia, a la utilización de un antagonista del receptor de hormona de crecimiento (7) (35).

### **3.8.1 Etiología**

Los adenomas hipofisarios corresponden a neoplasias en su mayoría benignos, tienen un origen monoclonal es decir para que una célula o estirpe celular cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica debe ocurrir mutaciones genéticas y alteraciones en los mecanismos moleculares que conducen a alteraciones en los genes. En ese sentido el proceso de tumorigénesis consta de las etapas de: iniciación, promoción y progresión. Los AH tanto los funcionantes como no funcionantes carecen de la capacidad de transformación maligna y la capacidad de invadir estructuras adyacentes, sin embargo, se desconoce la causa de esto, pero algunas hipótesis sugieren que, al estar situada en la silla turca del esfenoideas, está la aísla de alguna manera con el resto de las estructuras no obstante la hipótesis debe comprobarse (7) (15) (35).

Estos adenomas benignos monoclonales expresan y secretan hormonas de forma autónoma y ocasionan hiperprolactinemia, acromegalia, enfermedad de Cushing e hipertiroidismo, o bien pueden ser asintomáticos a nivel funcional y diagnosticarse como masas selares. Aunque casi invariablemente son asintomáticos, las características neoplásicas de estos adenomas indican una singular biología tumoral, que se refleja en sus importantes manifestaciones locales y sistémicas. Estas neoplasias tienen un tiempo de duplicación lento y en raras ocasiones remiten de forma espontánea (15) (35).

### 3.8.2 Fisiopatología

La patogenia de los adenomas hipofisarios se caracteriza por una combinación de proliferación celular y una secreción hormonal desregulada sobre todo en los adenomas hipofisarios funcionantes. Los mecanismos subyacentes no están bien establecidos y constituyen una de las líneas de investigación más activas en el campo de la neuroendocrinología experimental.

Tradicionalmente se han ofrecido dos teorías para explicar la patogenia de los adenomas hipofisarios. Por una parte, se ha sugerido que puede deberse a una estimulación patológica de la actividad de las células adenohipofisarias por factores de crecimiento. Por otra parte, es cada vez más sólida la doctrina que fundamenta que, al igual que ocurre unos muchos otros tipos de tumorales, los adenomas hipofisarios son neoplasias en las que el paso inicial en el desarrollo tumoral incluye un evento genético somático que le confiere las características del crecimiento tumoral. Una tercera alternativa, y quizás la más probable, surge de la combinación de estas dos teorías, es decir que la tumorigénesis hipofisaria sea causa de una combinación de defectos genéticos y también de la sobre activación celular por factores endocrinos o paracrinos (7).

Por otra parte en los últimos años se han identificado un gran número de factores extrínsecos e intrínsecos que podrían estar implicados en la formación y progresión de los tumores hipofisarios, se han encontrado alteraciones en los niveles de receptores de membrana, factores de crecimiento, reguladores del ciclo celular, oncogenes, genes supresores de tumores, vías moleculares y rutas de señalización celular, sin embargo, las causas genéticas iniciadoras de estas alteraciones no han sido todavía dilucidadas (7).

### 3.8.3 Clasificación

El comportamiento biológico de los tumores de la hipófisis es diferente en lo que respecta a la producción hormonal y a su capacidad de invasión, lo que depende de su citodiferenciación, de ahí que existan diferentes tipos de tumores.

Se pueden clasificar según su tamaño en: macroadenomas y microadenomas o también como adenomas hipofisarios funcionantes o no funcionantes (28).

Existen diferentes formas de clasificar los adenomas hipofisarios. La segunda tiene su origen en la característica *sui generis* de estos tumores de secretar hormonas. Por lo tanto, la forma de dividirlos es en funcionantes y no funcionantes. El termino adenomas funcionantes se refiere a la producción en exceso de hormonas hipofisarias que producen los síndromes de amenorrea-galactorrea, acromegalia y la enfermedad de Cushing. Existen otros síndromes poco frecuentes son el hipertiroidismo y el hipogonadismo secundarios.

Cerca del 70% de los tumores hipofisarios son considerados funcionantes ya que secretan hormonas de forma autónoma. Es decir que no se encuentran bajo el control que normalmente ejercen las tasas de retroalimentación negativa, y, por lo tanto, producen un exceso de hormonas; por el tipo de hormona que producen se clasifican en: prolactinomas, somatotropinoma, corticotropinoma y tirotropinoma. Estos tumores funcionantes se relacionan con condiciones clínicas que resultan del exceso de producción de cada hormona.

El otro grupo de tumores se catalogan como no funcionantes o no secretores. En sentido estricto, eso del todo no es tan cierto, ya que la mayoría de estos tumores secretan hormonas gonadotropas FSH y LH, pero esta secreción no es significativamente tan elevada como el de un adenoma hipofisario funcionante, pero que, del punto de vista molecular, son biológicamente inactivos por lo que no se expresan clínicamente (2).

Son clínicamente no funcionantes y representan el 30% restante de los tumores hipofisarios los cuales se caracterizan por no hipersecretar hormonas. Conforme los tumores crecen pueden generar síntomas relacionados con la falta o sobreproducción de hormonas, con invasión de estructuras vecinas como los senos cavernosos, con riesgo de parálisis de nervios craneales, cefalea o pérdida visual por compresión del quiasma óptico (28).

### **3.8.4 Epidemiología**

Los tumores hipofisarios en general, representan entre 10 y 15 % de las neoplasias intracraneales, su prevalencia alcanza una tasa de 1 por cada 1.064 habitantes, lo que representa una prevalencia de unos 77 casos por cada 100.000 habitantes. De ellos, un 60% fueron prolactinomas; un 30%, adenomas no funcionantes; un 10%, lesiones secretoras de GH, y un 2%, adenomas de Cushing. La mediana de edad en el momento de aparición fue de 37 años, aunque los tumores no funcionantes fueron los más frecuentes en los pacientes mayores de 60 años. Mediante el uso de amplios y exhaustivos registros oncológicos de base poblacional, se constató que la incidencia anual de los tumores hipofisarios ha aumentado de 2,52 por cada 100.000 habitantes en 2004 a 3,13 en 2009 y se espera una prognosis significativa en las próximas décadas. No se sabe si este incremento obedece a un verdadero aumento de la incidencia o al del número de notificaciones o diagnósticos (2) (15) (28).

En autopsias se ha reportado una prevalencia de microadenomas (incidentalomas) hasta de 25% y en estudios de imagenología se detectan pequeñas lesiones en al menos 10% de las personas sin enfermedad hipofisaria conocida (28).

### **3.8.5 Incidentalomas hipofisarios.**

Este término se refiere a las lesiones hipofisarias que se descubren en la realización de estudios de imagenología (generalmente tomografías axiales computarizadas o resonancias magnéticas) por razones diferentes a enfermedades hipotálamo-hipofisarias (2).

Es un hallazgo común. Ya que aproximadamente el 30% de la población mexicana que fallecen por diversas causas y se les realiza necropsia albergan un adenoma hipofisario por lo que está subestimado este problema de salud pública (2).

Si la anomalía estructural de la hipófisis se descubrió con una tomografía computarizada, el paciente probablemente necesita una resonancia magnética, la cual da más resolución y más detalles (2).

### **3.8.6 Actividad trófica hipofisaria**

Los adenomas monoclonales benignos de los humanos se originan en células hipofisarias diferenciadas. Las señales tróficas hipofisarias pueden favorecer o restringir la expansión de una población de células tumorales monoclonales, dado que regulan el medio interno intrahipofisario (15).

Los tejidos hipofisarios normales e hiperplásicos son policlonales, y los adenomas hipofisarios aparecen como consecuencia de una proliferación monoclonal de células hipofisarias. Posiblemente una alteración genética intrínseca somática en las células hipofisarias da lugar a la expresión clonal de una sola célula, con la consiguiente formación de un adenoma (15).

El tejido de la adenohipófisis que rodea a los tumores hipofisarios no es hiperplásico en general, lo que indica que las hormonas hipotalámicas, los factores de crecimiento hipofisarios y las hormonas esteroideas sexuales favorecen un entorno permisivo, que potencia las mutaciones de las células con el consiguiente crecimiento del tumor (15).

### **3.8.7 Factores hormonales**

Los factores hipotalámicos desempeñan un papel específico en la patogenia de los tumores hipofisarios, además de regular la expresión de los genes y la secreción de las hormonas hipofisarias (15).

La secreción hormonal adenomatosa suele ser independiente del control hipotalámico fisiológico, y la resección quirúrgica de los adenomas pequeños delimitados favorece la curación definitiva de la hipersecreción hormonal. Tales observaciones indican que estos tumores no se desarrollan por proliferación policlonal excesiva de las células hipofisarias en un contexto de estimulación hipotalámica

generalizada. Sin embargo, los factores hipotalámicos fomentan y mantienen el crecimiento de las células hipofisarias adenomatosas ya transformadas (15).

### **3.8.8 Adenomas Hipofisarios Clínicamente No Funcionantes (AHNF)**

Los AHNF representan el 30% del total de los tumores hipofisarios, se clasifican desde el punto de vista clínico como gonadotropinomas los cuales representan la gran mayoría, adenomas silentes capaces de sintetizar, pero no secretar otras hormonas hipofisarias, y adenomas de células nulas que no producen ni secretan ningún tipo de hormona sin embargo; el no hipersecretar hormonas excesivas no quiere decir que no secreten hormonas ya que en las pruebas de inmunohistoquímica se ha demostrado que la mayoría de los adenomas hipofisarios no funcionales están formados por células las cuales tienen producción activa de hormonas hipofisarias FSH y LH solo el 20-40% son negativos para la misma y se denominan adenomas de células nulas (2) (7) (28).

La mayoría de los AHNF recibe atención médica dirigida a los síntomas y signos clínicamente asociados al efecto masa del tumor sobre los tejidos adyacentes. Debido al uso tan habitual hoy en día de las técnicas de imagenología, se han incrementado los hallazgos de AHNF de forma casual. Los AHNF solo causan signos y síntomas clínicos cuando, debido a su tamaño, afecta al quiasma óptico, ya que además aumentan la presión intracraneal o comprimen el tallo hipofisario, entre los cuales destacan: cefalea, trastornos visuales o deficiencias hormonales, como hipocortisolismo, hipotiroidismo, hipogonadismo o hiposomatotropismo, o bien, ser por completo asintomáticos y detectados por primera vez de manera incidental.

Aproximadamente el 50% de los pacientes muestran síntomas relacionados con el hipopituitarismo que provoca. El eje gonadal es el que más suele estar afectado (en el 77% de los casos), seguido de los ejes adrenales (el 28%) y tirotrópos (en el 22%) (2) (7) (35).

El diagnóstico de los AHNF surge normalmente de la detección de algún síntoma. El diagnóstico definitivo se basa, principalmente, en pruebas de imagenología (estándar de oro), siendo la tomografía axial computarizada la técnica de elección por su gran nivel de resolución (7).

Como parte del estudio diferencial, además de las pruebas de imagenología, es importante hacer una evaluación hormonal de las concentraciones de prolactina, T4 libre, TSH, cortisol, estradiol o testosterona, LH, FSH, GH e IGF-1. Sin embargo, la mayoría de los AHNF, de hecho, sintetizan gonadotropinas o subunidades, pero no son clínicamente relevantes ya que en la determinación de estas hormonas sus valores se encuentran dentro rango de referencia (7) (28).

### 3.9 RNA no codificantes

Una de las grandes sorpresas de la biología moderna fue el descubrimiento de que el genoma humano presenta 20,000 a 24,000 genes codificadores de proteínas, lo que representa el 2% de la secuencia total del genoma. Con las nuevas tecnologías de secuenciación del genoma completo y transcriptoma se determinó que al menos el 90% del genoma se transcribe activamente. Se descubrió que el transcriptoma humano era más complejo que una colección de genes que codifican proteínas y sus variantes de empalme. Aunque inicialmente se argumentó que era ruido de transcripción, la evidencia reciente sugiere que la proverbial "materia oscura" del genoma puede desempeñar un papel biológico importante en el desarrollo y el metabolismo celular. Uno de esos jugadores, son los RNA no codificante (ncRNA) los cuales han demostrado patrones de expresión específicos en el desarrollo y regulación aberrante en una gran variedad de enfermedades, incluido el cáncer (36).

Los ncRNA's regulan el procesamiento postranscripcional del RNA mensajero complementario, conduciendo a la represión de la transcripción o al clivaje del mRNA. Actualmente se conoce que son expresados en forma endógena en la mayoría de los eucariotas. Sin embargo, la expresión de los ncRNA's es altamente específica en ciertos estados del desarrollo o de un tejido en particular (37) (38) (39).

Los RNA no codificante (ncRNA) se dividen en dos grandes grupos:

- RNA pequeños no codificantes
  - a. microRNA's
  - b. RNA interferentes pequeños (siRNA) endógenos
  - c. RNA asociados a Piwi (piRNA).
- RNA largos no codificantes (lncRNA)
  - a. LincRNA's (RNA intergénico largo no codificante)
  - b. LincRNA's (RNA intrónicos largos no codificantes)
  - c. LincNAT largas transcripciones anti sentido de naturaleza no codificante

#### 3.9.1 RNA pequeños no codificantes

Existen diversos tipos de RNA pequeños con capacidad de silenciar genes. Estos RNA no codificantes son generalmente clasificados de acuerdo con su longitud, en RNA's no codificantes cortos y largos. Al menos tres RNA pequeños son codificados en nuestro genoma: los microRNA's, los RNA interferentes pequeños (siRNA) endógenos y los RNA asociados a Piwi (piRNA). Estos pequeños RNA's, cumplen funciones regulatorias y están involucrados en procesos de silenciamiento o apagado de genes y en la actualidad son objeto de amplios estudios (38) (40) (41).

### **3.9.2 MicroRNA's**

Los microRNA's son RNA pequeños de aproximadamente 22 nucleótidos de longitud, no codifican para productos proteicos y son generados de transcritos endógenos que pueden formar estructuras en forma de horquilla. Los microRNA's conforman una gran familia de genes reguladores postranscripcionales que controlan muchos procesos celulares, cumpliendo una gran cantidad de funciones. Se estima que el 30% de todos genes humanos son regulados por mecanismos dependientes de microRNA's y que un solo microRNA puede regular alrededor de 200 diferentes transcritos y que estos a su vez pueden funcionar en diferentes vías moleculares en la célula, del mismo modo un mismo mRNA puede ser regulado por múltiples microRNA's. Muchos genes de microRNA humanos están fácilmente localizados en sitios frágiles y regiones genómicas asociadas con cáncer, por lo que su alteración está relacionada con su desarrollo. Con el avance de los métodos computacionales y al uso de la bioinformática ha sido posible determinar su amplia distribución en el genoma y sus funciones en diferentes tejidos, sobre todo en la regulación de la expresión de los genes. Actualmente, existe una gran cantidad de datos e información sobre microRNA's, prueba de ellos son 2600 secuencias de microRNA's de *Homo sapiens* que han sido descritas y almacenadas en la base de datos miRBase (37) (38) (42) (43) (Revisado en febrero 2022).

#### **3.9.2.1 Importancia biológica de los microRNA's**

Los microRNA's tienen diferentes funciones regulatorias a nivel del desarrollo y proliferación celular en diferentes organismos. De igual forma, los microRNA's median diferentes procesos en la tumorigénesis, inflamación, regulación del ciclo celular, respuesta a estrés, diferenciación, apoptosis e invasión (38).

Algunos microRNA's también actúan como oncogenes y genes supresores de tumor, a estos microRNA's se les denomina en inglés como "oncomirs" y presentan diferentes patrones en sus funciones, tasa de evolución, expresión, distribución cromosómica, tamaño molecular, factores de transcripción y genes blancos. Dada la importancia de los microRNA's en los procesos de tumorigénesis y su expresión en enfermedades específicas, tienen un gran potencial como blancos terapéuticos y también como marcadores moleculares para pronóstico y diagnóstico de cáncer. Por lo que se ha propuesto que la manipulación de la actividad y biogénesis de los microRNA's podría en un futuro ser una estrategia para el desarrollo de terapias eficaces contra el cáncer (42) (44).

### 3.9.2.2 Localización y estructura de los microRNA's en el genoma

Los genes codificadores para microRNA's pueden estar localizados en diferentes regiones del genoma. Con base en lo cual son clasificados en:

- microRNA's exónicos localizados en transcritos no codificantes
- microRNA's intrónicos localizados en transcritos no codificantes
- microRNA's intrónicos localizados en transcritos codificantes para proteínas
- microRNA's exónicos localizados en transcritos codificantes para proteínas.

Además, existen también algunos microRNA's ubicados en unidades transcripcionales que son expresados en grupo (38).

### 3.9.2.3 Procesamiento de los microRNA's.

Los microRNA's en una gran proporción son generados a partir de un transcripto primario largo, en un proceso secuencial de dos reacciones las cuales son guiadas por Drosha y Dicer, en la llamada vía canónica de generación de microRNA's. Sin embargo, no es la única vía ya que actualmente han sido descritos microRNA's generados por vías alternas llamadas vías no canónicas, muchos de los microRNA's procesados por estas vías no satisfacen como tal la definición clásica de microRNA's (45).

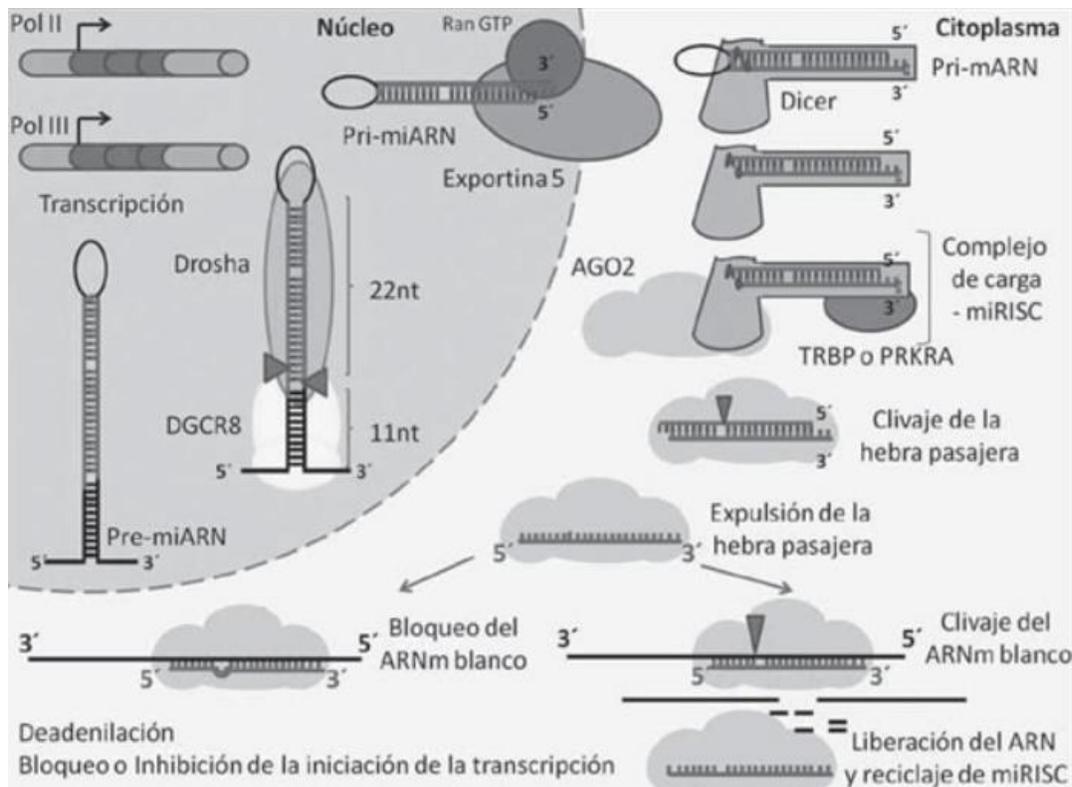


Figura No. 16 Biogénesis de microRNA's (37)

#### 3.9.2.4 Biogénesis de microRNA's vía canónica

En la vía canónica (Figura 16) los microRNA's, son inicialmente transcritos en el núcleo a partir de precursores largos de RNA llamados microRNA's primarios o (primicroRNA's). La transcripción de los genes de microRNA's generalmente es mediada por la RNA polimerasa II; sin embargo, un grupo menor de microRNA's asociados con repeticiones Alu pueden ser transcritos por la RNA Polimerasa III.

Los (pre-microRNA's) generados por la ARN polimerasa II tienen generalmente varios kb de longitud y contienen estructuras en forma de horquilla compuesta de un tallo y un bucle. En el primer paso de la maduración de los pre-microRNA's, Drosha cliva el tallo de la estructura larga de RNA en forma de una horquilla pequeña y permite su liberación. Para ello, Drosha necesita un cofactor, DGCR8; juntos Drosha y DGCR8 forman el complejo del microprocesador.

Un pre-miRNA's típico en metazoos consiste en un tallo de aproximadamente 33 pares de base, un bucle terminal y segmentos flanqueantes de RNA de cadena sencilla (ssRNA). La proteína DGCR8 interactúa con los pre-microRNA's a través de los segmentos de ssRNA y el tallo, permitiendo que Drosha realice el clivaje aproximadamente 11 pares de bases, contadas a partir de la unión ssRNA, dsRNA.

El complejo microprocesador genera una horquilla de 70 nucleótidos, llamado precursor de microRNA's (pre-microRNA's). Los pre-microRNA's poseen dos nucleótidos colgantes en su extremo 3' y un grupo fosfato en el extremo 5', lo cual es característico de los RNA procesados por la Ribonucleasa III. Finalmente, los pre-microRNA's son exportados del núcleo al citoplasma por medio de la exportina 5. En el citoplasma, los pre-microRNA's son reconocidos por el complejo de procesamiento de pre-microRNA's formado por Dicer, la proteína de unión a RNA en respuesta a transactivación y la proteína quinasa activadora dependiente de RNA de cadena doble inducible por interferón (PRKRA). En el complejo de procesamiento de pre-microRNA's, "Dicer" cliva los pre-microRNA's cerca del bucle terminal, generando un dúplex de microRNA maduro de aproximadamente 20-22 nucleótidos, este dúplex contiene una cadena madura de microRNA y su cadena complementaria, la cadena pasajera. Posteriormente, este complejo se ensambla con la proteína Argonauta 2, para formar el complejo silenciador inducido por microRNA's (miRISC) el cual selecciona la cadena madura o guía. La cadena guía es la responsable de dirigir el silenciamiento. Notablemente, la estabilidad termodinámica del extremo 5' de las cadenas que conforman el dúplex de microRNA maduro determina la identidad de la cadena guía y la cadena pasajera. Sin embargo, dependiendo de la complementariedad perfecta o incompleta de la cadena de microRNA a su blanco, el complejo miRISC puede conducir al clivaje y degradación del mRNA o a la inhibición de la transcripción. En caso de la inhibición en la transcripción, el mRNA reprimido es trasladado a los cuerpos P, donde puede ser destruido o relocalizado en la maquinaria transcripcional bajo la expresión de una señal celular específica. La complementariedad perfecta de bases entre la secuencia semilla del microRNA (del segundo al octavo

nucleótido del extremo 5') y la secuencia complementaria del extremo 3'UTR es lo que permite que los microRNA's modulen la expresión génica (42) (37) (38).

El complejo miRISC puede inhibir la expresión de los mRNA blancos por dos mecanismos:

1. Remoción de la poliadenilación del extremo 3' del mRNA, fomentando la actividad de las deadenilasas, seguidas por la degradación del mRNA
2. Bloqueando el paso de la iniciación o elongación de la traducción, inhibiendo el factor eucariótico de la elongación o causando un estancamiento del ribosoma.

### **3.9.3 LincRNA RNA largos no codificantes**

Los RNA's largos no codificantes (LincRNA's) son nuevos jugadores emergentes en el cáncer demostrando sus potenciales roles tanto en las vías oncológicas como en las supresoras de tumores. Estos nuevos genes son frecuentemente aberrantes en la expresión en una variedad de cánceres humanos, sin embargo, las funciones biológicas son principalmente desconocidas (36).

El genoma de los mamíferos codifica para muchos miles de grandes transcripciones no codificantes, incluida una clase de grandes ncRNA's intergénicos (LincRNA's) (36).

En eucariontes, muchos transcritos son RNA's no codificantes. Los largos no codificantes (LincRNA) son un tipo de no codificantes (ncRNA's) que generalmente no tiene el potencial de codificar para un producto proteico apreciable. La mayoría de los LincRNA's se pueden clasificar en términos muy generales en tres tipos en función de sus posiciones genómicas (36)

1) los LincRNA's transcritos de regiones intergénicas de LincRNA se conocen como LincRNA (RNA intergénico largo no codificante)

2) los LincRNA's transcritos de regiones intragénicas son RNA intrónicos largos, que pueden transcribirse en cualquier orientación con respecto a los genes codificadores

3) largas transcripciones anti sentido de naturaleza no codificante LincNAT que se superponen con regiones codificantes de proteínas o ncRNA's en la cadena opuesta y el RNA anti-sentido (36)

Los lincRNA's son definidos, como aquellos transcritos de RNA que presentan al menos 200 nucleótidos de longitud. Como regla general se asume que estos RNA's no producen productos proteicos, aunque se ha visto que algunos de ellos podrían dar lugar a pequeños péptidos funcionantes. A medida que se observaron cada vez más RNA's no codificantes en los organismos superiores, y que aumentó el número de LincRNA's identificados (alcanzando más del 65% en todo el genoma humano), los LincRNA's han comenzado a recibir mayor atención (46) (47)

Los LincRNA's comparten una serie de características comunes dentro de los vertebrados: presentan pocos exones (es decir, los segmentos que constituyen los RNA's maduros), tienen bajo contenido en las bases nucleotídicas guanina y citosina, están mucho menos conservados en las distintas especies de organismos que los RNA's codificantes, y son mucho menos abundante que estos. Asimismo, se ha evidenciado que la mayor parte de ellos son generados por la RNA polimerasa II, la misma enzima que produce los RNA's mensajeros que luego darán lugar a las proteínas, y por lo tanto la mayoría posee una cola de poliadenilada en su extremo 3' y una caperuza metilada en su extremo 5', la cual suele ser una característica típica de los RNA's mensajeros. Por otra parte, también puede generarse LincRNA's por el procesamiento de otros transcritos (46) (48)

Una característica sumamente interesante de los LincRNA's es su patrón de expresión, altamente restringido en tiempo y espacio: es decir, que distintos LincRNA's aparecen en tipos celulares determinados o momentos determinados del desarrollo, con una especificidad mucho mayor de tejido, tipo celular y etapa del desarrollo, que los RNA's codificantes. (46)

A pesar de que en promedio son detectados con no más de una copia por célula, suelen ser abundantes en algunos tipos celulares específicos e incluso en compartimientos subcelulares particulares, lo que les confiere aun mayor complejidad. (46)

### **3.9.3.1 Funciones e importancia biológica de los LincRNA's**

Si bien el estudio de los LincRNA's ha sido históricamente olvidado, en los últimos tiempos se ha comenzado a prestar particular atención a este subgrupo de RNA's, vinculándose con varios procesos biológicos como diferenciación, proliferación y migración celular, apoptosis, respuesta inmune, desarrollo tisular, etc (46).

Recientemente se ha demostrado que al menos algunos LincRNA's están asociados a procesos moleculares como regulación de la expresión de genes (a nivel de la transcripción, control de actividad de proteínas), modificaciones de la cromatina, organización de dominios nucleares, corte y empalme de RNA's mensajeros, entre otros. Más, aún, la alteración en la expresión de algunos LincRNA's se ha relacionado con la tumorigénesis: incluso podrían actuar como oncogenes (46) (49).

Aunque los roles biológicos y mecanismos de acción de estos RNA's en su mayoría aún se desconocen, existen algunos modelos que intentan explicar su funcionamiento. Se han propuesto que pudieran actuar como: competidores, al competir con otras moléculas por el sitio de unión a DNA o proteínas; reclutadores o activadores, activando modificadores del estado de la cromatina (modificaciones epigenéticas); y precursores, siendo procesados y dando lugar a pequeños RNA's entre otros mecanismos (46) (47).

### **3.9.3.2 RNA´s no codificantes largos y patologías**

Se ha sugerido que los lincRNA's estarían asociados a numerosas enfermedades, incluyendo cáncer de diferentes tipos como: renal, hepático, de mama, esofágico, colon, vejiga, neuroblastoma, próstata, leucemia y tiroides además de enfermedades inflamatorias, autoinmunes y cardiovasculares. La lista sigue actualizándose conforme se investiga la participación de estos (47).

En ese sentido, si bien históricamente las causas de la ocurrencia y avance del cáncer se han relacionado principalmente con proteínas, frecuentemente se detecta desregulación de ciertos RNA´s no codificantes en pacientes con cáncer (46) (47).

### **3.9.3.3 Localización y estructura de los LincRNA`s en el genoma**

Los ncRNA´s que no codifican para ningún producto proteico y tienen más de 200 nucleótidos de longitud se conocen como RNA no codificantes (LincRNA´s). La longitud de un lincRNA puede ser superior a 2 Kb, mientras que su potencial de codificación es inferior a 100 aminoácidos (50) (51).

Los LincRNA's se albergan principalmente en regiones mal conservadas del genoma, incluidas las regiones intrónicas de genes. Por otra parte, se ha reportado en la literatura que algunos LincRNA's se transcriben a partir de las cadenas de una secuencia de DNA dentro del locus que codifica proteínas. Las ubicaciones genómicas de los LincRNA's tienen una asociación directa con su conservación evolutiva. Se ha sugerido que una gran cantidad de LincRNA's se conservan evolutivamente, aunque en menor medida, en comparación con la de los genes codificadores de proteínas (49).

La presencia de marcos de lectura abiertos en algunos LincRNA hace que estas moléculas sean difíciles de distinguir de los RNA que codifican para productos proteicos (49).

### **3.9.3.4 Biogénesis y procesamiento de los LincRNA`s.**

El lincRNA puede ser transcrito a partir de regiones codificantes de proteínas distales del genoma por la enzima ARN polimerasa II. Luego, el LincRNA premaduro se poliadenila en 3' y se marca en el extremo 5' con metil-guanosina. A menudo se somete a un empalme alternativo, que es esencial para generar una diversidad de proteínas. El mecanismo de empalme alternativo se puede clasificar de tres maneras.

1. En primer lugar, los LincRNA interactúan con factores de empalme específicos y luego forman dúplex de RNA-RNA con moléculas pre-mRNA y, finalmente, afectan la remodelación de la cromatina, completando así el empalme de genes diana.
2. En general, los genes que codifican lincRNA tienen promotores propios, factores de transcripción y motivos de DNA únicos (51) (49).

3. La modificación epigenética juega un papel en la biogénesis de LincRNA. La metilación de histonas juega un papel importante en la regulación transcripcional.

La unión de diferentes factores de transcripción a LincRNA forma una transcripción naciente que finalmente regula el procesamiento de mRNA a través de un empalme alternativo. Esta unión de LincRNA's a mRNA puede aumentar o inhibir la traducción o puede promover la disgregación de mRNA. Existen datos experimentales que sugieren que los LincRNA's también puede codificar pequeños RNA's funcionales. Los LincRNA maduros pueden estar presentes en el núcleo y/o el citoplasma. A pesar de que los LincRNA citoplasmáticos no se traducen, se han identificado pequeños péptidos que se generan a partir de los LincRNA a través de su asociación con los ribosomas. Algunos hallazgos indican que los pseudogenes transcripcionalmente activos también pueden producir estas moléculas o también pueden transcribirse desde el promotor o las regiones intergénicas (51) (49).

### **3.9.3.5 LincRNA's en cáncer**

En el estudio hasta la fecha de este grupo de moléculas se ha encontrado que están asociadas e involucradas en varios procesos biológicos y su desregulación puede desarrollar cáncer. Estos LincRNA's controlan el empalme alternativo de varios precursores de mRNA y juegan un papel importante en la patogénesis resultante de la metástasis y la invasión celular. También pueden afectar la regulación de los genes de la matriz citoesquelética y extracelular a niveles transcripcionales y postranscripcionales (49).

### **3.10 miRNA's y LincRNA's**

Los microRNA's y LincRNA's fueron seleccionados de acuerdo con el plan estadístico desarrollado en el apartado de diseño experimental.

Para el Hsa-mir21 de acuerdo a los datos filtrados obtenidos de TAC (Anexo 2) este cumple con los requisitos propuestos en el plan estadístico con un FDR de  $1.68 \times 10^{-5}$  un P-value  $2.66 \times 10^{-7}$  y un Fold Change de -6.63 así como un log2 de 9.55 para las muestras control obtenido de la normalización y un log2 de 6.82 para las muestras AHNF, esto último relacionado con los log2 puede visualizarse en la gráfica de barras (Figura 22) donde se observa como es el comportamiento del mir21 en ambos grupos (AHNF y control) además con la asistencia del Clúster Jerárquico (Figura 19) podemos apreciar su expresión diferencial y compararla entre las muestras control y las muestra problema para finalmente seleccionarlo como un candidato.

El Hsa-mir-22 de acuerdo a los datos filtrados obtenidos de TAC (Anexo 2) este cumple con los requisitos propuestos en el plan estadístico con un FDR de  $1.73 \times 10^{-5}$  un P-value  $2.77 \times 10^{-7}$  y un Fold Change de -3.1 así como un log2 de 9.02 para las

muestras control obtenido de la normalización y un log2 de 7.39 para las muestras AHNF, esto último relacionado con los log2 puede visualizarse en la gráfica de barras (Figura 20) donde se observa como es el comportamiento del mir22 en ambos grupos (AHNF y control) además con la asistencia del Clúster Jerárquico (Figura 19) podemos apreciar su expresión diferencial y compararla entre las muestras control y las muestra problema para finalmente seleccionarlo como un candidato.

El Hsa-mir-181a de acuerdo a los datos filtrados obtenidos de TAC (Anexo 2) este cumple con los requisitos propuestos en el plan estadístico con un FDR de 0.0001 un P-value  $4.20 \times 10^{-6}$  y un Fold Change de 2.94 así como un log2 de 5.32 para las muestras control obtenido de la normalización y un log2 de 6.88 para las muestras AHNF, esto último relacionado con los log2 puede visualizarse en la gráfica de barras (Figura 26) donde se observa como es el comportamiento del mir181a en ambos grupos (AHNF y control) además con la asistencia del Clúster Jerárquico (Figura 19) podemos apreciar su expresión diferencial y compararla entre las muestras control y las muestra problema para finalmente seleccionarlo como un candidato.

El LincRNA0672 de acuerdo a los datos filtrados obtenidos de TAC (Anexo 2) este cumple con los requisitos propuestos en el plan estadístico con un FDR de  $5.05 \times 10^{-6}$  un P-value  $4.95 \times 10^{-8}$  y un Fold Change de 6.57 así como un log2 de 5.88 para las muestras control obtenido de la normalización y un log2 de 8.6 para las muestras AHNF, esto último relacionado con los log2 puede visualizarse en la gráfica de barras (Figura 24) donde se observa como es el comportamiento del lincRNA0672 en ambos grupos (AHNF y control) además con la asistencia del Clúster Jerárquico (Figura 19) podemos apreciar su expresión diferencial y compararla entre las muestras control y las muestra problema para finalmente seleccionarlo como un candidato.

Cabe aclarar que existen microRNA's y LincRNA's en esta lista de 35 genes que también cumplen con los criterios estadísticos planteados sin embargo al revisar su expresión (Clúster Jerárquico, Figura 23) nos podemos dar cuenta que no existe una expresión diferencial significativa entre las muestras de AHNF y control además de la poca o nula evidencia científica que existe de ellos

### **3.10.1 Hsa-mir-21**

Hsa-mir-21 fue uno de los primeros miRNA's detectado en el genoma humano. Se encuentra fuertemente conservado en la mayoría de los vertebrados (sobre todo mamíferos, aves y peces) (40).

El Hsa-mir-21 regula la expresión de sus objetivos aguas abajo de una manera independiente, al inhibirse la expresión de mir-21 se da como resultado una pérdida de la represión en la expresión de genes blanco, sin embargo, no se debe olvidar que también otros ncRNA's y mRNA regulan otras posibles vías moleculares que afectan la expresión de genes blancos (53) (39).

El Hsa-mir-21 funciona como un oncogén ya que modula la tumorigénesis a través de la regulación de genes blanco que están involucrados en el proceso de apoptosis, proliferación, adhesión y migración celular; algunos de los genes blanco del mir21 se encuentran implicados en la regulación a nivel funcional controlando una gran cantidad de proteínas expresadas lo que conlleva al aumento de la expresión de proteínas blanco implicadas en los genes diana por lo tanto a una desregulación aguas abajo de cada uno de sus genes blanco y por ende de las proteínas que regula a miR21, un ejemplo claro son las proteínas de la familia Bcl-2 que juegan un papel clave en el control de la apoptosis. Regulada por mir21, la proteína antiapoptótica más importante Bcl-2, cuya sobreexpresión celular y fosforilación están involucradas en la regulación de la proliferación celular, el ciclo celular, la reparación de DNA, la tumorigénesis y la quimiorresistencia (39) (54).

Múltiples estudios han demostrado que miR-21 se expresa en muchos tipos de cáncer, incluidos los de mama, colon, pulmón, páncreas, próstata y estómago entre otros. Por lo que es muy probable que el Hsa-miR-21 desempeñe un papel fundamental en el comportamiento de las células tumorales y la transformación maligna. Se ha informado que miR-21 tiene propiedades antiapoptóticas en glioblastoma y colangiocarcinoma, por lo tanto, la expresión alterada de miR-21 puede tener varios efectos diversos en las células tumorales (53) (56).

#### **3.10.1.1 PTEN y Hsa-mir-21**

Otro gen blanco es PTEN el cual es un gen supresor de tumores donde la inactivación funcional de PTEN a partir de la regulación de su expresión de mir21 es relevante para muchos tumores. PTEN ha sido implicado como un participante clave para la patogénesis y el crecimiento de diferentes tipos de cáncer. La pérdida funcional de PTEN conduce a una mayor actividad de la vía PI3K/AKT y el objetivo de las vías de rapamicina (mTOR) quinasa en mamíferos, esto puede promover tanto la supervivencia como la proliferación celular a través de la fosforilación y la inactivación de varios mediadores posteriores (53) (56) (57) (58)

Según la literatura PTEN puede revertir muchos de los efectos biológicos de miR-21 por lo que está implicado como un objetivo predominante de miR-21 en procesos de tumorigénesis. Sin embargo, se debe tomar en cuenta que un miRNA individual tiene la capacidad de potenciar o modular la expresión de muchos mRNA. Por lo que otros mRNA también pueden ser el objetivo de miR-21 y así cumplir funciones no relacionadas o pueden servir para modular el efecto de PTEN, dicho lo anterior PTEN podría ser el objetivo de algún miRNA que no sea miR-21, sin embargo, para comprobar lo anterior PTEN necesita ser verificado experimentalmente y debe mostrar un papel biológicamente relevante (53) (56) (57)

#### **3.10.1.2 Respuestas Inmune**

Por otra parte mir21 también se relacionan con el sistema inmune ya que regula a la IL-12, citocina clave derivada de macrófagos y células dendríticas esta molécula se

encuentra relacionada con la células T auxiliares ( los linfocitos T CD4+ reguladores expresan en sus superficie y de manera constitutiva la molécula CD25, que es la cadena alfa del receptor para IL-2, una citocina crítica para la activación y proliferación de los linfocitos T) este tipo celular estimula a las células T citotóxicas, macrófagos y a las células B para producir una respuesta inmune de tipo innato-adaptativa, involucrando una respuesta de tipo TH1. La capacidad de mir21 de regular negativamente la IL-12 indica un nuevo punto de control que regular al nivel de este mediador inmune clave, sin embargo la regulación negativa de IL-12 también podría afectar la producción de IL-15 y la función de las células Treg (células T reguladoras ) las cuales son mediadoras fundamentales de la respuesta inmune ya que cuentan con una serie de mecanismos supresores que les permite controlar tanto clonas autorreactivas como a linfocitos T convencionales), lo que provocaría un fenotipo proinflamatorio. Además de regular los niveles de IL-12, mir21 puede regular otros procesos relacionados con la inflamación alérgica sobre todo en vías respiratorias. (59) (60).

### **3.10.1.3 Adhesión celular**

Varias patologías están asociadas con una angiogénesis excesiva, y el cáncer no es la excepción. Hasta la fecha, son pocos los inhibidores angiogénicos en la terapia y estos no han podido producir una respuesta clínica duradera en la mayoría de los pacientes. Su baja eficacia se debe principalmente a la aparición de mecanismos de resistencia, ya que estos inhibidores son específicos para un solo receptor angiogénico. Por lo tanto, la capacidad de un miRNA para apuntar a múltiples mRNA los hace bastantes atractivos. La manipulación de angiomiR en entornos de vascularización patológica representa un nuevo enfoque terapéutico. Hasta la fecha, se ha encontrado que solo unos pocos miRNA's que se encuentran involucrados en la regulación de la angiogénesis (61).

Hsa-mir-21 emerge como un nuevo angiomiR ya que regula negativamente la angiogénesis. La expresión de miR-21 afecta la proliferación, migración y organización de células endoteliales. Sin embargo, miR-21 también modifica la organización del citoesqueleto de actina. Se sabe que la organización de la actina desempeña un papel esencial en la promoción de la migración celular (61).

El aumento de la expresión de miR-21 sugiere que miR-21 podría estar implicado en el mantenimiento del endotelio vascular quiescente (61)

Al afectar los pasos clave de la remodelación del endotelio, la modulación de miR-21 debería proporcionar nuevas estrategias para controlar la angiogénesis patológica.

En un modelo de ratón se ha demostrado que la expresión de miR-21 reduce la neovascularización. Este hallazgo sugiere el uso potencial de miR-21 como una

herramienta terapéutica para el tratamiento de enfermedades asociadas con la angiogénesis excesiva. Todavía se necesitan más estudios para investigar con mayor precisión la relevancia del uso terapéutico de miR-21 en otras enfermedades relacionadas con la angiogénesis, como el desarrollo de tumores (61).

El papel antiangiogénico de miR-21 puede ser sorprendente con respecto a su implicación en la progresión tumoral. Como se mencionó anteriormente el miR-21 se expresa en la gran mayoría de los tipos de cáncer y su expresión favorece el crecimiento tumoral y la invasión. Se ha demostrado que la inhibición de la expresión de miR-21 aumenta la apoptosis en células de glioblastoma cultivadas, reduce el crecimiento en células MCF7 de cáncer de mama in vitro y reduce el crecimiento tumoral en un modelo de ratón con xenoinjerto.

Se ha encontrado una disminución de la proliferación, migración e invasión de células tumorales tras el silenciamiento de miR-21 en células hepatocelulares. La reducción en la expresión de miR-21 también se ha asociado con una reducción en la metástasis en el cáncer de mama y colorrectal. Sin embargo, la expresión de miR-21 indujo defectos en los procesos de angiogénesis, por ende, una reducción en la tubulogénesis y migración de las células endoteliales, sin ningún efecto sobre la apoptosis. Una explicación de estos roles opuestos de miR-21 en las células tumorales y el compartimento del endotelio podría ser que miR-21 se dirige a diferentes genes en diferentes tipos de células. Se requiere de estudios posteriores que demuestren que la expresión diferencial o la disponibilidad de los objetivos blancos entre diferentes tejidos pueden indicar que un miRNA afecte a un conjunto específico de objetivos (61).

En este caso el mRNA de RhoB contiene un sitio de unión conservado para miR-21 en el 3'UTR, lo que sugiere que RhoB es un objetivo directo de miR-21. La conservación de este sitio durante la evolución sugiere que este objetivo puede ser de relevancia funcional. Además, recientemente se ha publicado un estudio donde se demostró una interacción entre el 3'UTR de RhoB y miR-21 en una línea celular de carcinoma hepatocelular. Todos estos datos apoyan firmemente el hecho de que, en las células endoteliales, miR-21 también reprime la expresión de RhoB al dirigirse directamente a su 3'UTR (61).

Las RhoGTPasas son una familia de 20 proteínas G pequeñas que regulan notablemente el citoesqueleto de actina, la polaridad celular, el tráfico vesicular y la expresión génica. Una cantidad creciente de evidencia también ha implicado a las proteínas Rho como reguladores clave de la angiogénesis a través de la modulación de varios pasos de este proceso, incluida la permeabilidad vascular, la remodelación de la matriz extracelular, la migración y la proliferación. Los tres miembros mejor estudiados de la familia Rho son: RhoA, Rac1 y CDC42. Se han descrito esencialmente en células tumorales donde se cree que actúan como un gen supresor tumoral, sin embargo, existen todavía pocos estudios que describan su papel en las células endoteliales (61)

Tanto la expresión como el silenciamiento de miR-21 indican que miR-21 regula la migración y la tubulogénesis. Se ha identificado a miR-21 como un miembro novedoso de la familia angiomiR, regulando negativamente los procesos angiogénicos clave para la migración de células endoteliales y la tubulogénesis. Se ha propuesto a miR21 como un jugador clave implicado con RhoB. (61)

### **3.10.2 Hsa-mir-22**

El hsa-mir-22 actúa como supresor de tumores u oncogenes en diversos tipos de cáncer. (64).

El Hsa-miR-22 funciona en múltiples procesos celulares, incluida la proliferación, diferenciación, senescencia y apoptosis, y su desregulación es un sello distintivo del cáncer humano. Se ha identificado en la literatura que miR-22 está regulado negativamente en diversos tipos de cáncer, incluyendo cáncer de colon, carcinoma hepatocelular, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de próstata y carcinoma de células escamosas esofágicas. En cáncer de próstata, Pasqualini et al. mostraron que miR-22 eran menos abundante en el tejido canceroso en comparación con la contraparte benigna y funcionaban como supresores de tumores al modular los objetivos asociados al cáncer LAMC1 y Mcl-1.

En el cáncer de colon y de hígado, Yang et al. Demostraron que miR-22 tenía un efecto supresor de tumores al inhibir la expresión de ciclina A2 progresión del ciclo celular. Además de que el miR-22 funcionaba como un supresor tumoral, miR-22 actúa como un potente miRNA proto oncogénico precisamente por su capacidad de alterar la biología de la célula (64).

Mir-22 exhibe una desregulación compleja en diferentes circunstancias y en diferentes distribuciones subcelulares, por lo tanto, la expresión de miR-22 puede cambiar opuestamente en las progresiones de diferentes tumores (64) (65)

En este estudio de tesis se propone un posible mecanismo molecular para Hsa-miR-22 el cual regula la proliferación celular, la migración a través de diferentes genes diana y, por lo tanto, está íntimamente involucrado en el desarrollo y la progresión de los AHNF. (65)

#### **3.10.2.1 Papel de miR-22 en la angiogénesis tumoral**

MiR-22 tiene roles únicos en tipos de células específicas. En el cáncer, la función de miR-22 es controvertida. El gen miR-22 de ratón se asigna a una región genómica asociada al cáncer, y el gen miR-22 humano se encuentra dentro de una región de pérdida de heterocigosidad en varias células cancerosas, lo que sugiere que miR-22 participa en la supresión del crecimiento tumoral. Esta actividad supresora de tumores de miR-22 implica la represión de MYCBP. Sin embargo, otros han demostrado que ese derribo de miR-22 que aumenta la tasa de apoptosis (65)

El crecimiento local del tumor está limitado por la hipoxia: a medida que el tumor se expande, su centro se vuelve hipóxico, induciendo genes como el VEGF que desencadenan la angiogénesis. El heterodímero HIF-1 desempeña un papel crítico en la señalización hipóxica en tumores (65).

### **3.10.2.2 Mir-22 y la senescencia**

En la literatura se ha informado del efecto funcional de miR-22 como un nuevo regulador de la senescencia celular en células humanas y cancerosas normales bajo el papel inhibitor de miR-22 en el crecimiento tumoral y la metástasis, lo que sugiere que miR-22 induce la senescencia actuado como una barrera para la progresión del cáncer *in vitro* e *in vivo*. Los miRNA presentan un mecanismo en el que los genes implicados en una variedad de diferentes vías de señalización pueden regularse simultáneamente. La senescencia inducida por miR-22 no solo inhibe la proliferación ilimitada de células tumorales, sino que los cambios morfológicos de la senescencia también suprimen la movilidad e invasión de las células tumorales, en parte debido a las fibras de estrés de actina mejoradas en las células cancerosas, lo que indica que la inducción de la senescencia contribuye a la supresión de las células tumorales crecimiento, invasión y metástasis *in vitro* e *in vivo* (69).

En la literatura se han documentado que SIRT1, Sp1 y CDK6 podrían actuar en la vía p53 y/ o pRb. SIRT1 juega un papel importante en la longevidad y la senescencia celular de la mayoría de los organismos mediante la modulación directa de p16-pRb vía de señalización, así como p53 y otras proteínas. El factor de transcripción Sp1 regula la expresión de múltiples genes del ciclo celular, incluido el gen p53 y el propio Sp1. Se ha entendido que la proteína CDK6 fosforila pRB y retrasa la senescencia. Nuestro estudio demostró que miR-22 indujo la desfosforilación de pRB al dirigirse a SIRT1 y CDK6. En conjunto, suponemos que miR-22 regula la senescencia celular a través de la conexión de SIRT1, Sp1 y CDK6 para afectar la vía pRb y podría coordinar p53 y otras vías de señalización de la senescencia celular en una forma dependiente del tipo de célula y del contexto genético (69) (65).

### **3.10.3 Hsa-mir-181**

La familia miR-181 contiene cuatro miRNA's (miR-181a / b / c / d). MiR-181a y miR-181b se transcriben de dos loci de genes separados (miR-181a-1 / miR-181b-1 y miR-181a-2 / miR-181b-2), mientras que miR-181c y miR-181d se transcriben desde otro locus. Se había informado que miR-181a, 181b , 181c y 181d funcionan de manera diferente en una serie de tumores. Sin embargo, la homología entre los miembros de la familia miR-181 y la contribución de miR-181a, -181b, -181c y -181d en diferentes tipos de cáncer aún no se han aclarado del todo (67).

Se ha descubierto que los miembros de la familia miR-181 son altamente homólogos y tiene un mismo objetivo, CTDSPL. El gen CTDSPL contiene 8 exones que codifican un mRNA de 4,8 kb, que se ha designado como HYA22. RBSP3, es un gen supresor de tumores similar a la fosfatasa la cual recientemente se ha descubierto que

desfosforila la serina Rb1 en Ser-807 y Ser-811. Este análisis muestra que CTDSPL pertenece a una familia de genes de fosfatasa de dominio C-terminal pequeñas que pueden controlar la maquinaria de transcripción de la RNA polimerasa II (67).

Las funciones biológicas del miR -181 se han discutido en diferentes tumores con diferentes procesos biológicos subyacentes. En el cáncer de mama, miR -181a podría prevenir y revertir la resistencia a los medicamentos mediante la unión al 3'-UTR de BCRP.

Diversos estudios han informado que CTDSPL elimina el grupo fosfato de las serinas 807 y 811 en su sustrato, pRB, y por lo tanto induce la formación del complejo RB / E2F1.

La participación de CTDSPL en la regulación del crecimiento celular aún no se ha estudiado. Nuestros datos demostraron que miR-181 expresado eliminó la expresión de CTDSPL que da como resultado una transición acelerada de G1/S. Estos resultados indican que miR-181b expresado inactiva la proteína fosfatasa CTDSPL y que esta inactivación puede ser un paso común que se requiere para la progresión del ciclo celular.

#### **3.10.4 LINC RNA00672**

Los ensayos bioquímicos han demostrado que LINC00672 actúa como un cofactor supresor mediado por p53 que refuerza localmente la represión LASP1 durante los procesos antitumorales. Además, la expresión de LINC00672 puede afectar quimioresistencia y quimiosensibilidad tanto *in vitro* e *in vivo*, lo que sugiere un valor clínico potencial para la quimioterapia de pacientes con cáncer (68).

LINC00672 es una transcripción de 2365 pb con dos exones ubicados en la hebra delantera del cromosoma 17q12, un locus de susceptibilidad, que está asociado con cáncer de próstata, cáncer de seno y diabetes tipo 2. Nuestros experimentos *in silico*, sugieren que LINC00672 podría ser un nuevo objetivo de transcripción de p53. LINC00672, como se informó anteriormente, es miembro de una pequeña categoría de ortólogos de lincRNA encontrados en no mamíferos (68).

Estos datos nos llevaron a creer que la contribución de LINC00672 a la biología celular y la oncogénesis puede estar asociada, al menos en parte, con LASP1 (68).

LASP1 se sobreexpresa y se asocia con un aumento de la agresividad tumoral en numerosos tipos de cánceres, lo que sugiere que los niveles de LASP1 pueden servir como un marcador pronóstico. El LASP1 no solo está regulado por miRNA's, sino que es un objetivo de represión del supresor tumoral p53 (68).

Se ha sugerido que LINC00672 funciona como cofactor con hnRNP para facilitar la supresión de LASP1 dependiente de p53. Por lo tanto, se asocia con la agresión y malignidad tumoral (68).

### **3.11 Transcriptome Analysis Console TAC**

La consola de análisis de transcriptómica TAC permite estudiar y comparar el transcriptoma del conjunto de RNA en una célula, tejido y órgano. Los transcriptomas son un conjunto mRNA o transcritos muy variables y se vale de la bioinformática y de los microarreglos (micromatrices) como parte de un análisis predictivo.

La transcriptómica permite cuantificar el nivel de expresión de genes empleando técnicas que permiten analizar miles de moléculas de RNA al mismo tiempo mediante la técnica de micromatrices, TAC permite estudiar y comparar el conjunto de genes que se están expresando en un momento dado en una célula, la expresión de un gen supone que este ha sido transcrito a mRNA. La consola de análisis es rápida e intuitiva para descifrar la complejidad del transcriptoma y es compatible para análisis a nivel gen y exón.

En la parte del control de calidad existen matrices control de calidad para la normalización de los datos y también existen pruebas estadísticas que permiten el análisis de la expresión diferencial obteniendo también listas de genes expresados en donde se puede ver la interacción entre RNA codificante y no codificante simplificando su interpretación y centrándose en genes de interés.

Aparte el control de calidad y el análisis de datos combinados TAC también permite llevar a cabo el análisis de grandes conjuntos de datos de más de 1000 muestras; para esto se integra LIMA que es un modelo lineal para microarreglos TAC cuenta con análisis de empalme alternativo, herramientas de visualización y algoritmos estadísticos que son elementos de flujo que permiten un análisis de vanguardia.

## 4 Objetivos

### 4.1 Objetivo general

Identificar RNA's no codificantes como potenciales marcadores moleculares y su probable participación en la tumorigénesis de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes

### 4.2 Objetivos particulares

- Identificar los miRNA's e lncRNA's expresados diferencialmente en adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes.
- Determinar los potenciales eventos moleculares asociados a la regulación por lncRNA's y miRNA's, que se encuentran presentes en los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes (AHNF).

## 5 Justificación

Los motivos que nos llevaron a investigar a los Adenomas hipofisarios, fue que representan la segunda neoplasia intracraneal con mayor frecuencia en México, de los cuales el 30% de todos los adenomas hipofisarios son considerados clínicamente no funcionantes (AHNF), estos se caracterizan por no generar signos ni síntomas y clínicamente no hipersecretan hormonas lo que dificulta su diagnóstico y con esto la incapacidad de detección oportuna.

Solo se hace evidente su presencia cuando la neoplasia crece en tamaño y comprime los nervios craneales generando así signos y síntomas característicos, por lo que en la búsqueda de potenciales marcadores moleculares se encuentran los ncRNA's (microRNA's e lncRNA's) ya que se han implicado en la regulación de la expresión génica a nivel epigenético, transcripcional o postranscripcional, sin embargo, y a pesar de que no codifican ningún producto proteico.

La regulación de la expresión génica por lncRNA's y miRNA's afecta las decisiones celulares críticas como la división y la apoptosis aumentando inmediatamente la posibilidad de su participación en la tumorigénesis. En los AHNF hasta el momento, la información al respecto es deficiente o nula, además destaca el hecho de que actualmente no hay fármacos biodisponibles para su tratamiento, por lo que la búsqueda e identificación de estos marcadores en la tumorigénesis de los AHCF es bastante relevante.

En esta búsqueda e identificación de potenciales marcadores moleculares con ayuda de herramientas bioinformáticas como la consola de análisis de transcriptómica, se permitirá estudiar y comparar el transcriptoma del conjunto de RNA's en un tejido y

se habrá de generar conocimiento que permita entender las posibles vías moleculares implicadas en los adenomas hipofisarios.

## 6 Hipótesis

Existen diferentes perfiles de expresión entre muestras de controles en comparación con los tumores y de ser así esto podrían indicar que se tiene diferencias biológicas entre los grupos.

## 7 Metodología

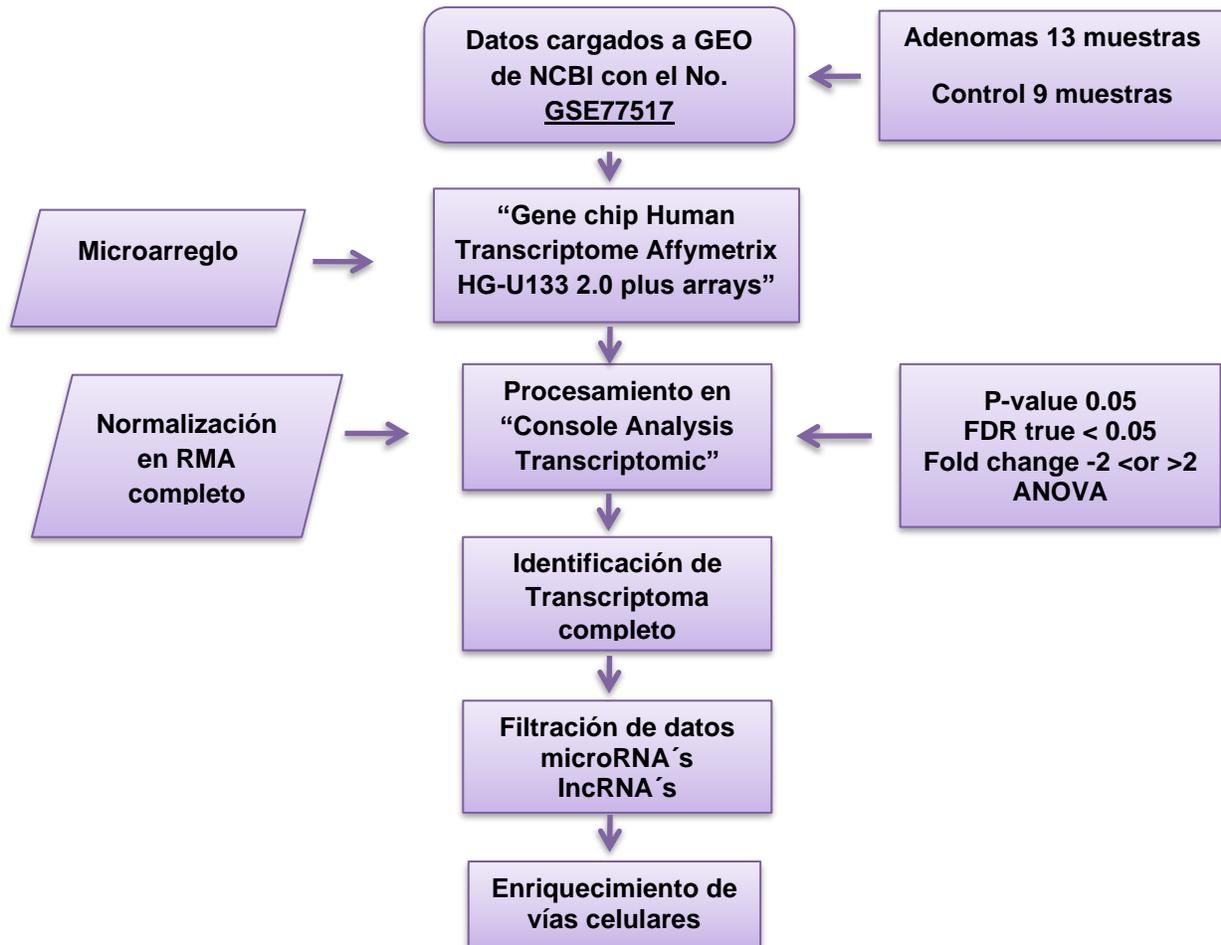


Figura No. 17 Metodología *in silico*

## 7.1 Diseño Experimental

El número de muestras totales que se utilizaron para los análisis de micromatrices fueron veintidós, correspondientes a un igual número de pacientes, de los cuales trece corresponden a muestras de AHNF y las nueve restantes son muestras de hipófisis no tumorales aparentemente normales.

La purificación y extracción del RNA de las muestras de AHNF e hipófisis control se llevó a cabo utilizando el Kit RNeasy Mini de QIAGEN.

## 7.2 Microarreglo

Se utilizó el “GeneChip<sup>®</sup> Human Transcriptome Affymetrix HG-U133 plus 2.0 arrays Affymetrix”. Que permite analizar un total de 47000 genes entre codificantes y no codificantes. De dicho microarreglo se obtuvieron los archivos. CEL que se cargaron a la base de datos de GEO para eventualmente realizar el procesamiento de datos.

## 7.3 Adquisición y procesamiento (Minería de datos)

Las bibliotecas transcriptómicas fueron descargadas de la base de datos Gene Expression Omnibus (GEO) del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) con el número de acceso: [GSE77517](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE77517) este número permite descargar los archivos. CEL datos de intensidad de señal para realizar el análisis en Transcriptome Analysis Console (TAC).

Las librerías de RNA fueron seleccionadas de acuerdo con los siguientes criterios:

- El tejido de origen tuvo que ser corroborado como AHNF obtenido de cirugía.
- El RNA tuvo que ser analizado usando el mismo microarreglo.
- Los datos tuvieron que cumplir con los parámetros de control de calidad como Pearson y Spearman las cuales están integradas en TAC, así como limitaciones (labeling y hibridization)

Se utilizó el software Transcriptome Analysis Console (versión 4.0) para las muestras del microarreglo “GeneChip<sup>®</sup> Human Transcriptome Affymetrix HG-U133 plus 2.0 arrays Affymetrix, para extraer datos de expresiones (minería de datos).

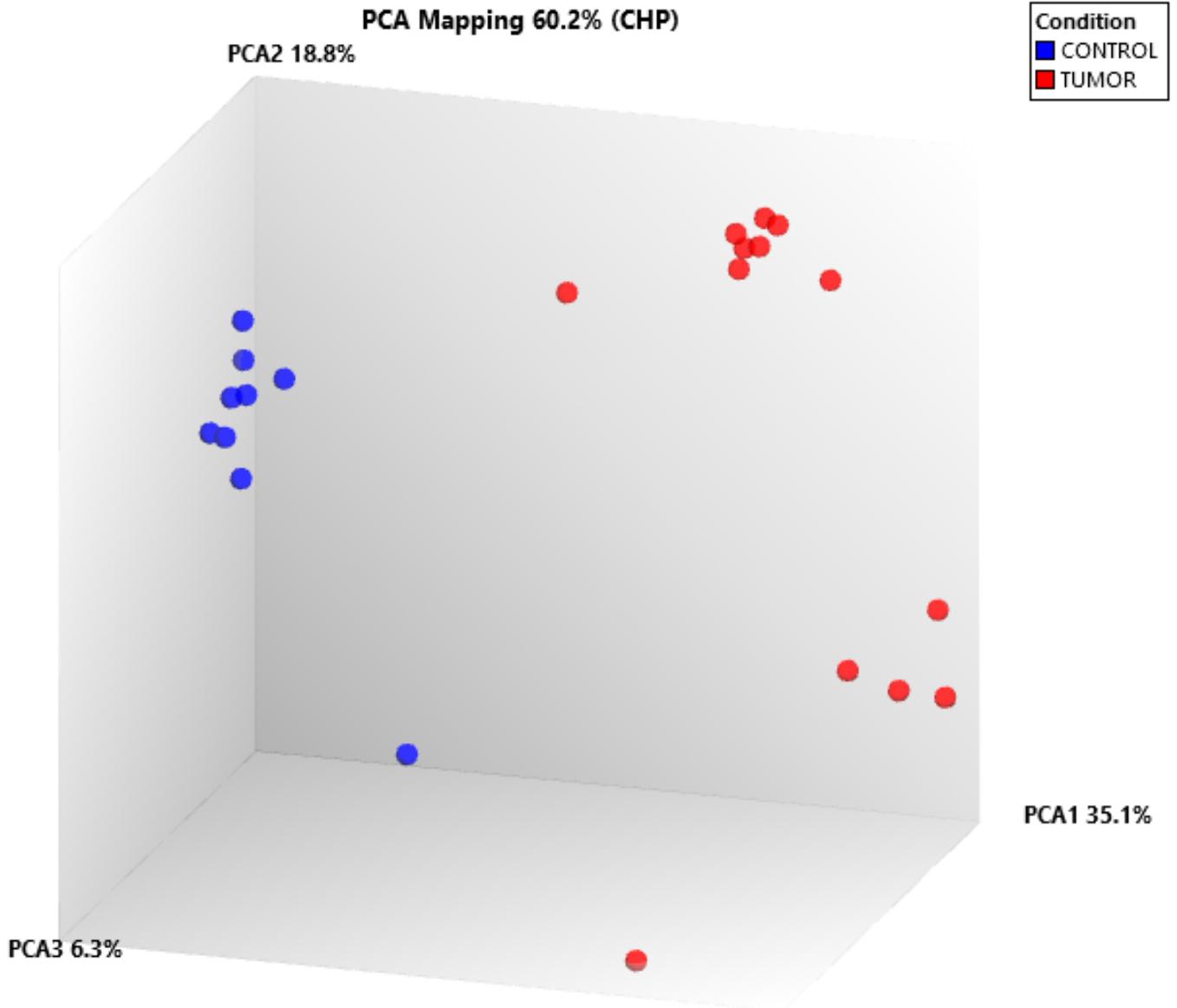
Se utilizó el software TAC para realizar la normalización en RMA (Robust Multi-Chip Average) en los análisis a nivel de gen y así eliminar el ruido.

Y también se emplearon para el análisis de datos, bases de datos bioinformáticas como: Metascape, con la finalidad de encontrar que eventos moleculares o celulares podrían estar implicados y miRecords, miTarget, NONCODE, RNA central, LNCipedia para conocer características propias de cada microRNA's o LincRNA's seleccionados.

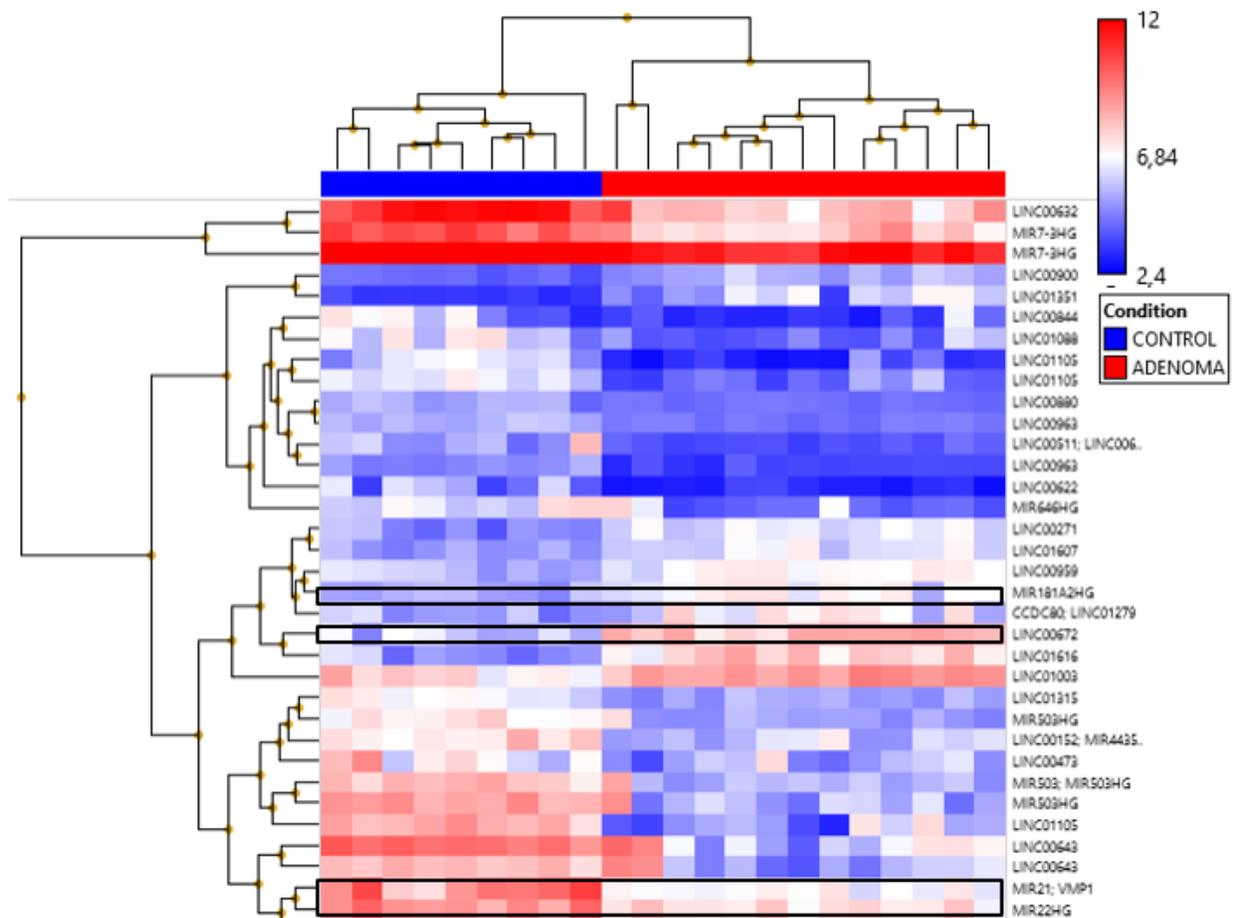
## 7.4 Plan de estadístico

- **P-value de  $\leq 0.05$ :** Valor de probabilidad su valor oscila entre 0 y 1 siendo el valor de 0.05 típico para este tipo de análisis o sistemas, biológicos ya que indica significancia, estimando el 5 % de probabilidad de que los resultados observados se deban al azar.
- **Fold change  $< -2$  or  $> 2$ :** Relación entre dos cantidades describe cuándo cambia una cantidad entre un original y una medición posterior útil en mediciones múltiples de un sistema biológico tomadas en diferentes momentos, mide el cambio en el nivel de expresión de un gen, cambio en los componentes asociados con la interacción.
- **Anova:** Método estadístico de análisis de varianza, que ajusta un modelo lineal a cada conjunto de prueba independientemente de los demás.
- **FDR:** True  $< 0.05$ . El control FDR es un método estadístico utilizado en múltiples pruebas de hipótesis para corregir comparaciones múltiples.
- **Normalización:** Para los análisis a nivel gen se utilizó el algoritmo de análisis robusto de múltiples chips (RMA) que se ajusta a un modelo lineal robusto a nivel de la sonda para minimizar el efecto de las diferencias de afinidad específicas de la sonda. Minimiza la varianza (estable a escala logarítmica). A través de las matrices tiene mayor reproducibilidad de señal.

## 8. Resultados

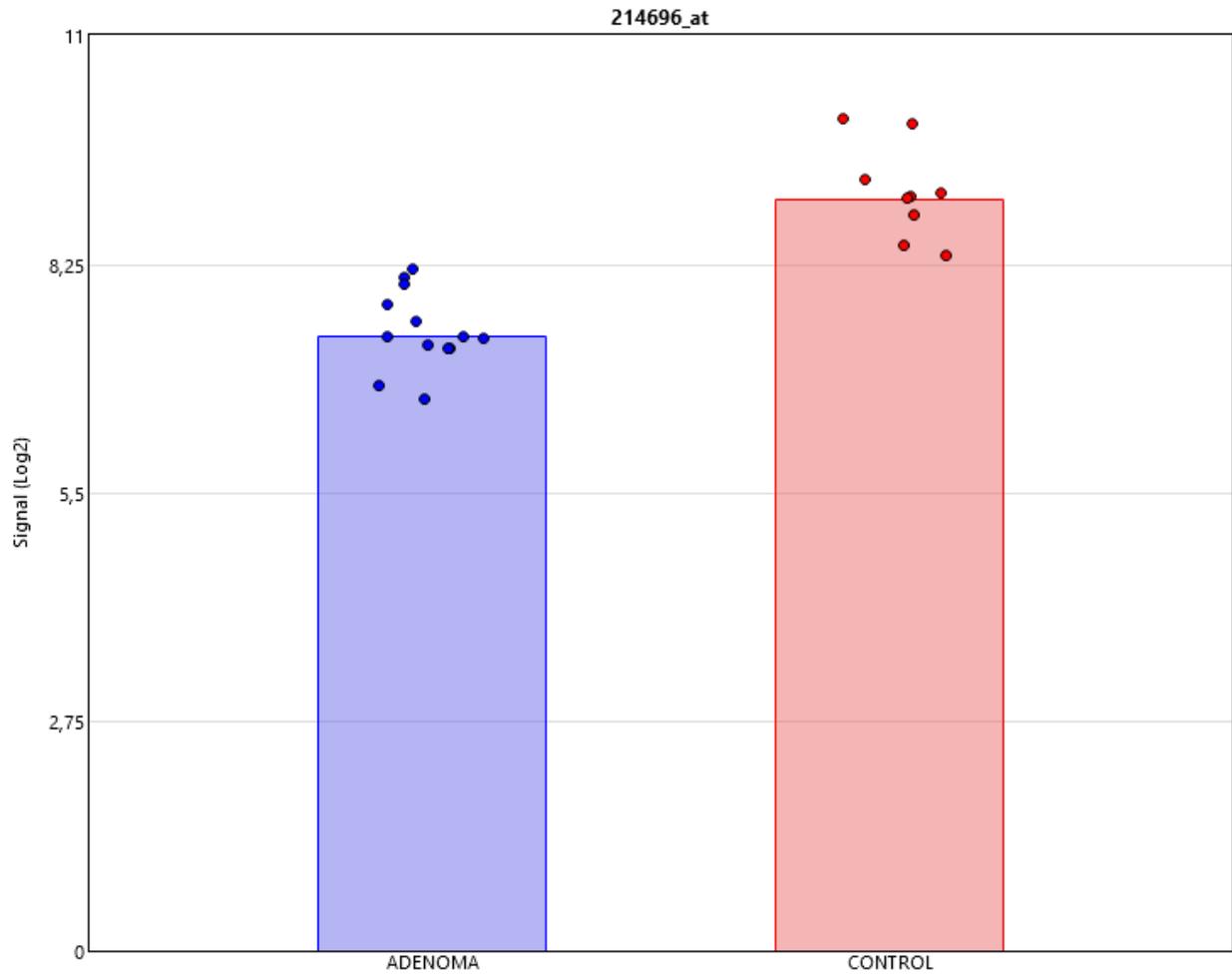


Representación del análisis de componentes principales (PCA) (Figura No.18) de las muestras de adenoma hipofisarios clínicamente no funcionantes e hipófisis no tumorales (control). En el Análisis de Componentes Principales; se muestra la formación de dos grupos heterogéneos bien diferenciados, uno corresponde a la hipófisis no tumoral (color azul) y otro grupo pertenece a las muestras de Adenomas Hipofisarios Clínicamente no Funcionantes (color rojo).

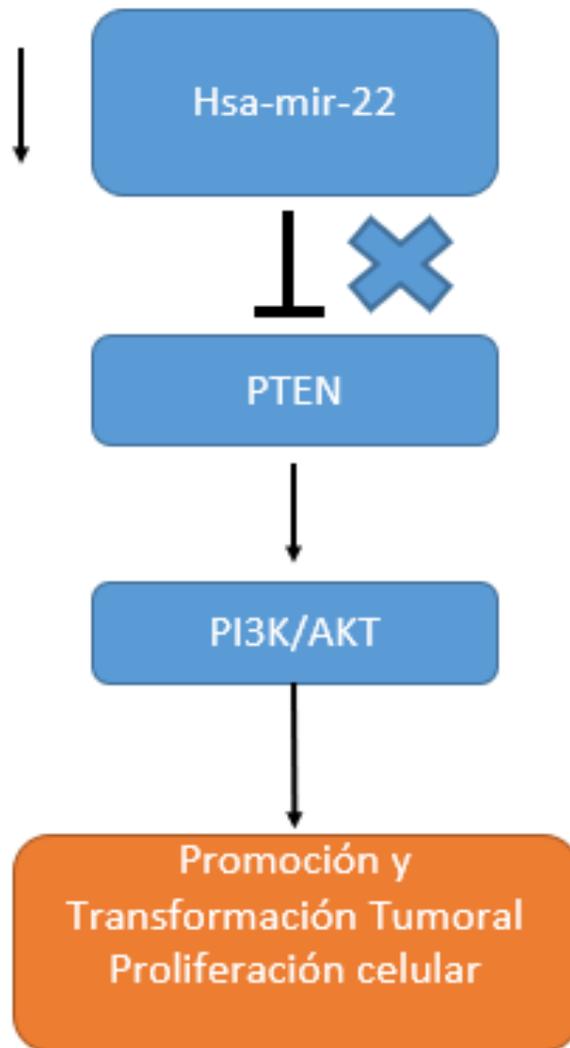


Expresión diferencial de ncRNA's (microRNA's y LincRNA's) (Figura No.19). A partir del Clúster jerárquico; el cual corresponde al mapa del transcriptoma filtrado según el plan estadístico de AHNF, y de hipófisis no tumoral, se puede apreciar las diferencias moleculares entre los dos tipos de muestras los AHNF y la hipófisis no tumoral. También se representan en el Clúster a los genes expresados diferencialmente en dos tipos de color, en rojo se encuentran los genes expresados y en color azul los no expresados. A mayor intensidad del color rojo mayor expresión y entre mayor intensidad de color azul menor expresión. Este cluster jerárquico también nos permitirá visualizar la expresión y así junto con el análisis de los parámetros estadísticos se seleccionarán los genes expresados diferencialmente que cumplan con dichos parámetros.

Gene Symbol: MIR22HG  
Description: MIR22 host gene



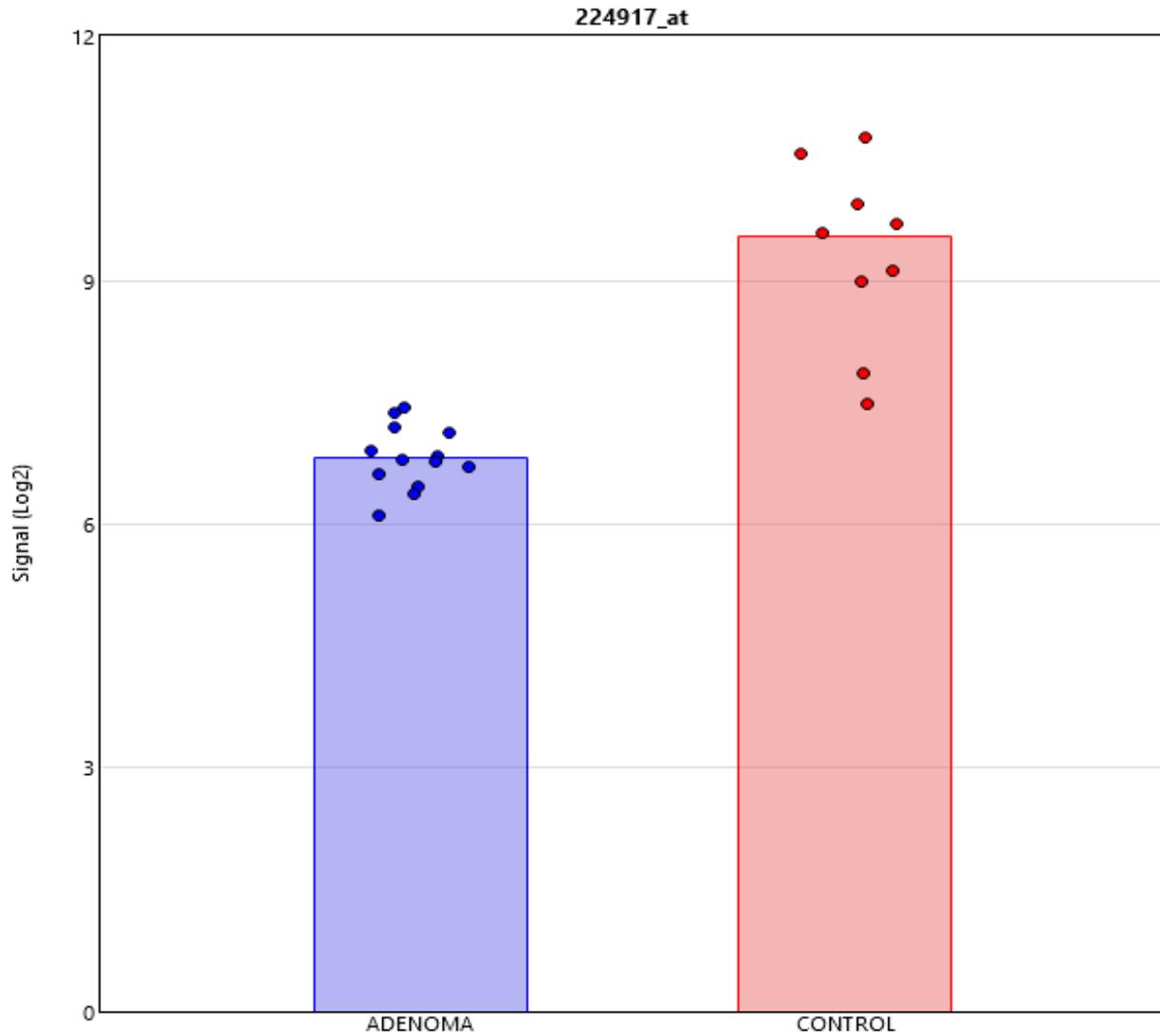
Expresión del Hsa-mir-22 en AHNF comparada con las muestras control (Figura No.20). En esta representación gráfica se observa como es el comportamiento del mir22. Se puede apreciar que en la barra de color rojo que corresponde a las muestras de hipófisis no tumoral (control) que el mir22 se expresa de manera basal, mientras que la barra azul que corresponde a las muestras de AHNF no se expresa.



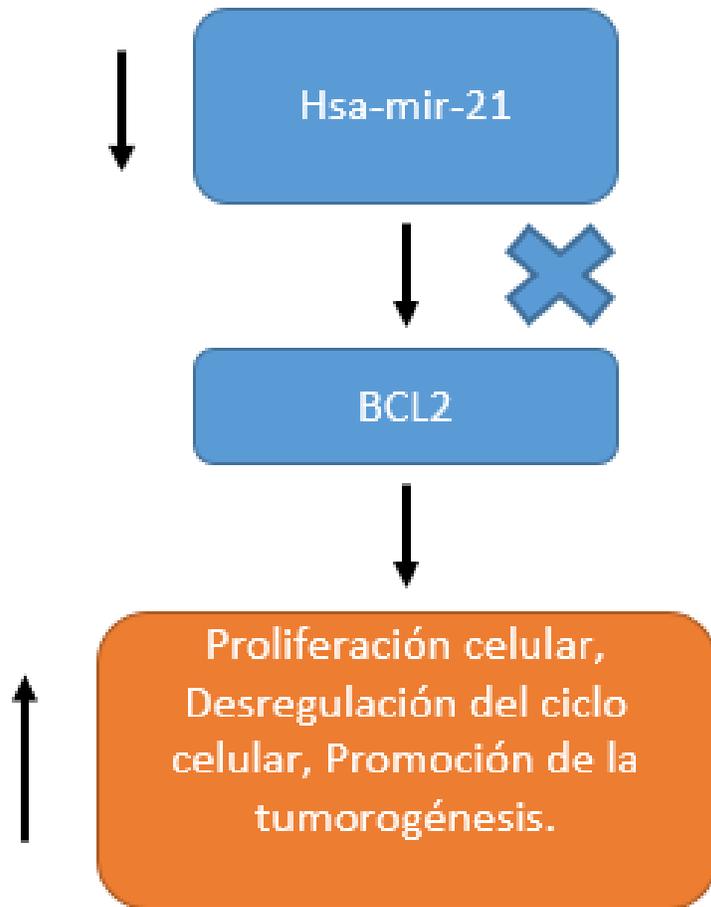
Posible participación del Hsa-mir-22 (Figura No.21) Al no expresarse el Hsa-mir-22 en las muestras de AHNF con respecto a la hipófisis no tumoral, este mir22 va a inhibir a la fosfatasa PTEN, esta inhibición podría desencadenar la activación de la vía PI3K/AKT la cual en diferentes tipos de tumores de ha visto que conduce a un aumento en la proliferación celular, promoción y transformación tumoral.

Gene Symbol: MIR21; VMP1

Description: microRNA 21; vacuole membrane protein 1



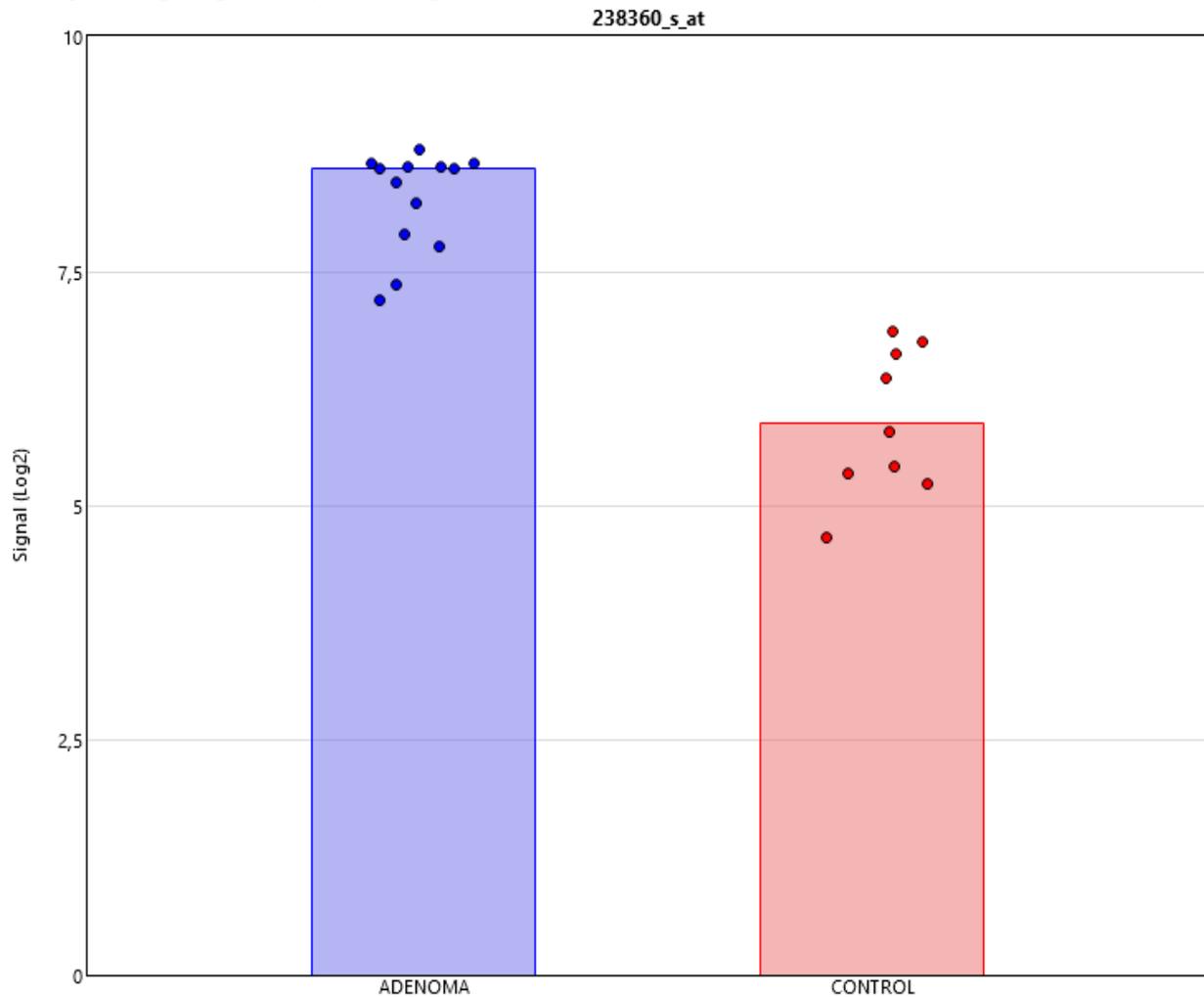
Expresión del Hsa-mir-21 en AHNF comparada con las muestras control (Figura No.22) En esta representación gráfica se observa como es el comportamiento del mir21. Se puede apreciar que en la barra de color rojo que corresponde a las muestras de hipófisis no tumoral (control) que el mir21 se expresa de manera basal, mientras que la barra azul que corresponde a las muestras de AHNF no se expresa además podemos apreciar como las muestras de AHNF se agrupan y segregan.



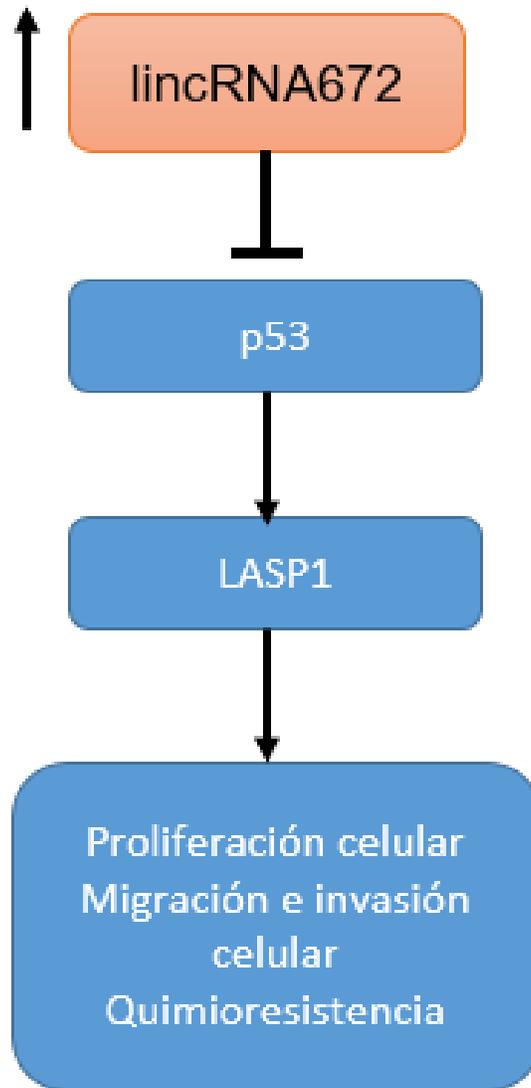
Posible participación del Hsa-mir-21 (Figura No.23) Al no expresarse el Hsa-mir-21 en las muestras de AHNF con respecto a la hipófisis no tumoral se mantiene la expresión de la proteína BCL2 lo que desencadena un aumento en la expresión de la proteína Bcl2 y se propone un aumento en la proliferación celular y con ello una desregulación del ciclo celular, promoviendo así la tumorigénesis.

Gene Symbol: LINC00672

Description: long intergenic non-protein coding RNA 672

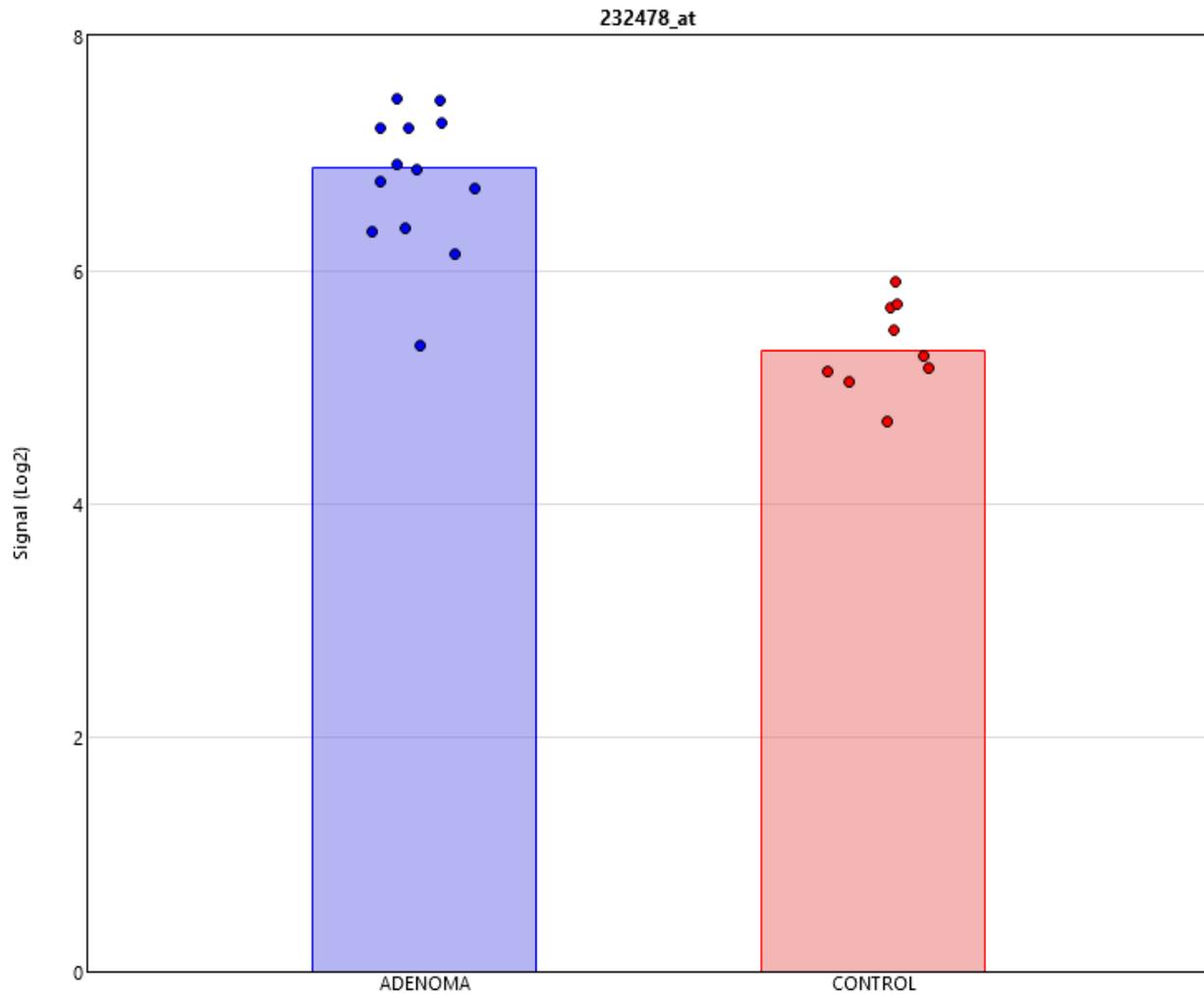


Expresión del LincRNA0672 en AHNF comparada con las muestras control (Figura No.24) En esta representación gráfica se observa como es el comportamiento del LincRNA0672. Se puede apreciar que en la barra de color rojo que corresponde a las muestras de hipófisis no tumoral (control) que el LincRNA0672 no se expresa de manera basal, mientras que la barra azul que corresponde a las muestras de AHNF se expresa.

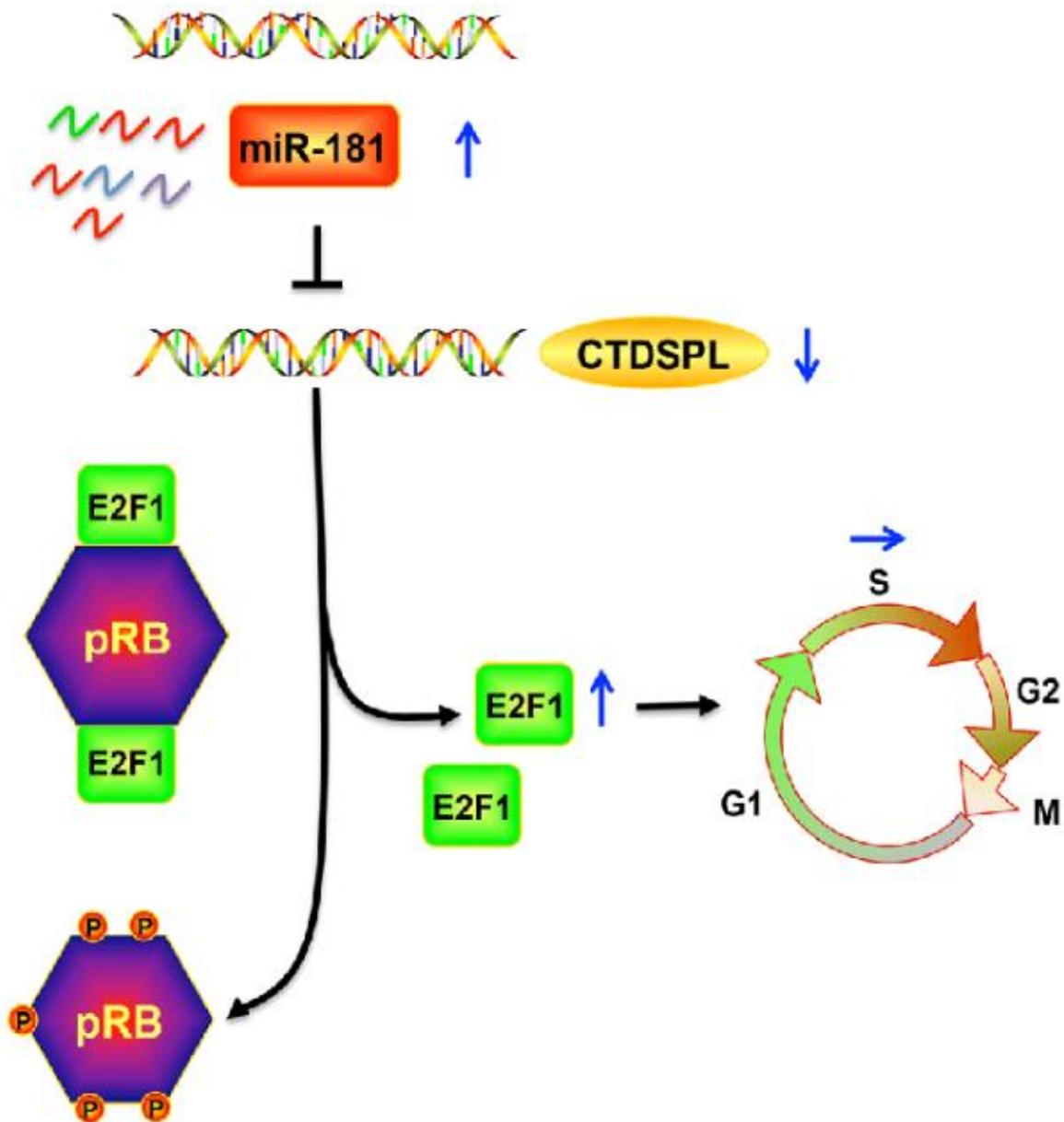


Posible participación del lincRNA00672 (Figura No.25) donde se plantea que al expresarse el lincRNA00672 en muestras de AHNF este va a inhibir a la proteína p53 la cual una vez inhibida va a promover un aumento en la expresión de la proteína LASP1 la cual posiblemente se encuentra relacionada con un aumento en la proliferación celular, migración e invasión y quimioresistencia.

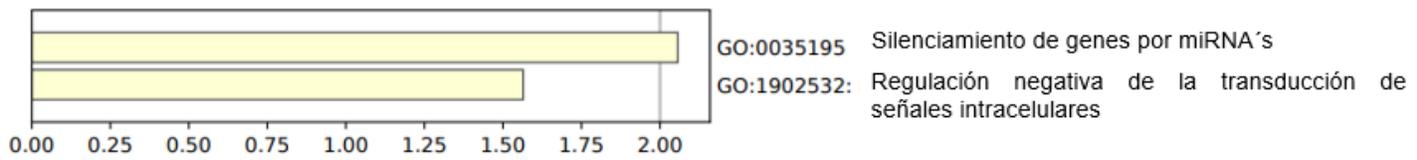
Gene Symbol: MIR181A2HG  
Description: MIR181A2 host gene



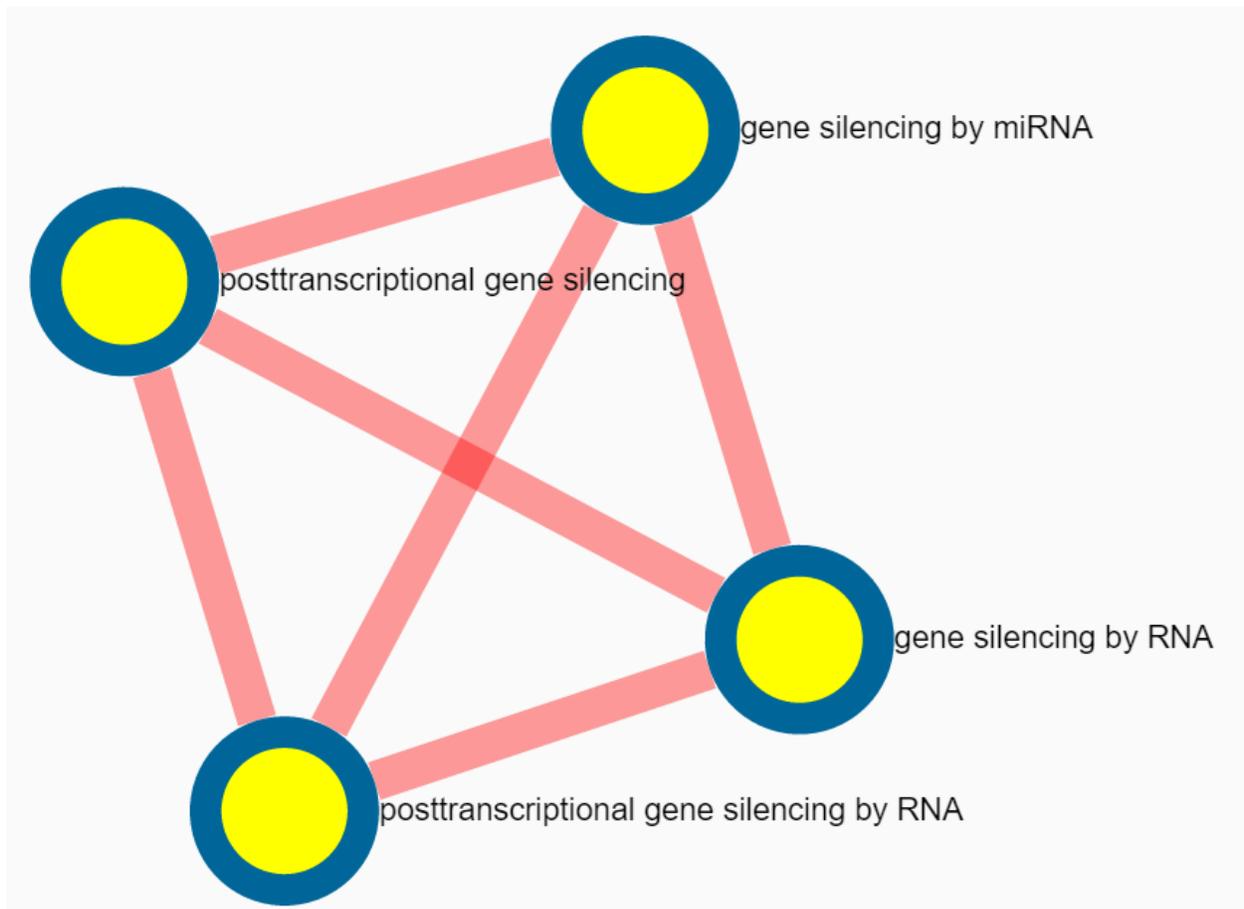
Expresión del Hsa-mir-181A en AHNF comparada con las muestras control (Figura No.26) En esta representación gráfica se observa como es el comportamiento del Hsa-mir-181A. Se puede apreciar que en la barra de color rojo que corresponde a las muestras de hipófisis no tumoral (control) que el Hsa-mir-181A no se expresa de manera basal, mientras que la barra azul que corresponde a las muestras de AHNF se expresa.



Posible participación del Hsa-mir-181a (Figura No.27) Donde se plantea que al expresarse el Hsa-mir-181a en muestras de AHNF con respecto a las muestras de hipófisis no tumoral, va a inhibir a la fosfatasa CTDSPL la cual basalmente desfosforila de la proteína pRB la cual forma un complejo con el factor de elongación de la transcripción E2F1 (forma activa hipofosforilada) lo que inhibe la proliferación del ciclo celular sin embargo, en AHNF se encontró alterada disminuyendo su expresión por lo que no va a defosforilar a pRB siguiendo en su forma inactiva hipofosforilada lo que conlleva a un aumento de la expresión del factor E2F1 y esto conduce a una progresión del ciclo celular descontrolada.



Mapa de Calor de enriquecimiento obtenido de Metascape, donde se involucran las posibles vías celulares y moleculares asociadas a los ncRNA's obtenidos de TAC (microRNA's e LincRNA's). (Figura No. 28) y la posible participación de LincRNA's y microRNA's en AHNF.



Vías en las que intervienen los genes expresados y no expresados diferencialmente (Figura No.29). En las Redes de coexpresión; se identifican las relaciones entre lncRNA's y miRNA's y su posible función, mecanismo o evento molecular asociado.

ID	Species (miRNA)	Species (Target)	miRNA	Target	Validation methods							Sum	# of papers
					Strong evidence			Less strong evidence					
					Reporter assay	Western blot	qPCR	Microarray	NGS	pSILAC	Other		
MIRT000019	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	RASGRP1	✓	✓	✓	✓	✓		✓	6	4
MIRT000144	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-217	SIRT1	✓	✓	✓				✓	4	2
MIRT000148	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-214-3p	EZH2	✓	✓	✓				✓	4	5
MIRT000149	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-210-3p	HOXA9	✓						✓	2	1
MIRT000150	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-210-3p	TP53I11	✓						✓	2	1
MIRT000151	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-210-3p	PIM1	✓						✓	2	1
MIRT000152	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-210-3p	HOXA1	✓						✓	2	1
MIRT000153	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-210-3p	FGFRL1	✓	✓	✓	✓	✓		✓	6	3
MIRT000156	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-210-3p	RAD52	✓	✓	✓				✓	4	3
MIRT000157	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	CDC25A	✓		✓	✓	✓		✓	5	4
MIRT000158	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	TP53							✓	1	1
MIRT000159	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	BCL2	✓	✓	✓		✓		✓	5	10
MIRT000163	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	WIBG							✓	1	2
MIRT000164	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	WFS1							✓	1	2
MIRT000166	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	TM9SF3	✓						✓	2	2
MIRT000167	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	RTN4	✓				✓		✓	3	3
MIRT000168	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	RPS7		✓	✓	✓	✓		✓	5	17
MIRT000169	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	PLOD3	✓						✓	2	2
MIRT000170	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	PDHA2							✓	1	2
MIRT000171	Homo sapiens	Homo sapiens	hsa-miR-21-5p	NCAPG	✓						✓	2	2

Resultados obtenidos de la búsqueda en la base de datos de miRTarBase (Figura No.30) donde se puede apreciar algunos de los genes blanco de cada microRNA (para este caso el Hsa-mir-21 sin embargo, se realizó la búsqueda para cada microRNA en algunos casos no se tuvo éxito en la recolección de datos por lo que se efectuó la búsqueda en otras bases de datos) así como los métodos de validación del microRNA y su gen blanco dependiendo de la evidencia (Microarreglos, qPCR, WesternBlotn etc.) también podemos apreciar el número de artículos que puedes consultar al respecto siendo nula la información para AHNF y muy poca para otros tipos de cáncer

Statistics

### TarBase v.8

Help

Related Pathways

**Please cite:**  
 Dimitra Karagkouni, Maria D. Paraskevopoulou, Serafeim Chatzopoulos, Ioannis S. Vlachos, Spyros Tastsoglou, Ilias Kanellos, Dimitris Papadimitriou, Ioannis Kavakiotis, Sofia Maniou, Giorgos Skoufos, Thanasis Vergoulis, Theodore Dalamagas, Artemis G. Hatzigeorgiou, DIANA-TarBase v8: a decade-long collection of experimentally supported miRNA-gene interactions, Nucleic Acids Research, gkx1141. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1141>

**Bulk download:**  
 We have updated the bulk download module, which simplifies the download process! Please find the new online form by following this [link](#)

miRNAs

Genes

hsa-miR-22-3p

Filters

Interactions: 1891, Experiments: 55 (low: 18, high: 37, unknown: 0) Cell lines: 30, Tissues: 13, Publications: 29

Species

Method Type

Method

Regulation type

Validation Type

Validated as

Cell Type

Tissue

Source

Source

Publication Year

Prediction score

Gene name	miRNA name	Experiments throughput	Publications	Cell lines	Tissues	Pred. Score
<b>STAG2</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 2	2	2	2	0.939
<b>High-throughput experiments (2 positive, 0 negative)</b>						
Publication	Methods	Tissue	Cell line	Tested cell line	Exp. condition	
Kishore S et al. 2011	IP	Kidney	HEK293	N/A	mild MNase digestion	
Eva Gotwein et al. 2011	IP	Pleura	BC1	N/A	N/A	
<b>CHD9</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 3	2	3	2	0.935
<b>ESR1</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 1 high: 0	1	1	1	0.934
<b>DDIT4</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 10	5	6	4	0.932
<b>WDR82</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 12	6	7	6	0.931
<b>ARHGEF12</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 9	2	3	3	0.929
<b>CCNJL</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 1	1	1	1	0.928
<b>HIPK1</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 10	5	4	4	0.927
<b>HIPK1</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 10	5	4	4	0.927
<b>KDM6B</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 1	1	1	1	0.926
<b>C5orf24</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 8	4	4	4	0.920
<b>IPO7</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 2	2	2	2	0.920
<b>ZBTB39</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 2	2	2	2	0.919
<b>NRAS</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 1	1	1	1	0.917
<b>PLCXD3</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 1	1	1	1	0.916
<b>CYR61</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 1	1	1	1	0.911
<b>PTEN</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 4	2	2	2	0.909
<b>High-throughput experiments (4 positive, 0 negative)</b>						
Publication	Methods	Tissue	Cell line	Tested cell line	Exp. condition	
Boudreau RL et al. 2014	IP	Brain	N/A	N/A	N/A	
Kameswaran V et al. 2014	IP	Pancreas	BETA Cells	N/A	N/A	
<b>UGCG</b>	<b>hsa-miR-22-3p</b>	low: 0 high: 1	1	1	1	0.902

Resultados obtenidos de la búsqueda en la base de datos de DIANA Tools TarBase v.8 (Figura No.31). En la cual nos brinda información de cada microRNA con su gen blanco, se aprecia un score el cual nos permite seleccionar que blanco es el ideal entre las cercano a uno mejor, además de información sobre el tipo de tejido o línea celular en el que se identificó dicho microRNA-blanco también se puede observar el número de publicaciones que existen al respecto de esa interacción microRNA-blanco. En este ejemplo podemos apreciar el Hsa-mir-22 al que se le selecciono el gen blanco PTEN por su score 0.909 y porque el tejido que se utilizó para identificarlo proviene de cerebro sin embargo lo ideal sería que fuera de hipófisis tumoral pero no existe literatura por ahora que reporte este microRNA en AHNF, en otros tipos de cáncer se ha reportado, validado e incluso se han realizado exámenes funcionales.

## 9. Discusión

Este trabajo, sirve como punto de partida en el análisis de las alteraciones de los perfiles de expresión génica en AHNF. Una forma de realizar estos análisis es el uso de herramientas bioinformáticas, que permiten extraer información a nivel de expresión de genes. De tal manera que el enfoque bioinformático se convierte en una herramienta poderosa para predecir no solo en adenomas hipofisarios (AH) sino en un grupo creciente de enfermedades crónicas que se han convertido en problemas de salud pública a nivel mundial entre ella se encuentra el cáncer.

La incorporación de los perfiles de expresión en pacientes con AH constituye una revolución en la oncología en general. El estudio del transcriptoma en AHNF es probablemente el primer esfuerzo prospectivo en evaluar la utilidad de marcadores moleculares en decisiones aplicables para la toma de decisiones terapéuticas que potencialmente pueden cambiar la comprensión de la oncología actual.

En este trabajo se construyó un modelo *in silico* de expresión de muestras problema (AHNF) y muestras control (tejido no tumoral), a partir de datos de expresión de genes provenientes de experimentos de micromatrices los cuales permiten analizar el transcriptoma completo entre codificantes y no codificantes y se encuentran disponibles en la base de datos de GEO de acceso libre.

El análisis de microarreglos que se realizó nos permitió construir un modelo de perfiles de transcripción diferencial donde se identificaron al menos 54613 genes con alteraciones en sus niveles de expresión génica los cuales al filtrarlos con criterios estadísticos específicos y rigurosos previamente mencionados en el plan estadístico y desarrollado posteriormente de forma detallada se obtuvieron un total de 35 genes que pasaron dichos criterios, los cuales corresponde a microRNA's y LincRNA's, que se caracterizan por su expresión o por su ausencia.

Siempre que se trabaja en experimentos de microarreglos se evalúan miles de hipótesis simultáneamente por lo que un análisis sin las debidas correcciones estadísticas puede generar resultados falsos significativos, si no se emplean dichas correcciones la tasa de resultados falsamente positivos sería muy elevada por lo tanto para controlar esto, se realizó un ajuste a los valores de p-value, FDR, Fold Change y se llevó a cabo la Normalización de los datos, dichos valores además permitieron realizar un filtrado de los genes tanto codificantes como no codificantes y seleccionar aquellos genes que para este proyecto son microRNA's y LincRNA's que cumplan con los criterios estadísticos presentados en este plan estadístico.

El primer criterio fue la normalización la cual, se utiliza para eliminar la variabilidad sistemática, inducida por el proceso y que no está relacionada con el nivel de expresión, esta corrección del ruido de fondo se logró mediante un promedio robusto de múltiples chips o RMA integrado en TAC y los datos se transformaron a  $\log_2$ .

Con respecto al valor asignado para FDR (Tasa de descubrimientos Falsos) el cual es la tasa de falsos rechazados que puedo permitirme en mi análisis, se seleccionó un valor de  $< 0.05$  para este criterio ya que tengo así un 5% de probabilidad de permitirme falsos rechazados. El control de FDR es un método estadístico utilizado en pruebas de hipótesis para corregir comparaciones múltiples.

Otro parámetro fue el P-value este valor de probabilidad oscila entre 0 y 1 siendo el valor de  $\leq 0.05$  un valor típico para este tipo de análisis o sistemas biológicos, este valor estima el 5% de probabilidad de que mis resultados observados se deben al azar además este valor tiene relación con la fiabilidad del estudio ya que entre menor es mi valor de p-value más fiable es mi estudio, el valor de p-value está relacionado con los intervalos de confianza los cuales marcan límites, estos límites marcan la precisión del estudio por lo tanto con un nivel de confianza del 95% tengo un 5% de probabilidad de que mis resultados se deban al azar.

El siguiente parámetro es el Fold Change al cual se le asigno un valor de  $< -2$  o  $> 2$ , ya que me permite estudiar la relación entre dos cantidades y describe cuánto cambia una cantidad entre un original y una medición posterior este parámetro es útil en mediciones múltiples de sistemas biológicos tomadas en diferentes momentos como es el caso para este proyecto, ya que mide el cambio en el nivel de expresión de un gen y los cambios en los componentes asociados con la interacción.

La agrupación y categorización de datos se logró mediante el PCA. Los genes expresados diferencialmente se determinaron mediante ANOVA.

Una vez aplicado cada uno de los criterios estadísticos mencionados anteriormente se seleccionaron aquellos genes que se consideren alterados con un cambio en los parámetros de  $< -2$  o  $> 2$  veces de Fold Change,  $P \leq 0.05$ , y  $FDR < 0.05$ .

Se realizó la búsqueda en diferentes bases de datos bioinformáticas para identificar los posibles genes blanco para cada microRNA's y LincRNA's entre ellas se

encuentran: miRecords, miRWalk, TarBasw, TarBase, DIANA-microT, MicroInspector, miRanda, MirTarget2, miTarget, y TargetScan/TargetScanS. Esto con la finalidad de buscar los posibles genes blancos para cada miRNA, sin embargo, no todas las bases de datos arrojan los posibles datos esperados, el motivo es sencillo, ya que hasta la fecha solo se han descrito 3500 secuencias de ncRNA's del *Homo sapiens* las cuales son almacenadas en las diferentes bases de datos como miRBase, MirTarget2 etc. Por lo que no todas las bases de datos arrojan el resultado esperado.

Se utilizó la base de datos miRecords ya que ofrece marcadores validados, ofreciendo un análisis diferencial con otras bases de datos distintas a la vez, basadas en diferentes características como: secuencia semilla, complementarias hacia 5'-3' o CDS, termodinámica etc.

Para la predicción de los marcadores fue utilizada "miRecords", y para conocer cuáles de estos ya han sido validados, se utilizó "miR TarBase" y "TarBase" (Figuras 30 y 31).

Una vez localizados los genes blancos de los miRNA's, se realizó la búsqueda en la literatura y en bases de datos bioinformáticas como KEGG que está implicado en la tumorigénesis y que puede predecir si eventualmente pudieran ser potenciales marcadores moleculares en los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes.

Los resultados obtenidos nos permitieron correlacionar los microRNA's y LincRNA's y su potencial papel en las funciones asociadas a adenomas hipofisarios no funcionantes.

Con base a nuestros resultados obtenidos en la figura No. 18 la cual corresponde al Análisis de Componentes Principales (PCA), podemos apreciar a simple vista un transcriptoma fácilmente distintivo entre las muestras, siendo las de las muestras de AHNF de color rojo y las muestras de hipófisis no tumorales de color azul. Observándose así una distribución bastante heterogénea entre las dos muestras, esto implica que en efecto existe una diferencia bastante significativa entre ellas ya que forman dos grupos bien diferenciados y segregados, lo que corrobora la existencia de dos perfiles de expresión distintos indicando así, diferencias biológicas entre los dos grupos, estas diferencias permiten distinguir entre posibles vías celulares y moleculares alteradas.

Por otro lado en el figura No.19 el Clúster jerárquico que corresponde a los microRNA's y LincRNA's expresados diferencialmente entre muestras de AHNF en comparación con la hipófisis no tumoral, corrobora una vez más la existencia de estos dos perfiles de expresión distintivos una para adenomas y otra para hipófisis no tumorales, observándose también los 35 ncRNA's entre microRNA's y LincRNA's (obtenidos de los rigurosos parámetros estadísticos mencionados en el diseño experimental) y su expresión diferencial en cada una de las muestras, las cuales corresponde aun igual número de pacientes, a partir de esta representación y del comportamiento de su expresión diferencial en las 22 muestras y una vez aplicado

cada uno de los criterios estadísticos mencionados anteriormente en el apartado de plan estadístico se seleccionaron aquellos genes que se consideran alterados con un cambio en los parámetros de  $< -2$  o  $> 2$  veces de Fold Change,  $P \leq 0.05$ , y  $FDR < 0.05$ .

Una vez obtenidos los microRNA's y LincRNA's que mejores resultados obtuvieron de acuerdo a nuestro plan estadístico se seleccionaron los microRNA's y LincRNA's que mejor cumple con los criterios para una expresión génica alterada al identificar un cambio de  $+2$  o  $-2$  en el Fold Change en comparación con las hipófisis no tumorales un  $P$ -value  $\leq 0.05$ , y  $FDR < 0.05$  (además de apoyase de las representaciones gráficas y visuales obtenidas de TAC como lo es el clúster jerarquizado de expresión diferencial y las graficas de barras para conocer su comportamiento) los cuales fueron: El Hsa-mir-21, Hsa-mir-22 y Hsa-mir-181, así como el LincRNA00672, implicados como posibles marcadores moleculares en la tumorigénesis de AHN..

### **Hsa-mir-21**

El Hsa-mir-21 funciona como un modulador de la tumorigénesis a través de la regulación de genes blanco que están involucrados en el proceso de apoptosis, proliferación, adhesión y migración celular; algunos de los genes blanco del mir21 se encuentran implicados en la regulación a nivel funcional controlando una gran cantidad de proteínas expresadas, al encontrarse no expresado como es el caso en AHNF el proceso de regulación del mir21 es regulado negativamente, conlleva al aumento de la expresión de proteínas blanco implicadas en los genes diana generando así una desregulación aguas abajo de cada uno de sus genes blanco y por ende una desregulación de las proteínas que regula a miR21, un ejemplo claro son las proteínas de la familia Bcl-2 que juegan un papel clave en el control de la apoptosis. Regulada por mir21, la proteína antiapoptótica más importante Bcl-2, cuya sobreexpresión celular y fosforilación están involucradas en la regulación de la proliferación celular, el ciclo celular, la reparación de DNA, la tumorigénesis y la quimiorresistencia (39) (54).

Por tanto, el Hsa-mir-21 juega un papel clave en la regulación de la diferenciación fenotípica y funcional de proteínas a través de la expresión de modulación de sus genes diana, sin embargo, es posible que otros miRNA's que se obtuvieron en este análisis, también puedan contribuir a la regulación de genes diana. No es irracional especular que al alterar la expresión de una combinación de ncRNA's y genes blanco estos puedan conducir a una regulación alterada en la tumorigénesis de AHNF (39) (55) (52).

Se ha demostrado que miR-21 se sobreexpresa en muchos tipos de cáncer, incluidos los de mama, colon, pulmón, páncreas, próstata y estómago entre otros. Por lo tanto, es muy probable que miR-21 desempeñe un papel fundamental en el comportamiento de las células tumorales y la transformación maligna. La expresión alterada de miR-21 puede tener varios efectos diversos en las células tumorales aún se desconocen sus vías moleculares y celulares en AHNF sin embargo, y de acuerdo a los datos obtenidos la no expresión del mir21 en muestras de AHNF sigue una regulación

negativa de vía moleculares como la de Bcl-2 sin embargo, su comportamiento molecular en AHNF puede ser variable ya que al no secretar un exceso de hormonas probablemente las vías moleculares de regulación cambie y sean diferentes, ya que otra característica de estos AH es la poca capacidad invasiva de estructuras adyacentes a la hipófisis ya que la incidencia de invasión es de 1 caso por cada millón de habitantes y si lo comparamos con otros tipos de cáncer esta capacidad invasiva es mucho menor que el resto (53) (56).

Hsa-miR-21 también promueve la invasión celular, la migración y el crecimiento mediante la represión de la expresión de PTEN y los efectos posteriores que implican la fosforilación de FAK y AKT. La identificación de miR-21 como un importante regulador de la proliferación, migración e invasión de células tumorales enfatiza un papel esencial de este miRNA en la mediación de la oncogénesis y el comportamiento tumoral (56) (57).

Atacar estos mecanismos puede conducir a un tratamiento más efectivo para los pacientes con AHNF. Existe un considerable interés en la terapia dirigida específicamente a las vías de señalización clave involucradas en la tumorigénesis y el crecimiento tumoral, como la vía de la fosfoinositida-3 quinasa, que está regulada por PTEN (56). Una aplicación práctica de los resultados obtenidos por TAC podría ser el uso de la expresión de miR-21 como un predictor potencial de tumores que pueden ser más propensos a responder a las terapias dirigidas (56) (57).

La expresión de mediadores aguas abajo del crecimiento tumoral podrían modularse dirigiéndose a miR-21. Por lo tanto, las estrategias terapéuticas para disminuir miR-21 pueden ser útiles para limitar el crecimiento de AHNF, sin embargo, aún se requiere evaluar el papel de miR-21 y los objetivos identificados aguas abajo para en un futuro no tan alejado desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas a miR-21 *in vivo*. Un microRNA expresado como miR-21, puede ser útil para establecer un diagnóstico y evaluar el pronóstico en AHNF. El conocimiento de procesos específicos como la proliferación, invasión y migración de células tumorales que están siendo regulados por miRNA's, y la identificación de objetivos críticos para miRNA individuales como PTEN, proporcionan nuevos conocimientos sobre los mecanismos de tumorigénesis en AHNF (56) (57).

Se ha demostrado que mir21 regula al inhibidor de la metaloproteasa de matriz RECK, y se ha identificado que este gen está regulado a su vez por IL-13 en pulmón sin embargo, aún se desconoce su función en AHNF (59) (60).

Hsa-mir-21, es el miRNA más frecuentemente elevado en cáncer existe evidencia en la literatura científica de este microRNA en cáncer de pulmón, cervix, gliomas, mama entre otros sin embargo, en Adenomas Hipofisarios no existe evidencia científica por lo que es preciso dilucidar un mecanismo molecular de este Hsa-mir-21 en AHNF en este proyecto se pretende postular un posible mecanismo molecular implicado en la tumorigénesis de AH y cabe resaltar que el análisis bioinformático que

se realizó permite realizar predicciones de posibles genes implicados en AHNF y que posteriormente podrían validarse por PCR-RT.

Existen muchos mecanismos asociados con niveles elevados de Hsa-mir-21. La expresión de Hsa-mir-21 es estimulada por una variedad de vías asociada con cáncer, como la hipoxia, la inflamación, la AP-1 (proteína activadora) y las hormonas esteroideas. La expresión elevada de Hsa-mir-21 da como resultado un mayor crecimiento y una menor apoptosis, ya que se ha demostrado que Hsa-mir-21 elevado induce un fenotipo linfocitoide maligno pre-B en modelos animales y que era necesaria la expresión continua de Hsa-mir-21 para mantener el fenotipo tumoral, por lo que indica que Hsa-mir-21 es un verdadero oncogén. Por otro lado, la eliminación de Hsa-mir21 en modelos animales redujo la formación de tumores (40).

Se ha identificado a mir-21 como una llave molecular asociada a diferentes neoplasias, existen bastantes estudios funcionales que demuestran la relación causa-efecto entre mir-21 y la transformación neoplastica, sugiriendo que mir-21 tiene actividad oncogénica sin embargo, como se ha mencionado existen bastantes estudios funcionales con respecto a diferentes tipos de neoplasias pero ninguno hasta ahora se ha enfocado en adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes y cómo es que este influye en la tumorigénesis (62) (63) (56).

### **Hsa-mir-22**

Numerosos estudios han revelado que miR-22 funciona como un miRNA supresor de tumores o como un onco-miRNA para inhibir o promover la formación de tumores y la transformación maligna del nivel genético al postranscripción a través de mecanismos complejos, en los que miR-22 podría estimular o apagar diferentes cascadas de eventos relacionados con vías interactuando directa o indirectamente con moléculas/ vías aguas arriba o aguas abajo, ya sea sinérgicamente o antagónicamente. Además, como la formación de redes de retroalimentación positiva o negativa relacionados con miR-22 amplifica extraordinariamente los efectos inhibidores o promotores de miR-22 en una variedad de diferentes tipos de cáncer, por lo tanto, miR-22 e innumerables moléculas relacionadas constituyen redes complejas de señalización donde miR-22 está en el centro de los eventos. (65)

Indicando que miR-22 puede servir como un objetivo terapéutico esperanzador para tratamientos de precisión en diversos tipos de cáncer para inhibir la proliferación, migración, invasión y metástasis, debilitando o revirtiendo la quimiorresistencia a los medicamentos contra el cáncer. Además, la expresión de miR-22 en las células cancerosas y los fluidos corporales puede fluctuar en diferentes tipos de cáncer y en diferentes etapas de crecimiento en el mismo cáncer, lo que hace posible que miR-22 sea un potencial marcador molecular en la tumorigénesis de AHNF y complementario o incluso independiente en el diagnóstico del cáncer, monitoreando el tratamiento efectos y pronóstico (65).

## PTEN

La supresora tumoral fosfatasa y homólogo de tensina conocido como PTEN es una fosfatasa lipídica implicada en la regulación del ciclo celular. Las mutaciones inactivadoras de este gen o de sus reguladores contribuyen al desarrollo de ciertos tipos de cáncer. Los sustratos principales de PTEN son fosfoinositidas, particularmente fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3) cuyos niveles intracelulares se reducen después de su desfosforilación por PTEN a un producto de difosfato (PIP2), y en consecuencia se restringe la actividad y señalización de la quinasa AKT. La familia de factores de transcripción FoxO es uno de los sustratos directos aguas abajo de AKT. Las proteínas FoxO son fosforiladas por AKT y se translocan del núcleo al citoplasma, donde se degradan a través de la vía ubiquitina-proteasoma (65)

Cuando PTEN está activo y se suprime la actividad de AKT, las proteínas FoxO pueden ingresar al núcleo y regular los genes que promueven la detención del ciclo celular o la apoptosis. El mRNA de PTEN tiene un 3'UTR inusualmente largo, aproximadamente 3,3 kb, que sugiere un control estricto post-transcripcional de la expresión de PTEN. Dentro del PTEN 3'UTR hay varios sitios objetivo de microRNA's conservados y se ha demostrado que PTEN está reprimido por miR-21, 214, 216a, 217, 17-92 y 26 (65).

Una de las cascadas de señalización más importantes que modulan la progresión del ciclo celular y la supervivencia celular en muchos tipos de células es PTEN / PI3K / AKT, que se desregula en varios tipos de cáncer. En el presente estudio, hemos identificado un componente previamente desconocido de esta vía, miR-22. miR-22 apunta a PTEN directamente a través de un sitio conservado en el PTEN 3'UTR (65).

La vía PTEN / AKT es funcional en la mayoría de los tipos de células y tejidos y también lo es la expresión de miR-22. Por lo tanto, miR-22 no sirve para eliminar la expresión de PTEN, sino para ajustar sus niveles de expresión de acuerdo con las necesidades fisiológicas de la célula (65).

La expresión de miR-22 en sí se ve afectada por la vía PTEN/AKT, de una manera que genera un circuito regulador de alimentación positivo. En este circuito regulador, miR-22 suprime la expresión de PTEN que conduce a una mejora de la actividad de AKT, que a su vez regula al alza la transcripción de miR-22. Por lo tanto, en esta red reguladora, miR-22 actúa para mejorar la señalización de AKT (65).

La evidencia acumulada revela que un microRNA puede regular múltiples objetivos y un gen puede estar bajo la regulación de varios microRNA's. En consecuencia, tanto miR-22 como PTEN pueden estar asociados con otros sistemas reguladores. Recientemente se descubrió que PTEN está regulado por múltiples miRNA's, incluidos miR-21 miR-214. Teniendo en cuenta el papel central que tiene PTEN en la progresión y supervivencia del ciclo celular, PTEN probablemente estén

influenciados por microRNA's adicionales, algunos de los cuales ejercerían su efecto de una manera específica de tipo celular compatible con el sitio de su expresión (65)

El hsa-mir-22 actúa como supresor de tumores u oncogenes en diversos tipos de cáncer. Sin embargo, su expresión precisa, función y mecanismo en AHNF aún no comprendido del todo claro. En el análisis encontramos que la expresión de miR-22 se redujo significativamente en los tumores en comparación con tejidos normales, por lo que la inhibición de miR-22 en diferentes tipos de cáncer promueve la proliferación, migración e invasión tumoral (64).

Nuestro estudio muestra que miR-22 se expresa diferencialmente en células humanas no tumorales y cancerosas. De acuerdo con nuestros hallazgos en las bases de datos bioinformáticas de microRNA's, la desregulación de miR-22 en cáncer y enfermedades humanas se ha documentado en varios experimentos de creación de perfiles de miRNA's. miR-22 está regulado negativamente en el colangiocarcinoma intrahepático (Kawahigashi et al., 2009) y silenciado en la leucemia linfoblástica aguda (Calin et al., 2004), pero está regulado en la osteoartritis (Iliopoulos et al., 2008) (69) (65).

Estos niveles variables de expresión de miR-22 pueden sugerir diferentes requisitos para alteraciones en sus rutas de genes diana. miR-22 regula un repertorio de genes relacionados con el cáncer; sin embargo, no hay indicios de la importancia de miR-22 en la tumorigénesis a través de los genes asociados a la senescencia.

La capacidad de los miRNA para afectar muchos mRNA es similar a la capacidad de los factores de transcripción para regular muchos promotores simultáneamente (69).

Estudios recientes demuestran que miR-22 constituye un circuito de retroalimentación con c-myc y MYCBP y forma un circuito regulador en la ruta de la fosfatasa y el homólogo de tensina-AKT. El gen miR-22 humano se encuentra en una región de pérdida mínima de heterocigosidad en el cromosoma 17 cerca de p53. (69)

Por lo tanto, podemos decir que miR-22 podría estar induciendo cambios complejos y la amplia cooperación entre miR-22 y p53 que se sabe está involucrada en el programa de senescencia, que aún no se ha dilucidado por el momento (69).

Teniendo en cuenta que la progresión tumoral, incluida la proliferación, la invasión y la metástasis, están íntimamente involucradas en el estado de crecimiento tumoral y el suministro de energía, miR-22 podría interrumpir estos procesos al mediar el estado de crecimiento tumoral y el suministro de energía. Se sabe que miR-22 induce la expresión de p53 y al mismo tiempo se dirige a SIRT1, CDK6 y Sp1 para activar la vía de señalización de pRb, acelerando así la senescencia, retardando el crecimiento celular, invasión y metástasis en diferentes tipos de cáncer: el cáncer cervical y el cáncer de mama, lo que muestra efectos anticancerígenos evidentes.

miR-22 inhibe la proliferación tumoral, la invasión y la metástasis mediante la represión del ciclo celular tumoral y la promoción de la apoptosis.

Se sabe universalmente que numerosas células cancerosas entran continuamente en proliferación y división a través del punto de control G0 / G1 junto con la reducción de la apoptosis, lo que eventualmente causa un rápido crecimiento y aumento de tamaño del cáncer. Recientemente, una amplia evidencia ha demostrado que miR-22 podría reprimir el proceso tumoral maligno mediante la inhibición del ciclo celular. Por ejemplo, miR-22 puede apuntar post-transcripcionalmente a la ciclina A2 y CDKN1A (inhibidor de la quinasa dependiente de ciclina 1A) para detener el ciclo celular en el fago G0 / G1 (65).

Estos hallazgos confirmaron que los efectos finales de miR-22 por la detención del ciclo celular de diferentes maneras pueden conducir a la atenuación del crecimiento y la invasión del cáncer y la interrupción de la progresión tumoral maligna, lo que indica que miR-22 en respuesta a diferentes carcinógenos puede servir como un miRNA supresor tumoral para mitigar o bloquear la aparición y el desarrollo del cáncer (65)(70)

Varios estudios en la actualidad han validado que miR-22 podría influir en la proliferación tumoral al regular la vía de señalización relacionada con las hormonas. Por ejemplo, la proliferación y migración de células de cáncer de mama ER $\alpha$ -positivas pueden ser atenuadas por miR-22 inducido por 1,25-(OH)-2 D3 (el metabolito in vivo de la vitamina D3) y por la introducción ectópica de miR -22, respectivamente, insinuando que la regulación de miR-22 participa en la vía de transducción de señales hormonales por lo que no debe ignorarse como mecanismo fundamental subyacente para la tumorigénesis y la progresión.

Además, se ha demostrado que miR-22 puede mejorar profundamente la quimiosensibilidad a los medicamentos contra el cáncer al trabajar íntimamente con muchos otros miRNA. En el cáncer de ovario de células claras, la vía PI3K/Akt/mTOR se reprimió predominantemente debido a los efectos combinados al atacar directamente tanto el FGFR3 (receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos) como el mTOR por miR-100 y al mismo tiempo atacar EVI1 por miR-22, permitiendo la posterior inhibición de la proliferación, el crecimiento y la supervivencia, que, al final, aumenta la quimiosensibilidad al medicamento everolimus contra el cáncer (65) (70).

Múltiples estudios sugieren que miR-22 puede mejorar notablemente la quimiosensibilidad o revertir la quimiorresistencia a los medicamentos contra el cáncer mediante una variedad de mecanismos subyacentes, y que múltiples medicamentos contra el cáncer con efectos predominantemente terapéuticos pueden maximizar aún más sus ventajas o minimizar las desventajas al aumentar la expresión de miR-22 al inhibir la proliferación, migración e invasión del cáncer. Por lo tanto, para obtener los efectos óptimos de tratamiento para miR-22 como una intervención terapéutica adyuvante en un futuro cercano, se deben dilucidar si los mecanismos potenciales de

miR-22 en la regulación de la quimiosensibilidad o quimiorresistencia serán beneficiosos para pacientes con varios tipos de cáncer (65) (70).

### **Hsa-mir-181**

Los resultados obtenidos indicaron que miR-181 se expresaron en tejidos de AHNF. Estos hallazgos plantearon la posibilidad de que miR-181 pudiera tener un papel importante en el desarrollo de la tumorigénesis. Sin embargo, la base molecular de este fenotipo no se ha dilucidado y el estado de los objetivos aguas abajo de miR-181b no han sido investigados por el momento (67).

Para explorar el mecanismo del miR -181, realizamos un análisis bioinformático, y CTDSPL identificándose como un gen objetivo candidato de los miembros de la familia miR -181 a través de tres algoritmos disponibles públicamente (TargetScan y miRanda).

Se conoce un ensayo donde la luciferasa de luciérnaga indicó que todos los miembros de la familia miR -181 podrían inhibir la expresión de CTDSPL a través de la unión directa a la 3'-UTR de CTDSPL. Esto confirma que el miR-181 (y sus miembros) están altamente conservados y comparten una función común de unión directa al 3'-UTR de CTDSPL (67).

El análisis bioinformático realizado demostró que CTDSPL era el objetivo de los miembros de la familia miR-181. Una regulación negativa significativa de CTDSPL y una regulación positiva de E2F1. La vía molecular subyacente responsable de los efectos de miR-181 en la supervivencia podría controlar la transición de fase G0/G1 a S a través de la represión de CTDSPL.

CTDSPL es un importante gen supresor de tumores similar a la fosfatasa ubicado en 3p21.3, y pertenece a la pequeña familia de fosfatasa de dominio C-terminal, que modula la vía de señalización RB/E2F1 y da como resultado la detención del ciclo celular en el límite G1 / S.

En este trabajo, se descubrió que miR-181 podría controlar la transición de fase G0 / G1 a S reprimiendo CTDSPL y regulando la expresión de E2F1.

### **LINCRNA00672**

En este análisis se indicó que LINC00672 podría ser un objetivo transcripcional de p53. Se ha encontrado que la región promotora de LINC00672 contiene motivos de unión a p53 canónicos altamente conservados (68).

Debido a que también está involucrado en la organización del citoesqueleto y la motilidad celular, su eliminación de LASP1 a menudo conduce a una disminución de la migración y la proliferación de células cancerosas humanas. Nuestros datos revelaron

que la sobreexpresión de LINC00672 podría estar asociada a la proliferación, migración e invasión en diferentes tipos de cáncer (68).

Como proteína reguladora del citoesqueleto, el nivel de LASP1 parecía estar regulado por aumento en las células cancerosas humanas inducidas resistentes a diferentes quimioterapéuticas. Por lo tanto, la sobreexpresión de LINC00672 podría reducir y promueve la quimiosensibilidad de las células cancerosas. Estos hallazgos y nuestros datos sugieren que LINC00672 participa en la supresión mediada por p53 de LASP1 a través de su interacción con hnRNP (68).

En resumen, este estudio representa un gran análisis de muestras la expresión de LINC00672, que está significativamente regulado por la expresión en los tejidos tumorales de AHNF. La sobreexpresión de LINC00672 reduce la migración y la proliferación de células. Estos efectos antitumorales de LINC00672 se relacionan al menos parcialmente en cooperación con hnRNP durante la supresión de LASP1 mediada por p53 (68).

En general, nuestros hallazgos aclaran la función de los lincRNA que sirven como marcadores de posición conservados que participan en procesos regulatorios transcripcionales canónicos y, por lo tanto, desempeñan papeles cruciales para el inicio y la progresión del cáncer.

Estas evidencias indicarían que la tumorigénesis de AHCN que en la actualidad aqueja a nuestra especie, no puede explicarse simplemente por la expresión alterada de un ncRNA, sino por el contrario, sería el producto de alteraciones múltiples, interacciones génicas que controlan la homeostasis molecular por lo que no solamente debería verse desde el punto de vista individual sino como un conjunto.

Aunque los miRNA's y LincRNA's se han implicado en diversos procesos biológicos, los genes diana de muchos de estos siguen sin resolverse. Hasta ahora, solo se ha caracterizado directamente un pequeño subconjunto de objetivos de miRNA y lincRNA's humanos predichos. Reducir los genes objetivo-reales se ha vuelto cada vez más difícil debido a la abundancia de algoritmos de predicción, la alta tasa de falsos positivos y cientos de posibles objetivos generados por cada algoritmo. Además, cuando se sabe que múltiples miRNA's regulan de manera coordinada un proceso particular, el alto número de objetivos predichos hace que sea técnicamente difícil evaluar la importancia de cada gen objetivo o implicar la red reguladora de miRNA's-lincRNA's-proteína relevante. Por lo que se sugiere que se realice estudios funcionales de estos ncRNA's, lo cual sería beneficioso ya que se tendría un grupo restringido de objetivos predichos que puedan verificarse experimentalmente y así confirmarse.

### **Vías de enriquecimiento e interacción proteína- proteína**

Posteriormente se llevó a cabo un análisis de enriquecimiento de vías en Metascape (se utilizó esta base de datos para entender el significado biológico detrás

de la lista de genes resultante del análisis estadístico y así obtener información de las vías celulares o moleculares asociadas) donde se seleccionaron los 35 microRNA's y LincRNA's obtenidos del filtrado de datos, los cuales arrojaron vías de silenciamiento de genes por miRNA's y regulación negativa de la transducción de señales intracelulares (Figura 28), las cuales son características propias de los ncRNA's de LincRNA's como microRNA's.

Posteriormente se obtuvo también redes de coexpresión (Figura No. 29) estas redes me permiten predecir las posibles vías celulares y moleculares en las que podrían participar por lo tanto si los niveles de expresión de dos transcritos esta correlacionado linealmente de forma coherente no solo entre dos, sino muchas muestras se determinan que estos dos transcritos se coexpresan. Tal coexpresión puede sugerir que la expresión de dos transcritos esta co-regulada por uno o más reguladores, o que un transcrito regula la expresión de otro. Siendo los ncRNA's reguladores de la expresión de RNAm blancos y dado que las funciones de los RNAm se comprenden mejor en general mucho mejor que las funciones de ncRNA's, la identificación de estas relaciones de coexpresión entre un RNAm y ncRNA específico puede comenzar a revelar la función y/o mecanismo de acción de ese ncRNA. En base a los resultados obtenidos (figura 29) las redes de coexpresión tiene una regulación negativa y esto concuerda con el mapa de enriquecimiento ya que los microRNA's y LincRNA's regulan la expresión génica a nivel transcripcional y post-transcripcional por lo tanto bloquean la síntesis de productos proteicos por desestabilización del mRNA.

## 10. Conclusiones

Se logró la identificación de perfiles de expresión definidos y diferentes entre controles y tumores lo que permitió agruparlos y sepáralos esto lo apreciamos a simple vista en análisis de componentes principales.

Se determinaron los potenciales eventos moleculares asociados a la regulación por LincRNA's y miRNA's, que se encuentran presentes en los adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes, entre los eventos moleculares asociados tenemos la proliferación celular, progresión del del ciclo celular, promoción de transformación tumoral.

Se logró la identificación de RNA's no codificantes específicamente microRNA's y LincRNA's como potenciales marcadores moleculares y su probable participación en la tumorigénesis de adenomas hipofisarios clínicamente no funcionantes entre los mencionados tenemos a Hsa-mir-21, el cual regula a la proteína antiapoptótica más importante Bcl-2, cuya sobreexpresión celular y fosforilación están involucradas en la regulación de la proliferación celular, el ciclo celular, la reparación de DNA, la tumorigénesis y la quimiorresistencia, Hsa-mir-22 que juega un papel regulador clave en la promoción del proceso tumoral a través de la inhibición de la fosfatidilinositol-3,4,5-trisfosfato 3-fosfatasa involucrada en la promoción del complejo de PI3K/AKT,

Hsa-mir181, involucrado en la proliferación celular al inhibir a la proteína similar a la fosfatasa pequeña y desfosforila a proteína del retinoblastoma liberando así al factor de transcripción E2F1 el cual aumenta y promueve el ciclo celular y el LincRNA0672 involucrado en la regulación de la proteína supresora p53 la cual frena a la proteína LASP1 que participa en la quimioresistencia, invasión y migración tumoral

## 11. Bibliografía

1. Dhaity, G. , Urbina, E. Rodríguez, F., Lara, C. y Núñez, P. (2015). Reporte de dos casos de hermanas biológicas no gemelas con adenoma de hipófisis en Centro Médico de Toluca Metepec Estado de México. México; Revista Mexicana de Neurociencia.
2. Rojas, D. (2017). Management of pituitary tumors. México; Revista Médica Clínica Montes.
3. Escobar, A. (2006). Tumores de Hipófisis. México; Revista Mexicana Neuroci.
4. Núñez, J. y Zúñiga, R.R. (2006). Patogénesis de los adenomas hipofisarios. México; Revista Mexicana de Neurociencia.
5. Michaelis, K.A. , Knox, A.J. , Xu, M. , Kiseljak, V.K. , Geraci, M, Kleinschmidt, D.M. , Lillehei, K.O. y Wierman, M.E. (2011). Identification of Growth Arrest and DNA-Damage-Inducible Gene (GADD45) as a Novel Tumor Suppressor in Pituitary Gonadotrope Tumors. Denver Colorado; Endocrinology Journal.
6. Xing, W. , Zhenyu, Q. , Cheng, H. y Zhang, N. (2019). Genome-wide identification of lncRNAs and mRNAs differentially. China; The Company of Biologists.
7. Gómez, S.M. (2015). Actualización en Neuroendocrinología. España; ELSEVIER.
8. Nishioka, H. y Inoshita, N. (2017). New WHO classification of pituitary adenomas assessment of pituitary transcription factors and the prognostic histological factors. Tokio; Brain Tumor Pathology.
9. Martínez, A.T. (2017). Compartimiento volumetrico de los adenomas hipofisarios no funcionales en pacientes tratados con radiocirugía en plataforma cyberknife. México; SCIELO.
10. Kleine, B, y Winfried G.R. (2016). Hormones and the Endocrine System Textbook of Endocrinology. Munich Alemania; Springer
11. Velez, H.A, William.MR. , Borrero, J,R. y Restrepo, J,M. (2012). Fundamento de Medicina: Endocrinología. Colombia, Medellin; CIB Corporación para Investigaciones Biológicas.
12. Hernández, C,R. , Acosta, G,S. , Nieto, R,R. y Montor, J,M. (2010). Regulación Neuroendocrinológica de la función inmunitaria: el papel de la hipófisis y los esteroides sexuales. México; SCIELO.

13. Dennis, K. , Fauci , A. , Hauser, S. , Longo, D. , Jameson, L. y Loscalzo, J. (2016). Harrison Principios de Medicina Interna. México; MacGRAW-HILL.
14. Scanes, C. (2015). Pituitary Gland. USA; ELSERVIER.
15. Shlomo, M. , Polonsky, K,S. , Larsen,R,P. y Kronenberg,H,M. (2017). Williams Textbook of Endocrinology. Barcelona España; ELSERVIER.
16. Jara, A,A. (2012). Endocrinología. Madrid ; Medica Panamericana.
17. O'Neill, R. y Murphy, R. (2014). Lo esencial en Endocrinología. Barcelona; ELSEVIER.
18. Arun, A,P. , y Weiss, M,H. (2003). Pituitary anatomy and physiology. California USA ; Neurosurgery Clinics Of North America.
19. Larkin, S, y Ansorge, O. (2017). Development and Microscopic Anatomy of the pituitary gland. University of Oxford USA; ENDOTEXT.
20. Balada, F. ,Márquez, C. ,Nadal, R. ,Redolar, D. y Silvestre, J. (2012). Farmacología y Endocrinología del Comportamiento . Barcelona ;UOC.
21. Rizzoti, K.(2015). Genetic regulation of murine pituitary development. London; J Mol Endocrinol.
22. Flores, V.(2015). Embriología Humana Bases moleculares y celulares de la histogénesis, la morfogénesis las alteraciones del desarrollo. Argentina; Médica Panamericana.
23. Costanzo, L.S. (2014). Fisiología. España; ELSERVIER.
24. Cohen, L.A. (2000). Genetic regulation of the Embryology of the Pituitary Gland and Somatotrophs. Boston; Endocrine.
25. Musumeci, G. , Castorina, S. ,Loreto,C. ,Leonardi, R. ,Magro, G. y Castrogiovanni, P. (2015). A journey through the pituitary gland: Development, structure and function, with emphasis on embryo-foetal and later development. Italia; ELSERVIER.
26. Dubois, M. y El-Amraoui, A. (1995). Embryology of the Pituitary Gland. Francia; Elsevier.
27. Jameson, K. , Fauci, A. , Kasper, D. , Hauser, S. , Longo, D. y Harrison, L. (2017). Principios de medicina interna. México : McGRAW-HILL EDUCATION.
28. Dorantes, C,A. , Martínez, C. , y Aguirre A,U. (2016). Endocrinología Clínica de Dorantes y Martínez. México; Manual Moderno.
29. Baehr, M. y Frotscher, M. (2005). Duus´ Topical Diagnosis in Neurology. New York; Thiemi.

30. Rozman, B.C, y V. P Farreras. (2014). Medicina Interna Metabolismo y Nutrición Endocrinología . Barcelona ;ELSERVIER.
31. Dib, L. , San, L.M. , Ducrest,A. , Salamin, N. y Roulin, A. (2017). Selection on the Major Color Gene Melanocortin-1-Receptor Shaped the Evolution of the Melanocortin System Genes. Suiza ; International journal of molecular sciences.
32. Silva, A.A. , Carmo, J.M. , Wang, Z,Q. y Hall, J.E. (2014). The brain melanocortin system, symplathetic control, and obesity hypertension. Mississippi ; Physiology.
33. Chung, T,L. y Khoo, B. (2017). Normal Physiology od ACTH and GH Release in the Hypothalamus and Anterior Pituitary in Man. Cambridge; ENDO.
34. Rashmi, M. , Liu, Y,Y. y Brent, G,A. (2014). Thyroid Hormone Regulation of Metabolism. USA; American Physiological Society.
35. Melmed, S. (2011). Pathogenesis of Pituitary tumor. Los Angeles; Nature Reviews Endocrinology.
36. Ewan,G,A. , Brown,J,C. y LamL,W. (2011). The functional role of long non- coding RNA un human carcinomas. Canada ;BioMed Central Molecular Cancer.
37. Garzon, R. , Calin, A,G. y Croce, M,C.(2009). MicroRNAs in Cancer. USA ; Annual Review of Medicine.
38. Santulli, G. (2015). microRNA: Basic Science From Molecular Biology to Clinical Practice. New York, USA ; Springer.
39. Wickramasinghe, N,S. , Nanavalan, T,T. , Dougherty, M,S. , Riggs, K,A. y Kingle, Y.(2009). Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression un MCF-7 breast cancer cells. USA; Nucleic Acids Research.
40. Ribas, J. , Ni,X. , Castanares,M. , Liu,M,M. , Esopi,D. , Yegnasubramanian,S. , Rodriguez, R. , Mendell,J,T. y Lupold, S,E. (2012). A novel source for mir-21 expression through the alternative polyadenylation of VMP1 gene transcripts.Baltimore, USA; Nucleic Acids Research.
41. Guttman, M. , Donaghey, J. , Carey, W,B. , Garber, M. , Grenier, J,J. , Munson, G , Young, G. , Berstrom, A,I. , Ach, R. , Bruhn, L. , Yang, X. , Amit, I , Meissner, A. , Regev, A. , Rinn, J,L. , Root, D ,E. y Lander, E,S. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. Cambridge ;Nature.
42. Frixia, T. , Donzelli, S. y Blandido. G. (2015). Oncogenic MicroRNAs: Key Player in Malignant Transformation. Italia ;cancers MDPI.
43. Kozomara, A. y Griffiths,S,J. (2014). miRBase: annorating high confidence microRNA´s using deep sequencing data. Manchester ;Nuclic Acids Research.
44. Pábon, M,V. (2011). MicroRNA´s: una visión molecular. Suecia; SCIELO.

45. Dong, W. , Sun, X. , Wei, Y. , Liang, H. , Yuan, M. , Jin, F. , Chen, X. , Liu, Y. , Zhang, C,Y. , Li, L. y Zen, K. (2018). Nuclear miR-122 directly regulates the biogenesis of cell survival oncomiR miR-21 at the posttranscriptional level. Atlanta ;Nucleic Acids Research.
46. Trovero, F,M. y Geisinger, A.(2019). Long Non-Coding RNAs and Their Involvement in Testicular Pathologies . Uruguay ; AnFaMed.
47. Spurlock, F,C. , Crooke, S,P. y Aune, T,M. (2016). Biogenesis and transcriptional regulation of long non-coding RNAs in the human immune system. Nashville, Tennessee ; J Immunol.
48. Bhatia, G. , Sharma, S. , Upadhyay, S,K. y Singh,K. (2019). Long Non-coding RNAs Coordinate Developmental Transitions and Other Key Biological Processes in Grapevine. India ; SCIENTIFIC REPORTS.
49. Sonea, L. , Buse, M. , Gulei, D. , Onaciu, A. , Simon, I. , Braicu, C. y Neagoe, L,B. (2018). Decoding the Emerging Patterns Exhibited in Non-coding RNAs Characteristic of Lung Cancer with Regard to their Clinical Significance. Romania ; Curr Genomics.
50. Ulisky,I. , y Bartel, D,P. (2013). lincRNA´s: Genomics, Evolution, and Mechanisms. USA; Cell.
51. Dhanoa, K,J. , Sethi, R,M. , Verma, R. , Arora, J,S. y Mukhopadhyay, S,K. (2018). Long non-coding RNA: its evolutionary relics and biological implications in mammals: a review. India; J Anim Sci Technol.
52. Tashimi, S. , Fulcher, A,J. , Chang, M,H. , Gov, L. , Wang, S. y Lee, B. (2009). MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. Los Angeles, California ; Blood.
53. Planchon, S,M, , Waite, K,A. y Eng, C. (2007). The nuclear affairs of PTEN. USA ;Journal of Cell Science .
54. Zhou, M., Zhang, Qi. , Zhao, J. , Liao, M. , Wen, S. y Yang, M. (2017). Phosphorylation of Bcl-2 plays an important role in glycochenodeoxycholate-induced survival and chemoresistance in HCC. China; Oncology Reports.
55. Chang, W. , Ho, B,C. , Hsiao, Y,J. , Chen, J,S. , Yeh, C,H. , Chen, H,Y. , Chang, C,G. , Yi S,K. , Liang, S. (2016). JAG1 Is Associated with Poor Survival through Inducing Metastasis in Lung Cancer. Taiwan ; PLoS One.
56. Meng, F. , Henson, R. , Wehbe, J,H. , Ghoshal, K. , Jacob, S. y Patel, T. (2007). MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. Texas, USA ; HHS Public Access.

57. Nakanishi, A. , Kitagishi, Y. , Ogura, Y. y Matsuda, S. (2014). The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review). Japón ; International Journal of Oncology.
58. Chalhoub, N. y Baker, S. (2009). PTEN and the PI3-Kinase Pathway in Cancer. Tennessee; Annu Rev Pathol.
59. Lu, T,X. , Munitz, A. y Rothenberg, M,E. (2014). MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. Cincinnati, USA ; The Journal of Immunology.
60. Chavez, F,R. , Lemus, R,M. y Fortoul van der Goes,T,I. (2017). Thymic regulatory T cells: origins, role and their importance in illness and health. México; SCIELO
61. Sabatel, C. , Malvaux, L. , Bovy, N. , Deroanne, C. , Lambert, V. , Alvarez, G,M. , Colige, A. , Rakic, M. , Noel, A. , Martial, J. , Struman, I. (2011). MicroRNA-21 Exhibits Antiangiogenic Function by Targeting RhoB Expression in Endothelial Cells. Bélgica ; Plos one .
62. Gabriely, G., Wurdinger,T. , Kesari, S. , Esau,C,C. , Linsley, P. , Burchard, J. y Krichevsky, A,M. (2008). MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase Regulators. Boston ;Molecular and Cellular Biology.
63. Yelamanchili, S.V, Chaudhuri, A,D. , Chen, L,N. , Xiong, H. y Fox, S.H.(2010). MicroRNA-21 dysregulates the expression of MEF2C in neurons in monkey and human SIV/HIV neurological disease. USA; Cell Death and Disease.
64. Zuo, Q.F , Cao, L. , Yu, T. , Gong, L. , Zhao, Y.L , Xiao, B. , Zou, Q.M. (2015). MicroRNA-22 inhibits tumor growth and metastasis in gastric cancer by directly targeting MMP14 and Snail. China; npg
65. Xiaoqing, Li., Jun, L. , Zhou, R. , Huang, S. , Huang, S. y Xian, C. (2009).Gene silencing of MIR22 in acute lymphoblastic leukaemia involves histone modifications independent of promoter DNA methylation. China; British Journal of Haematology.
66. Jovicic, A. , Zaldivar, J,F. , Moser,R. , Silva,M,F. y Carter,R,L (2013). MicroRNA-22 (miR-22) Overexpression Is Neuroprotective via General Anti-Apoptotic Effects and May also Target Specific Huntington's Disease-Related Mechanisms. Suiza ; PLoS One.
67. Bar, N., y Dikstein, R. (2010). miR-22 Forms a Regulatory Loop in PTEN/AKT Pathway and Modulates Signaling Kinetics. Brasil ; PLoS One.
68. Yamakuchi, M. , Yagi, S. , Ito, T., y Lowenstein, C.J. (2011).MicroRNA-22 Regulates Hypoxia Signaling in Colon Cancer Cells.New York ;PLoS One.
69. Xu, D. , Takeshita, F. , Hino, Y. , Fukunaga, S. , Tamaki, A. , Matsunaga, J. , Shimamoto, A. (2011).miR-22 represses cancer progression by inducing cellular senescence. China ; J Cell Biol.

70. Wang, J., Li, Y. , Zhang, H. , Xu, X. y Tang, J. (2017). Molecular mechanisms and clinical applications of miR-22 in regulating malignant progression in human cancer. China ; Int J Oncol.

71. Zhang, L., He, X. , Li, F. , Pan, H. , Huang, X. , Wen, X. , Zhang, H. , Li, B. , Ge, S. , Xu, X. , Jia, R. , Fan, X. (2018). MiR-181 family: regulators of myeloid differentiation and acute myeloid leukemia as well as potential therapeutic targets. China; Journal of Experimental & Clinical Cancer Research.

72. Li, W. , Li, H., Zhang, L. , Hu, M. , Li, F. , Deng, J. , An, M. , Wu, S. , Ma, R. , Lu, J., Zhou, Y. (2017). Long non-coding RNA LINC00672 contributes to p53 protein-mediated gene suppression and promotes endometrial cancer chemosensitivity. China; JBC.

## 12 ANEXO

Lista de genes que cumplierón los parámetros estadísticos de acuerdo con lo planteado en el diseño experimental.

#%result_name=ADENOMA VS CONTROL							
#%array_type=HG-U133_Plus_2							
#%annotation=HG-U133_Plus_2.na36.annot.csv							
#%comparison=ADENOMA vs CONTROL							
ID	ADENO MA Avg (log2)	CONTR OL Avg (log2)	Fold Chang e	P-val	FDR P-val	Gene Symbol	Description
237509_at	7.7	4.81	7.42	4.53 E-08	4.72 E-06	LINC01616	long intergenic non-protein coding RNA 1616
238360_s_ at	8.6	5.88	6.57	4.95 E-08	5.05 E-06	LINC00672	long intergenic non-protein coding RNA 672
237675_at	5.79	3.33	5.47	7.85 E-06	0.000 2	LINC01351	long intergenic non-protein coding RNA 1351
1561106_at	6.38	4.75	3.09	2.99 E-06	0.000 1	LINC00271	long intergenic

							non-protein coding RNA 271
232478_at	6.88	5.32	2.94	4.20 E-06	0.0001	MIR181A2 HG	MIR181A2 host gene
227061_at	6.72	5.18	2.91	0.0028	0.0173	LINC01279	coiled-coil domain containing 80; long intergenic non-protein coding RNA 1279
235174_s_at	8.91	7.49	2.66	2.18 E-05	0.0004	LINC01003	long intergenic non-protein coding RNA 1003
238369_s_at	6.25	4.9	2.53	8.29 E-06	0.0002	LINC01607	long intergenic non-protein coding RNA 1607
229323_at	6.98	5.7	2.43	1.09 E-05	0.0003	LINC00959	long intergenic non-protein coding RNA 959
239675_at	5.35	4.29	2.09	6.38 E-07	3.26 E-05	LINC00900	long intergenic non-protein coding RNA 900
217625_x_at	4.49	5.54	-2.07	3.32 E-10	1.11 E-07	LINC00963	long intergenic non-protein coding RNA 963
223522_at	6.71	7.77	-2.09	4.88 E-05	0.0008	MIR600HG	MIR600 host gene; spermatid perinuclear RNA binding protein
215185_at	3.65	4.79	-2.19	8.92	1.40	LINC00963	long

				E-09	E-06		intergenic non-protein coding RNA 963
1561402_at	4.36	5.51	-2.21	1.92 E-06	7.26 E-05	LINC00880	long intergenic non-protein coding RNA 880
227452_at	3.83	5.29	-2.74	5.25 E-05	0.0009	LINC00511 ; LINC00673	long intergenic non-protein coding RNA 511; long intergenic non-protein coding RNA 673
225799_at	5.76	7.25	-2.81	9.09 E-06	0.0002	LINC00152 ; MIR4435-2HG	long intergenic non-protein coding RNA 152; MIR4435-2 host gene
223913_s_at	11.53	13.09	-2.96	7.11 E-07	3.54 E-05	MIR7-3HG	MIR7-3 host gene
229930_at	5.18	6.76	-2.98	6.03 E-08	5.76 E-06	LINC01315	long intergenic non-protein coding RNA 1315
214696_at	7.39	9.02	-3.1	2.77 E-07	1.73 E-05	MIR22HG	MIR22 host gene
230251_at	5.23	7	-3.4	0.0019	0.0129	LINC00473	long intergenic non-protein coding RNA 473
229784_at	5.09	7.09	-4.02	1.16 E-06	5.03 E-05	MIR503HG	MIR503 host gene
1558404_at	2.98	5.12	-4.43	1.70 E-05	0.0004	LINC00622	long intergenic non-protein coding

							RNA 622
236846_at	4.09	6.24	-4.44	0.0028	0.0175	MIR646HG	MIR646 host gene
230577_at	3.32	5.52	-4.6	0.0046	0.0253	LINC00844	long intergenic non-protein coding RNA 844
1553796_at	4.17	6.44	-4.8	4.90E-07	2.68E-05	LINC01105	long intergenic non-protein coding RNA 1105
230781_at	3.94	6.23	-4.86	0.0004	0.0037	LINC01088	long intergenic non-protein coding RNA 1088
227488_at	5.55	8.19	-6.25	1.66E-06	6.53E-05	MIR503; MIR503HG	microRNA 503; MIR503 host gene
224917_at	6.82	9.55	-6.63	2.66E-07	1.68E-05	MIR21; VMP1	microRNA 21; vacuole membrane protein 1
223973_at	7.65	10.39	-6.68	9.69E-08	8.15E-06	MIR7-3HG	MIR7-3 host gene
236902_at	5.42	8.18	-6.74	0.0007	0.0064	LINC00643	long intergenic non-protein coding RNA 643
236739_at	3.12	6.34	-9.31	2.54E-07	1.63E-05	LINC01105	long intergenic non-protein coding RNA 1105
228235_at	5.46	8.68	-9.35	1.17E-06	5.05E-05	MIR503HG	MIR503 host gene
231186_at	6.54	9.77	-9.42	3.39E-05	0.0006	LINC00643	long intergenic non-protein coding RNA 643

1553797_a_at	5.15	8.52	-10.34	1.17 E-06	5.07 E-05	LINC01105	long intergenic non-protein coding RNA 1105
1557133_at	8.14	11.8	-12.63	1.77 E-07	1.26 E-05	LINC00632	long intergenic non-protein coding RNA 632