



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**BÚSQUEDA DE UNA REFERENCIA ENDÓGENA PARA LA  
NORMALIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN de micro-RNAs EN  
SUERO DE PACIENTES CON ASTROCITOMAS INFANTILES**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:  
DIANA DRAGO GARCÍA

ASESOR:  
DRA. RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO

COASESORES:  
DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA  
DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO



M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

**Búsqueda de una referencia endógena para la normalización de la expresión de micro-RNAs en suero de pacientes con astrocitomas infantiles.**

Que presenta la pasante: Diana Drago García

Con número de cuenta: 411071770 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

**ATENTAMENTE**

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 14 de Mayo de 2015.

**PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO**

	NOMBRE	FIRMA
<b>PRESIDENTE</b>	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
<b>VOCAL</b>	Dr. Salvador Fonseca Coronado	
<b>SECRETARIO</b>	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
<b>1er. SUPLENTE</b>	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
<b>2do. SUPLENTE</b>	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

**En memoria del Dr. Diego Julio Arenas Aranda**

## Agradecimientos

A la Dra. Ruth Ruiz Esparza Garrido

Agradezco que haya tenido la paciencia de instruirme y que haya hecho todo lo posible por presentar un trabajo de calidad. Gracias por el apoyo que me brindaste durante todos estos meses.

Al Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores

Agradezco que me haya incluido en múltiples actividades que me ayudaron a desarrollarme como futura investigadora, así mismo gracias por haberme ayudado cuando los experimentos se complicaron.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Agradezco al Dr. Arenas todo el apoyo que me brindo durante el tiempo que lo conocí. Por tener fe en mis capacidades y nunca dudar en que podría cumplir todas mis metas, aun cuando yo había perdido la confianza en mí misma. Y por todas las oportunidades que nos facilito a mí y a mis compañeros de laboratorio de crecer y de desarrollar habilidades que siempre nos serán útiles.

A mi familia

Agradezco a mi familia por todo el apoyo que recibí de ellos, y aunque pasamos por momentos difíciles siempre pudimos salir a flote juntos. Porque sin el apoyo emocional y económico que me brindaron no hubiera podido completar todo este trabajo.

A la UNAM

Agradezco a la UNAM por permitirme formar parte de una de las mejores universidades del mundo, por las oportunidades que me brindo tanto en el país como en el extranjero. Y por todas las habilidades y capacidades que me fueron inculcadas por queridos y excelentes profesores que forman parte de esta máxima casa de estudios.



El presente trabajo se llevo a cabo en el laboratorio de Genómica Funcional y Proteómica en la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana de la Unidad de Alta Especialidad Hospital de Pediatría "Dr. Silvestre Frenk Freund" en el Centro Médico Nacional Siglo XXI, bajo la dirección de la Dra. Ruth Ruiz Esparza Garrido y la co-asesoría del Dr. Diego Julio Arenas Aranda<sup>†</sup>.

El trabajo experimental se realizó en instalaciones y gracias al apoyo económico del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS).

## ÍNDICE

1. Introducción.....	1
1.1. Clasificación de los astrocitomas .....	3
1.1.1. Clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la OMS .....	3
1.1.2. Sistema de grados .....	5
1.1.3. Código de morfología de la Clasificación Internacional de las enfermedades para la oncología .....	8
1. 2. Tumores astrocíticos .....	12
1. 2. 1. Astrocitoma pilocítico.....	12
1. 2. 2. Astrocitoma pilomixoide .....	13
1. 2. 3. Xantoastrocitoma pleomórfico.....	15
1. 2. 4. Astrocitoma difuso .....	16
1. 2. 5. Astrocitoma fibrilar .....	17
1. 2. 6. Astrocitoma gemistocítico.....	18
1. 2. 7. Astrocitoma protoplasmático .....	19
1. 2. 8. Astrocitoma anaplásico .....	20
1. 2. 9. Glioblastoma .....	21
1. 2. 10. Gliomatosis cerebri .....	24
1. 3. Micro-RNAs.....	25
1. 3. 1. Definición.....	25
1. 3. 2. Biogénesis.....	26
1. 3. 3. MicroRNAs circulantes.....	37
1. 4. Métodos de estandarización .....	39
1. 4. 1. Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	42
1. 4. 2. Normalización por volumen y $\Delta Ct$ .....	44
1. 4. 3. NormFinder .....	47
1. 4. 4. GeNorm .....	50

1. 4. 5. BestKeeper.....	52
1. 4. 6. Delta Ct comparativa .....	53
2. Hipótesis .....	62
3. Objetivos .....	63
3. 1. Objetivo general.....	63
3. 2. Objetivos particulares .....	63
4. Metodología .....	64
4. 1. Población de estudio .....	64
4. 2. Obtención del suero .....	65
4. 3. Genes candidatos .....	65
4. 4. Preparación de la muestra .....	66
4. 5. Purificación de RNA.....	66
4. 6. Transcripción reversa.....	67
4. 7. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR) ..	67
4. 8. Análisis y manejo de datos .....	68
5. Resultados.....	71
5. 1. Purificación de RNA.....	71
5. 2. Transcripción reversa.....	71
5. 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR) ..	72
5. 4. Análisis y manejo de datos .....	76
5. 4. 1. NormFinder .....	79
5. 4. 2. GeNorm .....	81
5. 4. 3. Análisis delta comparativa ( $\Delta$ Ct).....	82
5. 4. 4. Validación .....	87
5. 4. 4. 1. Normalización $2^{-\Delta\Delta Ct}$ .....	87
5. 4. 4. 2. Normalización por volumen y $\Delta$ Ct .....	90
6. Discusión.....	97
7. Conclusiones.....	104

8. Perspectivas.....	106
9. Bibliografía .....	107

## 1. Introducción

El sistema nervioso se encarga de controlar los estímulos internos y externos a los que se expone el organismo; este control se debe principalmente a su increíble habilidad para comunicarse. Dentro de los elementos de comunicación del sistema nervioso se encuentran las células nerviosas, como son las neuronas y las células gliales [1].

Los astrocitos forman parte de las células gliales del sistema nervioso central y componen, por lo menos, la mitad del volumen tisular cerebral [2]. Sin embargo, aun teniendo conocimiento de la proporción de células gliales en comparación con la cantidad de células nerviosas, solo se les atribuían funciones pasivas como proveer soporte estructural, metabólico y funcional a las neuronas [3].

Además de proveer el andamiaje necesario para la distribución celular, los astrocitos regulan la homeostasis iónica y la interacción neuronal, además de generar varias señales regulatorias [4]. Los astrocitos normalmente poseen una estructura compleja altamente ramificada con pequeños procesos que entran en contacto con la hendidura sináptica [5].

Los astrocitomas son un grupo de tumores heterogéneos que surgen a partir de los astrocitos. Estos contribuyen con cerca del 42.3% de los tumores cerebrales en edades pediátricas [6]. Cuando la fisiología normal de los astrocitos se ve afectada por la presencia de una neoplasia se observan alteraciones en las funciones motoras y cognitivas del paciente, provocando la muerte en la mayoría de los casos. De ahí la importancia de su estudio y caracterización.

## 1.1. Clasificación de los astrocitomas

Se le llama cáncer al conjunto de enfermedades de origen multifactorial en las que se presenta un crecimiento descontrolado de células. La gran diversidad de neoplasias que se pueden generar, hace necesario establecer un sistema de clasificación preciso. Por ejemplo, los astrocitomas, se clasifican dentro de los tumores del sistema nervioso central.

### 1.1.1. Clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la OMS

La clasificación internacional de los tumores humanos publicada por la Organización Mundial de la Salud (OMS) fue creada con el objetivo de **'establecer una clasificación por grados de los tumores humanos que sea aceptada y utilizada de manera internacional'** [7]. Esta clasificación marca un estándar que permite definir los criterios diagnósticos e histológicos propios de los distintos tipos de tumores. Adicionalmente, se incluyen datos acerca de la epidemiología, imagenología, signos y síntomas, y factores pronósticos y predictivos.

Esta clasificación tuvo su inicio en 1956 como una propuesta por parte de la comisión ejecutiva de la OMS y de la Asamblea Mundial de la Salud en 1957. Sin embargo, no fue hasta 1979 que se publicó la primera

edición de la 'tipificación histológica de los tumores del sistema nervioso' [8]. Tanto la segunda [9] como la tercera edición [10] de la clasificación fueron complementadas con información adicional que fue posible obtener gracias a nuevos avances aplicados a la patología diagnóstica, como fue el uso de la inmunohistoquímica y la obtención de perfiles genéticos [7].

La 'Clasificación de los Tumores del Sistema Nervioso Central de la OMS 2007' [11] es la ahora vigente cuarta edición de esta clasificación. Para su creación fue necesaria la participación de 50 colaboradores junto con un grupo de 25 patólogos y genetistas que fueron convocados durante el año 2006 en el Centro Alemán de Investigación en Cáncer (German Cancer Research Center) en Heidelberg.

En el presente trabajo se utilizó la última edición de la clasificación de los tumores del sistema nervioso de la OMS [11] (Fig. 1), y será la clasificación a la que se hará referencia de este punto en adelante, siempre y cuando no se indique lo contrario.

### 1.1.2. Sistema de grados

Pese a las modificaciones por las que ha pasado la clasificación de los tumores del sistema nervioso de la OMS a lo largo de los años, desde su primera edición se ha conservado un sistema de clasificación por grados.

Más que un sistema histológico estricto este sistema es una 'escala de malignidad' aplicable a una gran variedad de neoplasias (Tabla No. 1) [8, 9, 12].

Tabla No. 1. Clasificación en grados de las distintas entidades tumorales [11].

<b>Grado</b>	<b>Descripción</b>
I	Bajo potencial proliferativo, buen pronóstico por medio de resección quirúrgica
II	Infiltrados, baja actividad proliferativa, la reincidencia es común
III	Evidencia histológica de malignidad, alta actividad proliferativa, pacientes reciben terapia adyuvante con quimioterapia y/o radioterapia
IV	Neoplasias citológicamente malignas, altamente infiltrativas, mitóticamente activas, con necrosis, evolución rápida y de desarrollo fatal

En cuanto a los astrocitomas, su clasificación se complica debido a que muchos de estos se tratan de tumores difusamente infiltrados. Históricamente, se han desarrollado distintas agrupaciones de los astrocitomas de acuerdo a una escala de malignidad. Entre estos se

encuentra el sistema de Ringertz [13], St. Anne-Mayo (o de Dumas-Duport) [14], y los esquemas previos de la OMS (Tabla No. 2).

Tabla No. 2. Comparación de los sistemas para la clasificación de los astrocitomas (CA= número de criterios acumulados propios de cada grado, Criterios Histológicos: criterios histológicos frecuentemente presentes en cada grado) [13, 14, 11].

St. Anne-Mayo			Ringertz		OMS 2007		
Grado	CA	Criterios histológicos	Grado	Criterios histológicos	Grado	CA	Criterios Histológicos
1	0	▶ Ninguno			I	1	▶ Atipia citológica
2	1	▶ Atipia nuclear	1	▶ Atipia nuclear moderada ▶ Celularidad moderada ▶ Figuras mitóticas anormales	II	2	▶ Infiltración ▶ Atipia citológica
3	2	▶ Atipia nuclear ▶ Actividad mitótica	2	▶ Mayor celularidad ▶ Mayor atipia nuclear ▶ Proliferación endotelial	III	3	▶ Infiltración ▶ Atipia citológica ▶ Anaplasia ▶ Actividad mitótica
4	3-4	▶ Atipia nuclear ▶ Actividad mitótica ▶ Proliferación endotelial ▶ Necrosis	3	▶ Presencia de necrosis geográfica, ▶ Presencia de células pseudopalisadas	IV	4	▶ Infiltración ▶ Atipia citológica ▶ Anaplasia ▶ Actividad mitótica ▶ Proliferación endotelial ▶ Necrosis

En estos sistemas los grados se distinguen entre ellos debido a la presencia o acumulación de criterios histopatológicos que presentan los astrocitomas, estos criterios se encuentran definidos en la Tabla No. 3.

Tabla No. 3. Definición de criterios histopatológicos.

Característica	Definición
Atipia nuclear	Variación en el tamaño o forma nuclear acompañado de hiperchromasia <sup>1</sup>
Actividad Mitótica	Mitosis inequívocas, sin importar su número o morfología <sup>2</sup>
Alta actividad proliferativa	Determinación mediante índices de marcaje con MIB-1 <sup>3</sup>
Proliferación endotelial	Se trata de un incremento en las células vasculares endoteliales que contribuye a la angiogénesis en la formación tumoral <sup>4</sup>
Necrosis	Se produce cuando las células son expuestas a un estímulo lo suficientemente fuerte como para provocar la muerte celular de manera accidental <sup>5</sup>

<sup>1</sup> Coloración intensa del núcleo debida a abundancia de material genético. Se utiliza como uno de los criterios principales para determinar malignidad. Su presencia se ha observado en carcinomas *in situ*, cáncer invasivo y en cáncer en estadios avanzados [101, 102, 103].

<sup>2</sup> Solo se considera de manera cualitativa debido a que existe una gran variación en la valoración de la actividad mitótica dependiendo del tipo y tiempo de la fijación además de otros factores técnicos [105, 106]. Se hace referencia a la técnica como tediosa, de difícil reproducibilidad; así como dependiente de la diligencia y entrenamiento del microscopista [107].

<sup>3</sup>MIB-1 es un anticuerpo que reconoce al antígeno Ki-67, necesario para mantener una actividad proliferativa. Por esta razón se utiliza como un marcador inmunohistoquímico para determinar la actividad proliferativa celular y el potencial de crecimiento de una neoplasia [104]. En el caso de los astrocitomas este se correlaciona además con el grado de la neoplasia, con la actividad mitótica, y con la probabilidad de supervivencia (relación inversamente proporcional).

<sup>4</sup> El incremento de las células vasculares puede promover la formación de nuevos vasos sanguíneos, o el crecimiento de vasos pre-existentes; esto se distingue por ser una característica propia de las neoplasias de alto riesgo [109].

<sup>5</sup> También se caracteriza por generar una respuesta inflamatoria [110].

De manera alternativa, de acuerdo a los criterios histológicos y patológicos que caracterizan a los distintos tipos de astrocitomas, estos pueden ser clasificados de manera general como astrocitomas de bajo grado (lgAst) (grado 1-2 de la clasificación de la OMS 2007 y equivalentes), y astrocitomas de alto grado (hgAst) (grado 3-4 de la clasificación de la OMS 2007 y grados equivalentes en otras clasificaciones).

#### 1.1.3. Código de morfología de la Clasificación Internacional de las enfermedades para la oncología

La clasificación Internacional de las enfermedades para la oncología (International Classification of Diseases for Oncology, ICD-O) establece una clasificación compuesta que incluye: sitio de la neoplasia, criterios morfológicos, comportamiento y diferenciación. Estos componentes establecen códigos, que junto con la caracterización genética, aseguran la disponibilidad de la información relevante para los estudios oncológicos y epidemiológicos.

El código morfológico se compone por tres secciones; el código histológico, el código de comportamiento, y el grado. El código histológico consta de 4 dígitos los cuales hacen referencia al origen

morfológico de la neoplasia<sup>6</sup>. El código de comportamiento indica con un solo dígito el comportamiento patológico de la neoplasia, y se coloca después del código histológico siguiendo una diagonal (Tabla No. 4). El código de grado se trata de un solo dígito el cual es provisto de manera independiente para la clasificación histológica de las neoplasias de acuerdo a su grado, diferenciación o fenotipo.

Tabla No. 4. Código de comportamiento y ejemplos del código morfológico<sup>7</sup>.

Código de comportamiento		Código morfológico	
/0	Benigno	8000	no especificados
/1	Incierto si es benigno o maligno, en el límite de la malignidad, bajo potencial maligno, potencial maligno desconocido	8140-8389	Adenomas y adenocarcinomas
		8720-8799	Melanomas
/2	Carcinoma <i>in situ</i> , Intraepitelial, no infiltrativo, no invasivo	8800-8999	Sarcomas
		9060-9099	Células germinales
/3	Maligno, sitio primario	9380-9489	Gliomas
/6 <sup>8</sup>	Maligno de sitio metastásico, maligno de sitio secundario	9590-9729	Linfomas
		9800-9949	Leucemias
/9 <sup>§</sup>	Maligno, sin definir si se trata de un sitio primario o metastásico		

<sup>6</sup> El código morfológico fue incorporado a la Nomenclatura Sistematizada de la Medicina (Systematized Nomenclature of Medicine (SNOMED)).

<sup>7</sup> Para obtener la lista completa de los códigos morfológicos y topográficos revisar la tercera edición de la ICD-O publicada por la OMS [17].

<sup>8</sup> Este código no se utiliza en los registros médicos.

Además del código histológico la ICD-O ha establecido un código topográfico, es decir, del sitio de localización de la neoplasia (Tabla No. 4). El código de sitio/topográfico de la neoplasia se basa en una sección del ICD-10<sup>9</sup> y se ha mantenido así desde la segunda edición. En cambio el código morfológico ha sufrido varias modificaciones a lo largo del tiempo [15, 16], hasta su tercera (ICD-O-3) y actual edición publicada en el 2008 [17]. Para algunas entidades tumorales recientemente caracterizadas, se han propuesto códigos ICD-O provisionales (Fig. No. 1) que se espera sean incluidos en la cuarta edición de esta clasificación.

---

<sup>9</sup> La Clasificación Internacional de las Enfermedades (International Classification of Diseases ICD) puede ser descargada en su más reciente versión: la ICD-10 directamente de los servidores de la OMS, u obtener acceso electrónico desde su aplicación en línea [108].

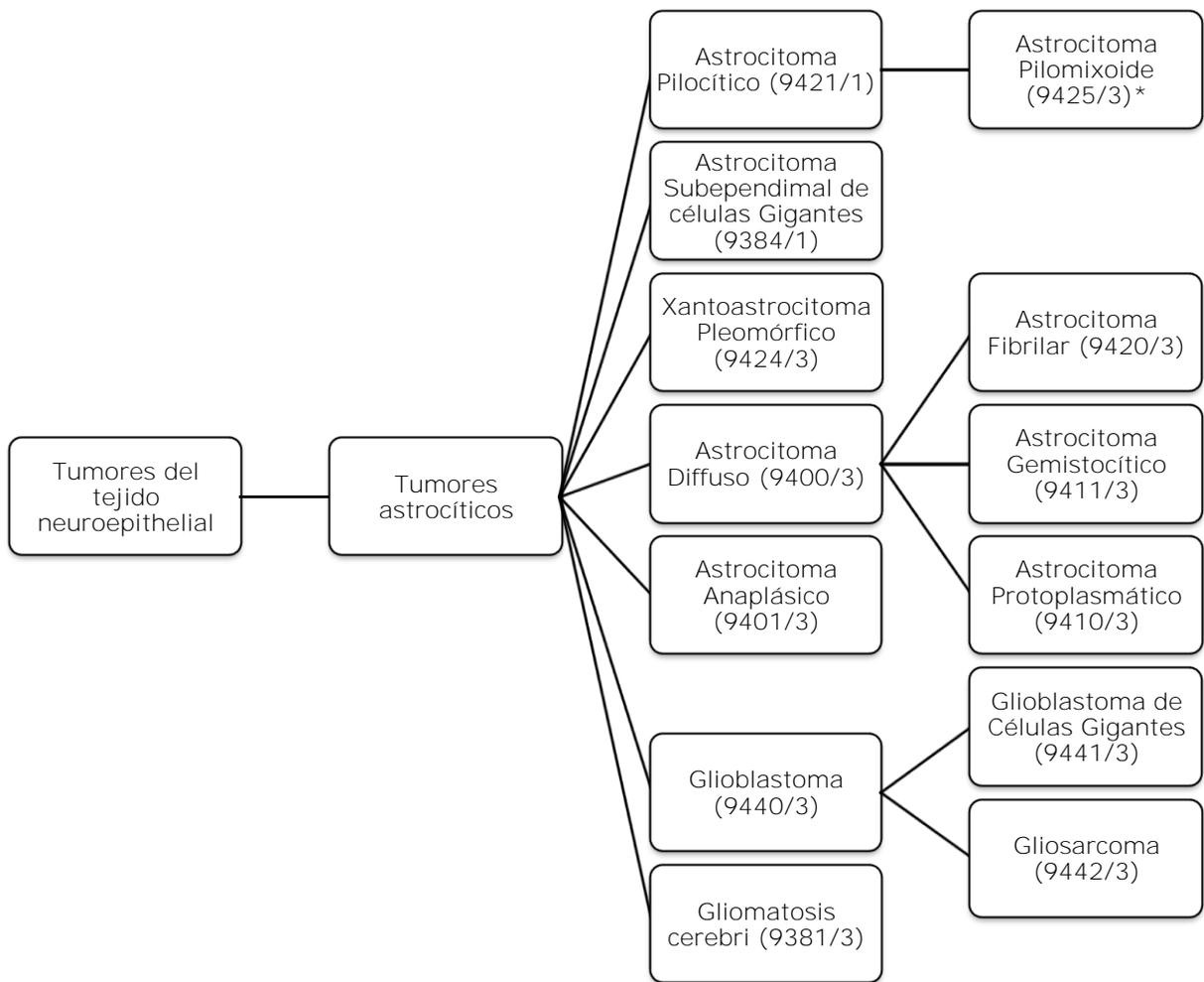


Figura 1. Distintos tipos de tumores astrocíticos, de acuerdo a la clasificación de los tumores del sistema nervioso central de la OMS 2007, con sus respectivos códigos ICD-O-3 (\*Código ICD-O provisional).

## 1. 2. Tumores astrocíticos

Los tumores astrocíticos se presentan en diversas variantes:

### 1. 2. 1. Astrocitoma pilocítico

Neoplasia relativamente circunscrita de grado I de acuerdo a la OMS, caracterizada por crecimiento lento. Comprenden del 5-6% de todos los gliomas. Se desarrolla principalmente en niños y adultos jóvenes (dos primeras décadas de vida). Entre los signos y síntomas característicos se encuentran la macrocefalia, convulsiones, endocrinopatía e incremento de la presión craneal.

Histológicamente se caracteriza por un patrón bifásico de células multipolares con presencia de fibras de Rosenthal<sup>10</sup> y quistes hialinos. Células inmunopositivas para la proteína acida fibrilar glial (GFAP)<sup>11</sup>. La recesión tumoral es común por lo que se consideran como neoplasias de buen pronóstico [18].

---

<sup>10</sup> Las fibras de Rosenthal son inclusiones intracelulares de los astrocitos fibrilares, estas se relacionan con la sobre-expresión de GFAP en algunas patologías como los los astrictomas pilocíticos y la enfermedad de Alexander [111, 112].

<sup>11</sup> La presencia de GFAP es característica de los astrocitos fibrilares [41]. La disminución de los niveles de GFAP se relacionan con un aumento de la malignidad de la neoplasia, estos disminuyen con la des-diferenciación, mitosis y células anormales [40].

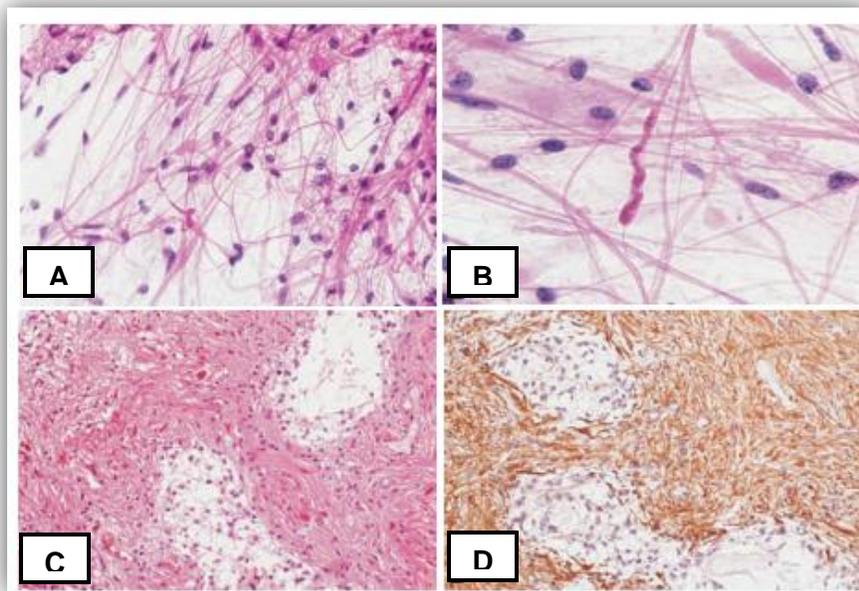


Figura 2. Preparaciones de astrocitoma pilocítico mostrando (A) células tumorales bipolares largas, (B) una fibra de Rosenthal. (C, D) patrón bifásico característico, compuesto de: una región compacta reactiva a GFAP, y áreas hipocelulares con microquistes sin expresión de GFAP (tomado de [18]).

### 1. 2. 2. Astrocitoma pilomixóide

Astrocitoma de grado II de acuerdo a la OMS, relacionada íntimamente con el astrocitoma pilocítico, se caracteriza por una disposición angiocéntrica de las células tumorales. Su aparición no es común, y principalmente se presenta durante los primeros meses de vida. Los signos y síntomas se relacionan directamente con el sitio de localización del crecimiento tumoral; entre los sitios más comunes se encuentra la

región hipotalámica, tálamo, cerebelo, lóbulo temporal y espina vertebral. Histológicamente se caracteriza por la presencia de una matriz mucosa, células bipolares que se alinean a lo largo del eje de los vasos sanguíneos y típicamente por la ausencia de las fibras de Rosenthal. Presenta reactividad fuerte y difusa por GFAP. Esta neoplasia se considera más agresiva que el astrocitoma pilocítico debido a su tendencia a la infiltración [19].

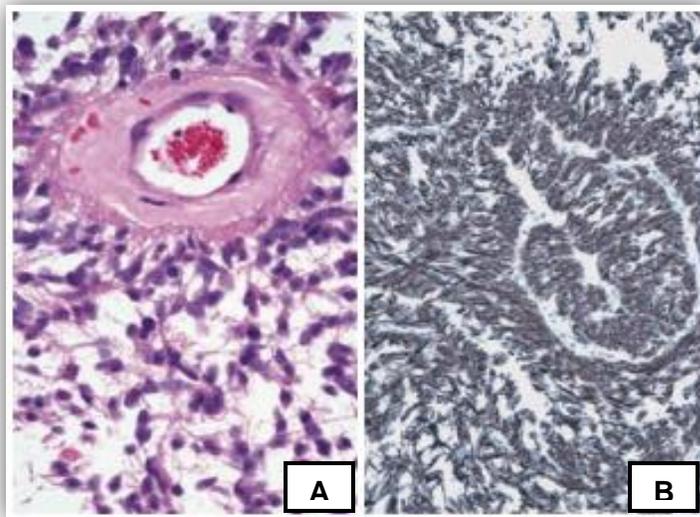


Figura 3. Astrocitoma pilomixoide, (A) arreglo angiocéntrico característico. (B) reactividad por GFAP fuerte y difusa (modificado de [19]).

### 1. 2. 3. Xantoastrocitoma pleomórfico

Astrocitoma de grado II de acuerdo a la OMS que se caracteriza por la presencia de células Xantomatosas. Representa menos del 1% de los tumores astrocíticos, se desarrolla principalmente en niños y adultos jóvenes. Entre los signos y síntomas característicos se encuentra un largo historial de ataques convulsivos. Histológicamente esta neoplasia se caracteriza por 3 elementos; una red de reticulina envolvente, la presencia de células xantomatosas, y la naturaleza pleomórfica de las células. En la neoplasia se pueden distinguir elementos con forma de huso intercalados entre células astrocíticas gigantes mono o multinucleadas con variaciones en el tamaño y forma del núcleo.

Las células xantomatosas son células de gran tamaño con acumulación de inclusiones lipídicas que comúnmente ocupan gran parte del interior celular. Aun con su naturaleza pleomórfica, la neoplasia mantiene la inmunoreactividad por GFAP. Se le considera como una neoplasia de relativamente buen pronóstico [20].

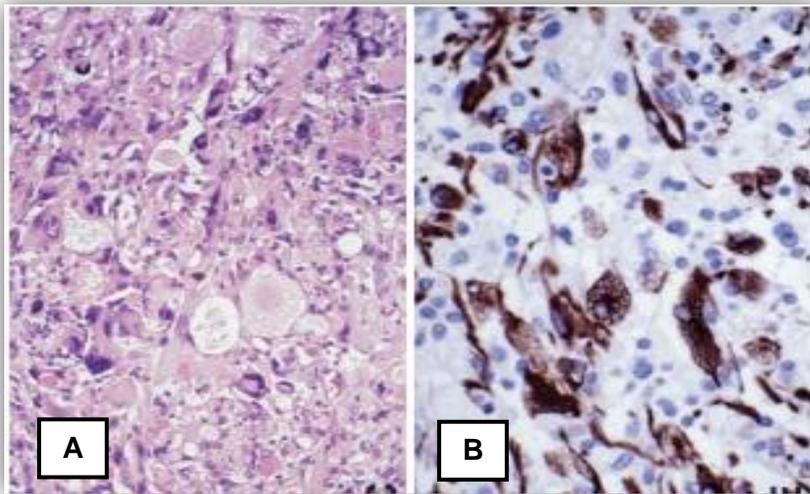


Figura 4. (A) Células tumorales con pleomorfismo nuclear y citoplasmático, células xantomatosas. (B) expresión de GFAP en células grandes, pleomórficas y xantomatosas (modificado de [20]).

#### 1. 2. 4. Astrocitoma difuso

Astrocitoma difusamente infiltrado de grado II de acuerdo a la OMS que se caracteriza por un alto grado de diferenciación celular. Existen tres variantes histológicas: el astrocitoma fibrilar, el astrocitoma gemistocítico y el astrocitoma protoplasmático. Estos representan del 10-15% de los tumores astrocíticos, y se presentan principalmente en adultos jóvenes (30-40 años) con un aumento reciente en su incidencia en niños [21, 22]. Los signos y síntomas comunes incluyen ataques convulsivos, y cambios en la sensación, visión y dificultades motoras.

Histológicamente se caracteriza por la presencia de astrocitos fibrilares o gemistocíticos neoplásicos en una matriz tumoral con una celularidad mayor que en el tejido normal. La atipia nuclear es común, y la actividad mitótica no es frecuente. Esta neoplasia se considera más agresiva que el astrocitoma pilocítico debido a su tendencia a la infiltración [23].

#### 1. 2. 5. Astrocitoma fibrilar

se compone de astrocitos neoplásicos fibrilares que se caracterizan por tener un citoplasma escaso, contenidos en una matriz pobremente estructurada (comúnmente con formación de microquistes). La presencia de atípia nuclear (núcleos engrandecidos, con forma de **'cigarro' o irregulares e hipercromáticos) únicamente** es un criterio diagnóstico, así como una celularidad de baja a moderada (actividad mitótica ausente). Puede contener regiones con células gemistocíticas neoplásicas. Presenta una expresión de GFAP constante, sin embargo no necesariamente por todas las células. Se trata de la variante histológica más común [24].

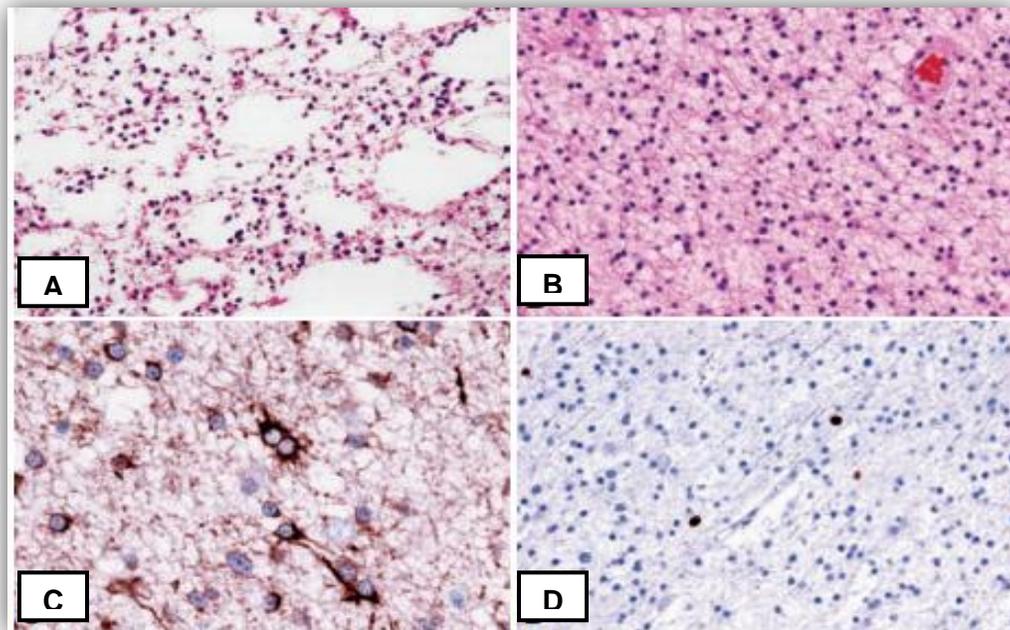


Figura 5. Astrocitoma Fibrilar, (A) extensa formación de microquistes. (B) tumor con celularidad moderada formado por astrocitos fibrilares con un estroma microquístico. (C) citoplasma y procesos mostrando inmunoreactividad a GFAP. (D) índice de marcaje con MIB-1 bajo (tomado de [24]).

#### 1. 2. 6. Astrocitoma gemistocítico

Se caracteriza por la presencia de una fracción mayor al 20% de astrocitos gemistocíticos neoplásicos del total de células tumorales (comúnmente se trata del 35% de las mismas) [25]. Histológicamente los gemistocitos son cuerpos eosinofílicos cristalinos con forma angular y núcleos excéntricos. La expresión de GFAP solo se presenta en los

perímetros y en los procesos celulares. Esta variante histológica parece ser particularmente propensa a progresar hacia un astrocitoma anaplásico y glioblastoma [26].

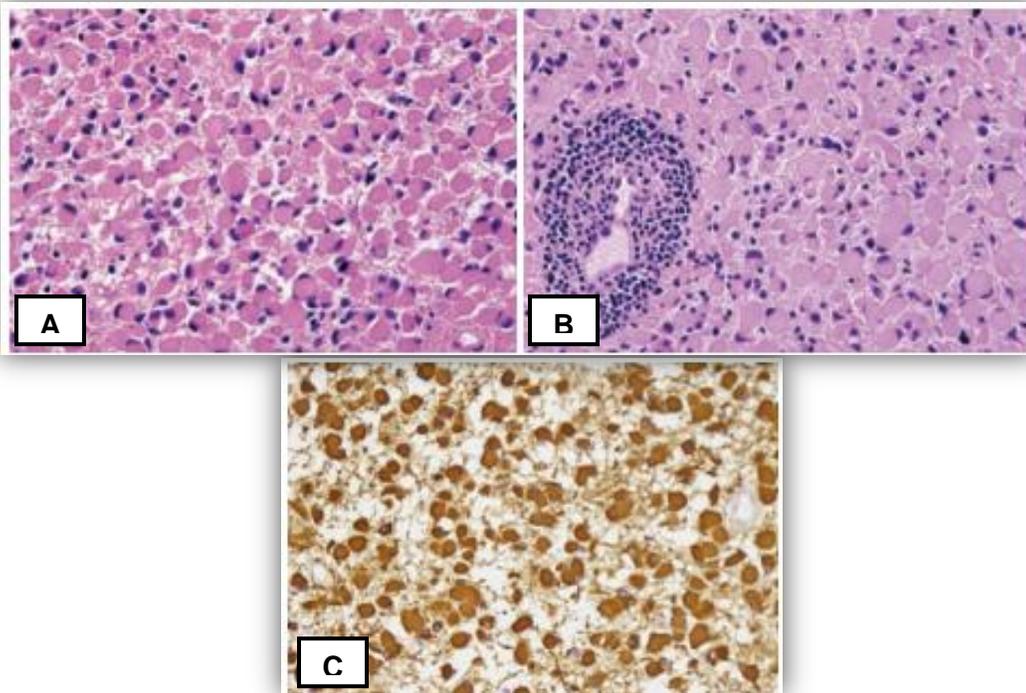


Figura 6. Astrocitoma gemistocítico, (A) células con citoplasma extenso y eosinofílico y con los núcleos en la periferia. (B) la infiltración perivascular de linfocitos es característica. (C) expresión fuerte y consistente de GFAP (tomado de [26]).

#### 1. 2. 7. Astrocitoma protoplasmático

Astroцитos neoplásicos de cuerpo pequeño con procesos flácidos escasos y núcleos con forma de circular a oval. La neoplasia se caracteriza por una celularidad baja y actividad mitótica ausente; de igual manera la

degeneración mucoide y formación de micro-quistes son comunes. La expresión de GFAP es escasa. Esta es la variante menos común [27].

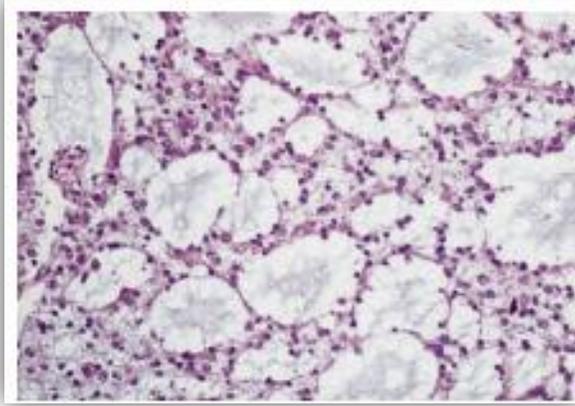


Figura 7. Astrocitoma protoplasmático, se muestra una extensa degeneración mucoide (tomado de [19]).

#### 1. 2. 8. Astrocitoma anaplásico

Neoplasia difusamente infiltrativa de grado III de acuerdo a la OMS, caracterizada por la atipia nuclear, incremento en la celularidad y actividad proliferativa. Se desarrolla principalmente en adultos (aproximadamente 45 años) con una preferencia por desarrollarse en los hemisferios cerebrales. Entre los signos y síntomas característicos se encuentran los defectos neurológicos, convulsiones y signos de presión intracraneal junto con el desarrollo previo de un astrocitoma de grado II; aunque también pueden formarse *de novo*. Histológicamente se

caracteriza por la hiper celularidad regional o difusa y la actividad proliferativa (inmunopositivo a Ki67/MIB-1). Los signos de anaplasia incluyen las variaciones en el número, tamaño, forma y distribución de la cromatina del núcleo. El pronóstico no es favorable debido a la tendencia a progresar a glioblastoma [28].

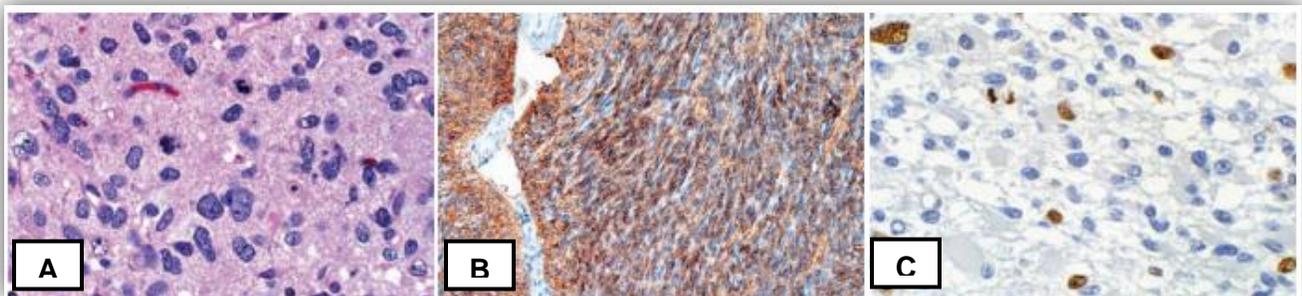


Figura 8. Astrocitoma anaplásico, (A) hiper celularidad y células hiper cromáticas con nucleos irregulares en un fondo fibrilar. (B) Inmunoreactividad a GFAP. (C) Inmunoreactividad al marcador MIB-1, incluyendo células en mitosis (tomado de [28]).

#### 1. 2. 9. Glioblastoma

Astrocitoma de grado IV de acuerdo a la OMS, caracterizado por un crecimiento altamente invasivo. Es el tumor cerebral primario más frecuente y el astrocitoma con mayor malignidad. Se localiza principalmente en la materia blanca subcortical de los hemisferios cerebrales y se manifiesta principalmente en adultos; aunque su

desarrollo es posible a cualquier edad. Entre los signos y síntomas característicos se encuentran el dolor de cabeza, náusea y vómito; provocados por el incremento de la presión intracraneal.

Cuando un glioblastoma se origina *de novo* (a partir de una lesión cortical leve no cancerosa) se le conoce como glioblastoma primario, cuando este se produce a partir de la progresión de un astrocitoma previo se conoce como glioblastoma secundario; este último se caracteriza por tener un mejor pronóstico y presentarse en pacientes más jóvenes.

Histológicamente se trata de tumores anaplásticos, pleomórficos, compuestos de células gliales pobremente diferenciadas con atípicidad nuclear marcada, y actividad mitótica elevada; además de presentar los criterios diagnósticos de proliferación microvascular (los glioblastomas se encuentran entre los tumores humanos más vascularizados) y/o necrosis (siguiendo un patrón característico serpenteante de células pseudopalisadas). Su composición celular es variada y puede contener una mezcla de células gigantes multinucleadas, gemistocitos, astrocitos fibrilares, células granulares, células lipidizadas, y linfocitos perivasculares [29].

Existen algunas variantes histológicas tales como el glioblastoma de células gigantes, y el gliosarcoma.

Debido a que su remoción completa es imposible aún con el tratamiento de radio/quimioterapia la mayoría de los pacientes no sobreviven más de un año [29].

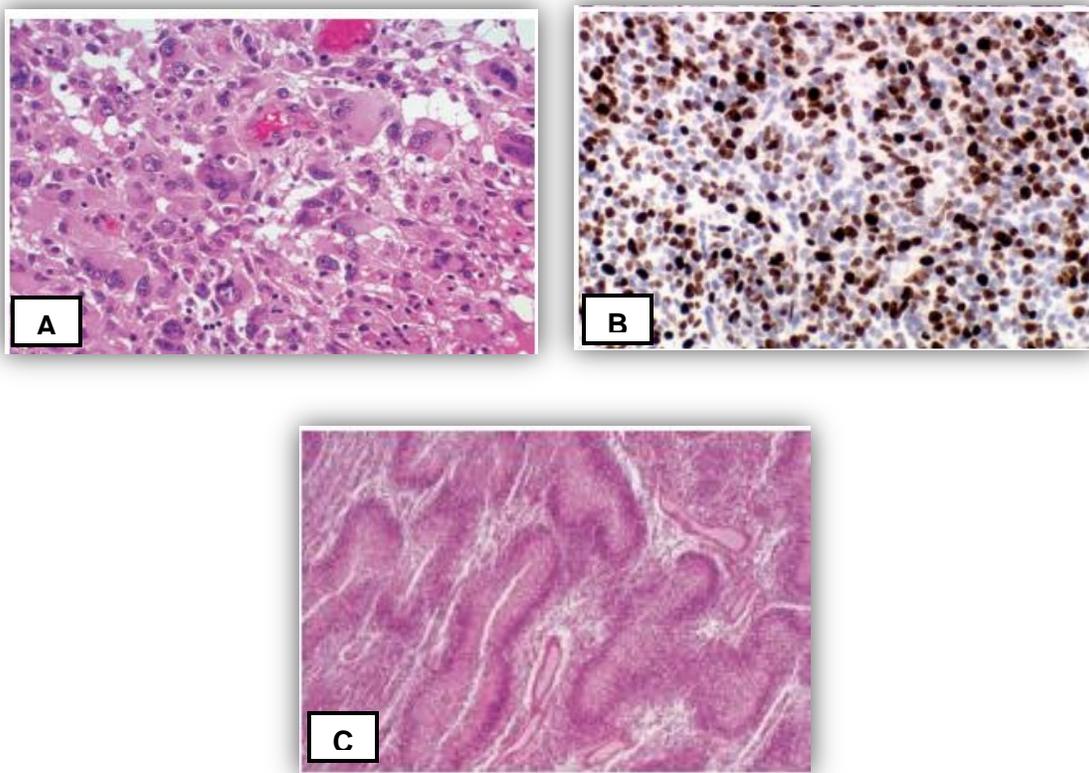


Figura 9. Glioblastoma, (A) Alto grado de anaplasia. (B) índice de marcaje con MIB-1 elevado. (C) Necrosis serpenteante (modificado de [29] ).

## 1. 2. 10. Gliomatosis cerebri

Glioma difuso generalmente astrocítico III de acuerdo a la OMS, caracterizado por una infiltración extensa. Se desarrolla principalmente en adultos (45-50 años). Entre los signos y síntomas característicos se encuentran la demencia y letargo, ataques convulsivos, dolor de cabeza, déficits espinocerebelares, problemas con la visión y síntomas causados por la presión intracraneal elevada. Histológicamente se caracteriza por la extensa infiltración que involucra al menos tres lóbulos cerebrales. Células con inmunoreactividad variable hacia (GFAP). Como en la mayoría de los astrocitomas el pronóstico es más favorable entre menor sea la edad del paciente [30].

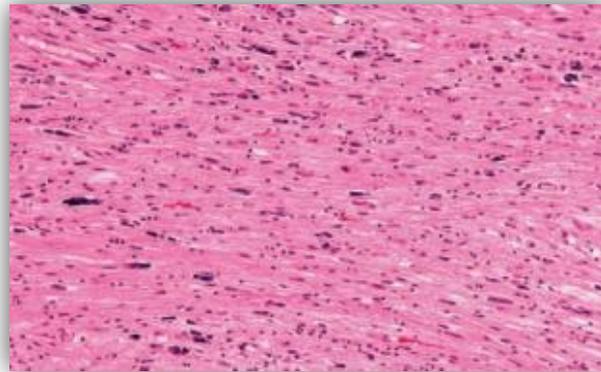


Figura 10. Gliomatosis cerebri, infiltración de células alargadas (tomado de [30]).

## 1. 3. Micro-RNAs

### 1. 3. 1. Definición

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs no codificantes endógenos cortos (19-25 nucleótidos 'nt') de cadena sencilla) [31] Estos regulan la expresión de genes codificantes para proteínas por medio de mecanismos de complementariedad [32]. Además se les ha relacionado como indicadores del desarrollo de diversas patologías [33]. La sección de la secuencia del miRNA que es responsable de su unión al sitio blanco se conoce como 'región semilla', en mamíferos esta unión se lleva a cabo generalmente con una complementariedad parcial. El acoplamiento de esta región de 2 a 8 nt del miRNA con el RNA mensajero (mRNA) resulta en el silenciamiento traduccional [34].

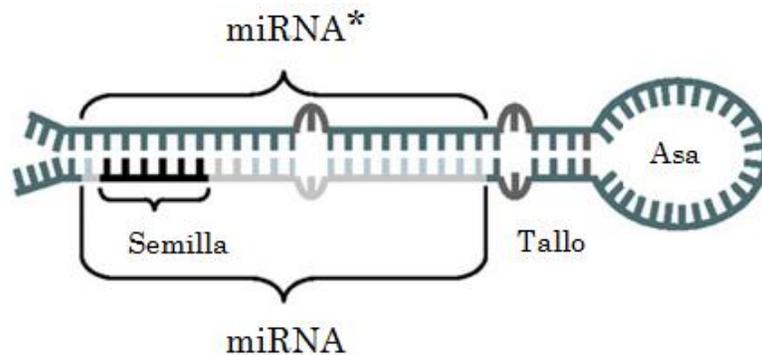


Figura 11. Estructura de pre-miRNA/miRNA. Se puede observar la estructura tallo-asa, en la cual se encuentran las cadenas del miRNA

(color gris) y miRNA\*. La región semilla del miRNA se muestra en color negro (modificado de [35]).

### 1. 3. 2. Biogénesis

La mayoría de los genes que transcriben a los miRNAs se localizan en regiones intergénicas, o son transcritos con una orientación anti-sentido con respecto a genes cuya expresión se ha relacionado con una función biológica (genes anotados) [36, 37, 38]. Estas características parecen indicar que los miRNAs se forman a partir de unidades de transcripción independientes cuya transcripción se realiza por medio de la polimerasa II (pol II)<sup>12</sup>.

En algunos de los genes de miRNAs se han encontrado secuencias cortas (~600 pares de bases 'pb') que funcionan como promotores atípicos (cajas GC) para la pol II<sup>13</sup> [39]. Sin embargo, esto no aplica en todos los casos debido a que algunos miRNAs se encuentran contenidos en los

---

<sup>12</sup> Inicialmente se pensaba que la polimerasa III (pol III) era la candidata más probable para la transcripción de los miRNAs debido a que transcribe la mayoría de las especies pequeñas de RNA como los tRNAs y el U6 snRNA. Sin embargo las características de los transcritos primarios de los miRNAs no son compatibles con la funcionalidad de la pol III [40].

<sup>13</sup> Además de ser responsable de la transcripción de los genes codificantes ya se tenía conocimiento de la participación de la pol II en la transcripción de genes no codificantes como los snRNAs U1, U2, U4 y U5 [39].

intrones de ciertos pre-mRNAs<sup>14</sup>, por lo que comparten los elementos de regulación, promotores y el mismo transcrito primario [40].

La biogénesis de los miRNAs generalmente inicia con la transcripción de un transcrito primario conocido como pri-miRNA; que se caracteriza por **poseer cap (capuchón 5' 7-metilguanosina)** y estar poliadenilado [41]. Los transcritos pri-miRNA **forman estructuras secundarias del tipo 'tallosasa' (~80 pb)**<sup>15</sup>, estas son procesadas por el complejo microprocesador para producir un nuevo intermediario de ~65 pb conocido como pre-miRNA [42] (figura 11).

La RNasa III 'Drosha'<sup>16</sup> forma un complejo con una proteína de unión a RNA de doble cadena llamada 'DGCR8' (DiGeorge critical región 8) ó 'Pasha'<sup>17</sup> (Partner of Drosha), a esta asociación se le conoce como el complejo microprocesador [43] (figura 12).

---

<sup>14</sup> **Estos intrones conocidos como 'mirtrones' bajo ciertas circunstancias (contar con la longitud adecuada) pueden evitar el procesamiento nuclear normal, y ser exportados directamente (proceso que solo ha sido demostrado en *D. melanogaster* y *C. elegans*) [118].**

<sup>15</sup> Un solo pri-miRNA puede contener hasta 6 pre-miRNAs [114].

<sup>16</sup> Los miembros de la familia de RNasas III son endonucleasas específicas para RNA de doble cadena que producen cortes en cada lado de la hélice de RNA, estas se caracterizan por requerir de cationes divalentes ( $Mg^{2+}$ ) y producir cortes asimétricos (~2 nt). Drosha fue inicialmente relacionada con el procesamiento del RNA ribosomal (rRNA). Su localización subcelular principalmente nuclear posibilita su función como factor de procesamiento de los miRNAs [113].

<sup>17</sup> Este nombre comúnmente se usa solo en *D. melanogaster* y *C. elegans*.

Encargado de romper asimétricamente, pero de manera precisa, ambas cadenas de RNA cerca de la base de la estructura tallo-asa; el pre-miRNA resultante se caracteriza por tener un fosfato en el extremo 5' y dos nucleótidos extra en el extremo 3' [42]. Esta asimetría en sus extremos junto con la adecuada longitud del tallo (>14 nt) funcionan como señales estructurales de reconocimiento para la interacción con la exportina-5.

Si el reconocimiento es correcto, la exportina-5 protegerá y transportará de manera dependiente de Ran-GTP a los pre-miRNAs desde el núcleo hacia el citoplasma [44, 45, 46, 47, 48] (figura 12). Una vez en el citoplasma una segunda endonucleasa, la RNasa III 'Dicer'<sup>18</sup> procesa al pre-miRNA en un miRNA de ~22 nt de longitud.

Dicer tiene la capacidad de asociarse con proteínas de unión a RNA de doble cadena tales como la proteína activadora de PKR<sup>19</sup> (PACT) y la proteína de transactivación en respuesta a la unión a RNA (TRBP)<sup>20</sup>.

---

<sup>18</sup> Dicer, como miembro de la familia de RNasas III comparte sus propiedades. Fue reconocida, en un principio, por el papel que juega en relación a los RNAs pequeños interferentes (RNAi) [115]. Así mismo se relaciona con la edición de los transcritos de miRNA debido a su interacción con las proteínas ADARs (adenosin deaminasas) en complejos ADAR1-Dicer [117].

<sup>19</sup> PKR: proteína cinasa dependiente de RNA de doble cadena inducida por interferón ó proteína cinasa R. Esta participa en la respuesta inmune innata a infecciones virales, y en otros procesos biológicos como son: transducción de señales, apoptosis, proliferación celular y diferenciación celular.

El complejo Dicer-PACT/TRBP reconoce la porción de doble cadena del pre-miRNA (tallo) con lo que parece ser una particular afinidad por el **fosfato 5' y el extremo 3'** con los dos nucleótidos excedentes [49], entonces, a una distancia de aproximadamente dos vueltas de la hélice desde la base del tallo realiza un corte a ambas hebras del dúplex (figura 12).

En este corte se pierden los nucleótidos terminales junto con el asa de la estructura anterior; el miRNA obtenido de este procesamiento es un RNA de doble cadena con los dos nucleótidos excedentes de ambos lados, **los cuales definen sus extremos 'maduros'**.

Esta doble cadena está conformada por el miRNA maduro y un fragmento complementario derivado del brazo opuesto del pre-miRNA; a este **fragmento se le conoce como 'miRNA\*'**.

---

<sup>20</sup> La unión con TRBP estimula el procesamiento de los pre-miRNAs incrementando la afinidad del sustrato (RNA de doble cadena) por Dicer. En cambio el papel de PACT aun no está completamente claro; pero se sabe que asociadas con Dicer cada una de estas proteínas puede provocar que se produzcan distintos miRNAs a partir del mismo precursor. Por lo que la expresión de los diferentes miRNAs podría verse afectada por los niveles de expresión y localización de estas proteínas [116]. Estas proteínas a su vez se relacionan con la incorporación del miRNA al complejo RISC.

Los miRNAs\* generalmente se encuentran en menor frecuencia que los miRNAs debido a que la estabilidad del miRNA maduro aumenta considerablemente comparado con el dúplex miRNA:miRNA\*<sup>21</sup> [49].

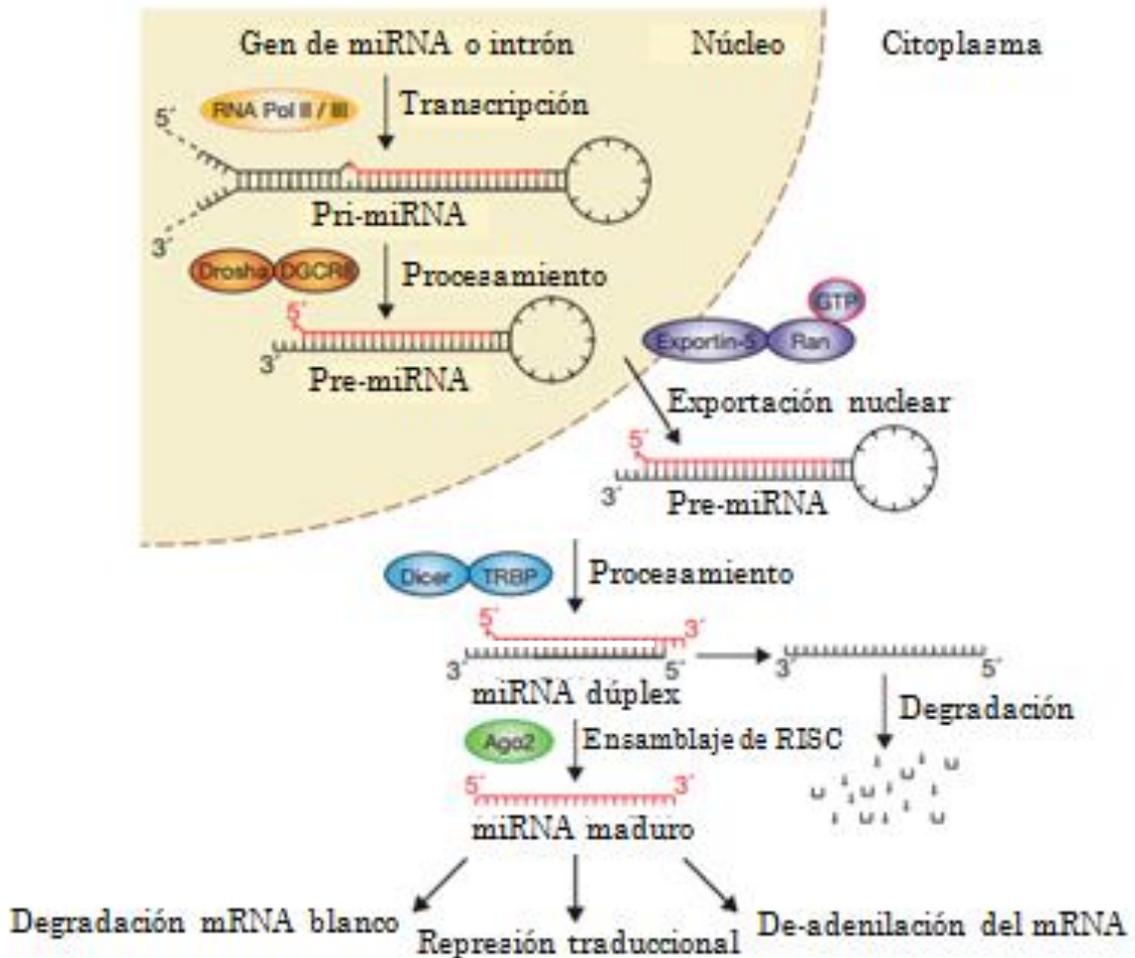


Figura 12. Biogénesis de los miRNA (mamíferos). Esta empieza en el núcleo con la producción del transcrito primario (pri-miRNA) por la pol II y su procesamiento por el complejo microprocesador (Drosha-DGCR8); las estructuras tallo-asa obtenidas son exportadas del núcleo al

<sup>21</sup> Posiblemente debido a la estabilidad que le confiere estar acoplado al complejo RISC.

citoplasma por la Exportina-5-Ran-GTP. En el citoplasma Dicer en complejo con PACT/TRBP procesa al miRNA a su tamaño maduro. La hebra funcional de miRNA maduro se carga en la proteína Argo2 para formar el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC). RISC entonces es guiado al mRNA blanco para llevar a cabo su función de silenciamiento principalmente (tomado de [50]).

Para que el miRNA pueda efectuar su función biológica necesita de un complejo citoplasmático conocido como **'complejo de silenciamiento inducido por RNA'** (RISC), la función de este es tomar al miRNA maduro y guiarlo hacia su mRNA blanco. Así mismo RISC necesita de un complejo proteico que permita su ensamblaje conocido como el complejo RISC de carga (RLC) (figura 13.A).

En este complejo se incluyen proteínas como Dicer-TRBP/PACT que además de proporcionar al miRNA a su secuencia final, TRBP y PACT tienen la capacidad de reclutar a las proteínas Argonauta (AGO)<sup>22</sup> [51, 52].

En algunos casos, como un paso previo al procesamiento por Dicer, cuando la cadena del brazo opuesto del pre-miRNA tiene una complementariedad muy alta con la cadena principal, la proteína

---

<sup>22</sup> En humanos el pre-miRNA solo se acopla al complejo RLC para su procesamiento **cuando se ha formado previamente el complejo terciario 'Dicer-TRBP/PACT-AGO'** [119].

Argonauta 2 (Argo2)<sup>23</sup> interviene cortando el brazo 3' de la cadena opuesta produciendo 'ac-pre-miRNA', lo que posiblemente facilite su posterior disociación y degradación [53] (figura 13.B).

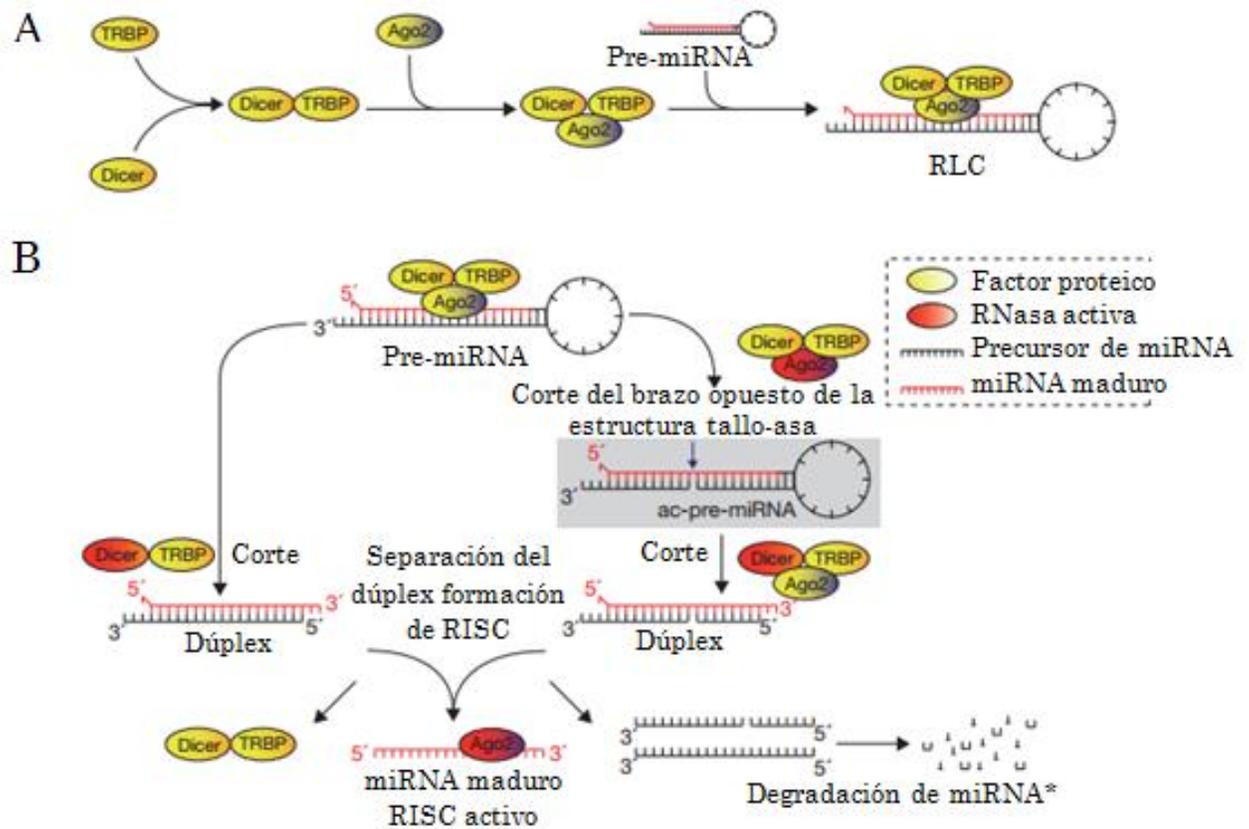


Figura 13. Formación del intermediario adicional 'ac-pre-miRNA' por Argo2. (A) formación del complejo 'RISC de carga' (RLC) y acoplamiento con el pre-miRNA. (B) procesamiento previo por Argo2, para favorecer la degradación y separación del miRNA\* (tomado de [50]).

<sup>23</sup> La proteína Argo2 es la única de las proteínas AGO en humanos que posee actividad catalítica endonucleasa [56].

Una vez que el pre-miRNA ha sido procesado en un miRNA por Dicer, el miRNA de doble cadena es transferido a la proteína Argo2 por medio de **la chaperona 'complejo multiproteico HSP90'**<sup>24</sup>. Entonces el complejo Dicer-TRBP/PACT se disocia para permitir la disociación y en algunos casos degradación del miRNA\*. La actividad catalítica única de la proteína Argo2, le confiere la capacidad de eliminar la cadena pasajera por sí misma, sin embargo, se ha involucrado a la endonucleasa C3PO en la degradación de la cadena pasajera con el corte del ac-pre-miRNA. Así mismo se ha observado que C3PO tiene la capacidad de interactuar con Argo2 y activar al complejo RISC.

El papel de C3PO relacionado con las proteínas AGO no catalíticas es controversial. Además de la participación de C3PO, al proceso de separación del dúplex también se le ha asociado la participación de distintas helicasas<sup>25</sup> (figura 14).

La unión del miRNA maduro con Argo2 además de estabilizarlo, permite que la proteína Argo2 sea guiada al sitio en el mRNA blanco donde el miRNA presenta una complementariedad parcial. Cuando este complejo

---

<sup>24</sup> Este complejo actúa hidrolizando ATP para mantener a la proteína Argo en una conformación abierta de manera que el dúplex de RNA pueda acomodarse [121] (figura 14).

<sup>25</sup> Se han asociado distintas helicasas a este proceso, entre las que se encuentran la RNA helicasa A, p68, p72, RCK/p54, TNRC6B, Germin3/4 y la Mov10 humana [120, 50].

interacciona con el sitio blanco, se recluta un miembro de la familia de proteínas GW (repetidos de Glicina-Triptófano) (figura 15).

Se ha propuesto que las proteínas GW interaccionan con la **'proteína C de unión a poli (A)'** (PABPC) inhibiendo su interacción con el **'complejo de unión al cap'**, evitando así la circularización del mRNA (requisito para la iniciación de la traducción eucarionte) [54], por otro lado, se propone que la cola de poli A interacciona con PABPC estimulando la asociación del complejo Argo-GW al mRNA [55]; en ambos casos se reprime la traducción (figura 15) [56].

El mecanismo por el cual se define que cadena se asocia con las proteínas AGO para convertirse en la cadena guía se atribuye **principalmente a la 'regla de la asimetría'**. Esta se refiere a la diferencia termodinámica existente entre los extremos de los dúplex de miRNA; la hebra que posea los apareamientos menos estables en el extremo 5' será preferencialmente cargada [56].

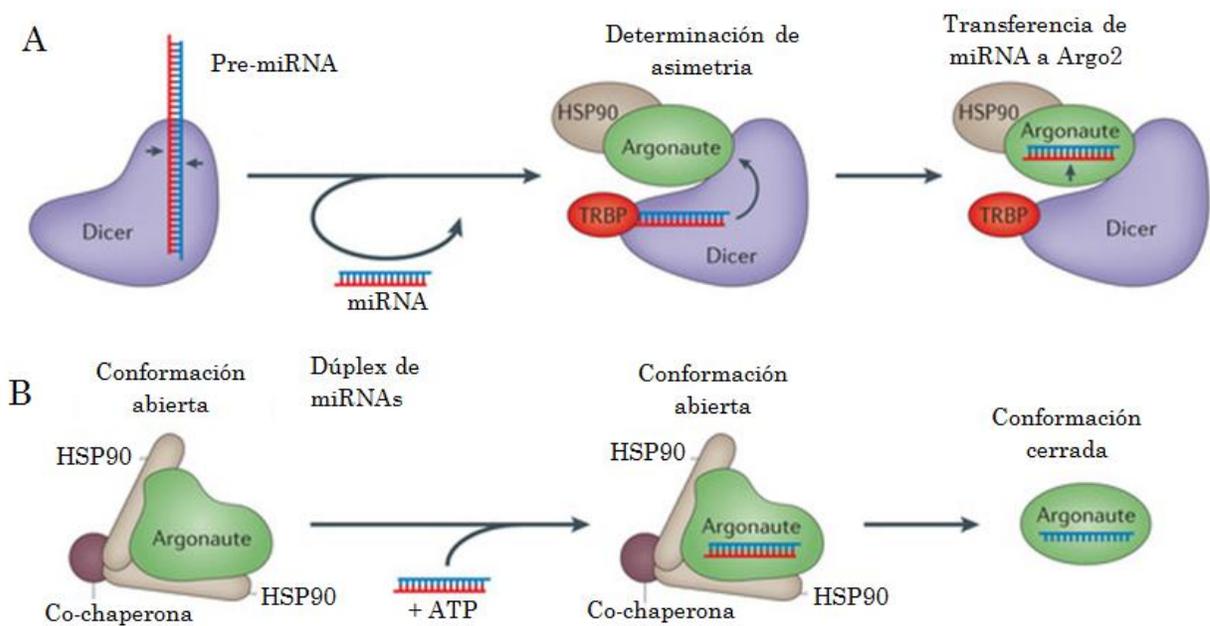


Figura 14. Modelo para la incorporación del miRNA dúplex en Argo2. (A) Dicer se une al pre-miRNA y utiliza sus dos dominios de RNasa para realizar cortes donde señalan las flechas negras generando un dúplex de miRNAs. TRBP/PACT participan identificando el extremo asimétrico para colocar al pre-miRNA en donde debe ser cortado. El dúplex es transferido a Argo2 gracias a proteína HSP90 (proteína del choque térmico) que la mantiene en una conformación abierta. (B) un dímero de HSP90 se une a Argo2 estando descargada y la mantiene en una conformación abierta. Este proceso es facilitado por la intervención de co-chaperonas. Después de que el miRNA\* es removido por una helicasa HSP90 hidroliza ATP y Argo2 regresa a tomar una conformación cerrada (tomado de [56]).

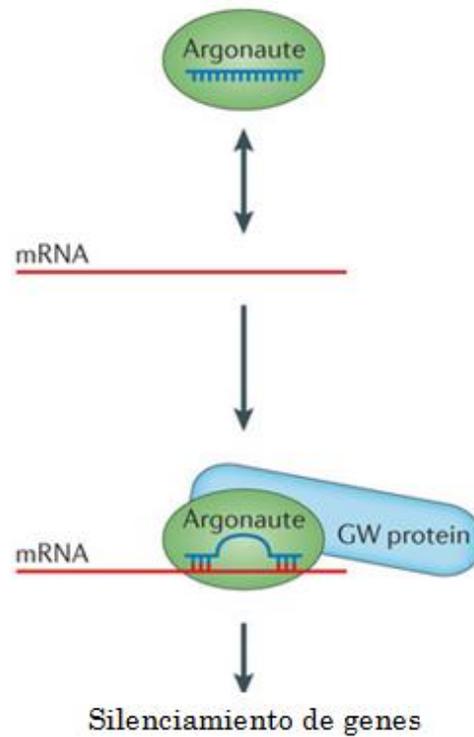


Figura 15. Reclutamiento de proteínas argonauta (AGO) a los RNAs blanco. Los miRNAs funcionan guiando a las proteínas AGO a secuencias con las que tienen complementariedad parcial con los mensajeros para coordinar los pasos consecuentes para el silenciamiento (tomado de [56]).

Aunque la cadena líder se acopla de manera preferencial al complejo RISC y normalmente la cadena estrella o pasajera (miRNA\*) se escarta y/o degrada; en algunos casos el miRNA\* es capaz de acoplarse al complejo [57].

Por lo tanto existe una mayor proporción de miRNA con respecto a la cantidad de miRNA\*. Esto se debe principalmente a la protección contra la degradación que le confiere al miRNA su incorporación a las proteínas AGO. Aun así, debido a que ambas cadenas tienen potencial regulatorio, no es sorprendente el hallazgo de algunas especies de miRNA\* en las células a niveles importantes, y formando complejos funcionales [58]. Por lo que se considera que las especies endógenas de miRNA\* también tienen la capacidad de ejercer un impacto directo en la expresión génica [57].

### 1. 3. 3. MicroRNAs circulantes

Los miRNAs pueden ser secretados por las células, mantenerse estables en circulación y ser tomados por otras células lejanas. Debido a que los fluidos corporales son ricos en Ribonucleasas como mecanismo de defensa, se ha descubierto que distintas especies de RNAs (incluidos los miRNAs) se encuentran en estos fluidos contenidos en vesículas de **lipoproteínas conocidas como 'exosomas'**<sup>26</sup>, los cuales mantienen a las especies de RNA en una forma relativamente estable [59].

---

<sup>26</sup> Los exosomas son vesículas con tamaños en el rango de los 30-90 nm que contienen proteínas, lípidos y ácidos nucleicos propios del tipo celular; los cuales son transportados a otras células una vez que han alterado la función y fisiología celular [61].

En los exosomas se han encontrado distintas especies de RNA: como mRNAs y miRNAs [60]. Sin embargo, se ha observado que las especies de mRNA contenidas son específicas para cada tipo de tejido. No se ha llegado a la misma conclusión con respecto a los miRNAs; debido a las dificultades que se han presentado para su estudio, como la falta de homogeneidad en las técnicas utilizadas para su identificación, ya que los miRNAs extracelulares pueden encontrarse en su forma libre asociada a proteínas y encapsulados en exosomas o en vesículas de secreción [61].

Las distintas especies de RNA (miRNAs y mRNAs) que se encuentran contenidas en vesículas son relativamente estables, ya que al encontrarse aisladas no son susceptibles a la degradación. Además la facilidad con la que es posible purificar estas especies de RNA a partir de fluidos biológicos (plasma, orina, semen, saliva o leche) los posiciona como posibles biomarcadores clínicos [61].

En distintos laboratorios se han planteado protocolos de investigación para identificar secuencias en las vesículas purificadas de individuos sanos y pacientes con cáncer [61]. Estas técnicas todavía se encuentran en desarrollo y la validez de sus resultados esta en debate debido a la gran cantidad de problemas metodológicos asociados [61]. Entre ellos la

dificultad para cuantificar las especies de RNA presentes en estos fluidos.

#### 1. 4. Métodos de estandarización

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una reacción enzimática que permite la purificación de una secuencia específica y su amplificación *in vitro* [62].

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR), es una variante de la PCR la cual permite reportar de manera cuantitativa la cantidad de RNA blanco [63].

Debido a la naturaleza de la técnica existen una gran cantidad de factores ajenos a las condiciones de estudio que pueden afectar a la cuantificación [64]. La importancia de la estandarización radica en disminuir esta influencia de factores externos lo más posible para que los resultados sean comparables entre ellos. Además, si no se utiliza un método de estandarización adecuado se corre el riesgo de que las variaciones en los niveles de expresión asociadas a una determinada condición puedan quedar enmascaradas bajo el efecto del normalizador (falsos positivos / falsos negativos).

Existen dos métodos para analizar los datos obtenidos a partir de la qPCR, la cuantificación relativa y la cuantificación absoluta. La cuantificación absoluta se aplica cuando es necesario saber el número de copias de un determinado gen, sin embargo, en la mayoría de los ensayos esto no es relevante [65]. En cambio, la cuantificación relativa utiliza la expresión de un gen la cual se supone como constante y cuya expresión no se encuentra sujeta a regulación (normalizador); para determinar el nivel de expresión de los genes problema. Esta simplemente indica cuantas veces es mayor o menor la expresión del gen problema con respecto al normalizador [66] [67].

La cuantificación relativa tiene por característica que los genes problema y el gen normalizador se encuentran presentes en la muestra durante toda la metodología [66]. El normalizador o estándar puede ser de origen exógeno o endógeno. Esto quiere decir que puede ser una molécula que se expresa de manera constitutiva en el tejido o fluido que se está estudiando, o puede tratarse de una molécula sintética similar a la molécula problema, pero que no se exprese de manera natural en el tejido o fluido de estudio (generalmente se utilizan moléculas del mismo tipo que la secuencia problema pero de especies diferentes, y para el

caso de los mamíferos estas preferentemente provienen de especies inferiores).

A pesar de que introducir un RNA exógeno (*spike in*) en la muestra y utilizarlo como estándar es válido, solo se recomienda como ajuste para las variaciones técnicas ya que pueden provocar problemas con la cuantificación [33].

Por otro lado, al utilizar una referencia endógena se tiene que considerar que aun los genes más estables son objeto de regulación [68] [69]. Por estas razones se podría concluir que no hay manera de controlar las perturbaciones relacionadas con el procedimiento de cuantificación. Y en el caso del suero, la incertidumbre aumenta debido a la ausencia de un consenso en cuanto que genes de mRNAs, miRNAs y otras especies de RNA tendrían que presentar expresión constante [33].

Por lo tanto, antes de que cualquier gen sea elegido como estándar debe de ser analizado exhaustivamente para determinar su estabilidad entre las muestras [70]. Para ello se han desarrollado una serie de técnicas y algoritmos que se describirán a continuación.

#### 1. 4. 1. Método $2^{-\Delta\Delta Ct}$

El método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  permite calcular los cambios relativos en la expresión de los genes, eliminando la diferencia en los niveles de expresión entre individuos con respecto a un gen cuya expresión se considera constante [65].

El método consiste en obtener la diferencia entre el nivel de expresión ( $\Delta Ct$ ) de los genes problema con respecto al normalizador de los grupos control y problema por separado. Para posteriormente calcular la diferencia ( $\Delta\Delta Ct$ ) de la expresión de los genes en los pacientes con respecto al grupo control [65].

Este método considera que los niveles de expresión pueden variar entre individuos por diversos factores no relacionados a las condiciones que se están analizando en el estudio, y por ello, es necesario realizar la normalización primero de los niveles de expresión del gen problema con respecto a su normalizador por cada individuo ( $\Delta Ct$ )(sin importar si es control o paciente), y posteriormente la normalización de los pacientes con respecto a los casos control ( $\Delta\Delta Ct$ ) [65]. Es decir, ajustar la expresión a los valores de los controles, y a los valores de un gen que se presume se expresa de manera constante. De ahí la importancia de elegir al gen normalizador más estable.

$2^{-\Delta Ct}$ :

$$\text{Siendo, } -\Delta C_T = C_{T,q} - C_{T,cb} \quad (\text{Ecuación. 1})$$

Donde:

- $C_T$  = 'threshold cycle', número de ciclo fraccional en el cual el blanco amplificado alcanza un umbral determinado.
- q = Muestra
- cb = Calibrador

Para amplicones menores a 150 pb y para los cuales las concentraciones de primers y magnesio son óptimas, la eficiencia es cercana a uno [65]. Por lo tanto, la cantidad de secuencias blanco normalizadas a una referencia endógena y relativa a un calibrador (normalizador), viene dada por:

$$2^{-\Delta C_T} \quad (\text{Ecuación. 2})$$

Que es igual a:

$$2^{-(Ct_{muestra} - Ct_{promedio de los controles})} \quad (\text{Ecuación. 3})$$

Esta metodología se aplica a los datos obtenidos para el normalizador y para el gen problema, una vez que se obtiene la  $2^{\Delta Ct}$  respectiva entonces se continua con el siguiente análisis.

$2^{\Delta\Delta Ct}$

Siendo,  $-\Delta\Delta C_T = -(\Delta C_{T,q} - \Delta C_{T,cb})$  (Ecuación. 4)

Donde:

- $C_T$  = 'threshold cycle', número de ciclo fraccional en el cual el blanco amplificado alcanza un umbral determinado.
- q = Muestra
- cb = Calibrador

Al igual, si se encuentra propiamente optimizada la eficiencia se puede considerar como uno, entonces la cantidad de la referencia relativa a un calibrador se convierte en:

Cantidad de secuencia blanco:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  (Ecuación. 5)

Que es igual a:

$2^{-(\Delta C_{t_{gen\ problema}} - \Delta C_{t_{gen\ normalizador}})}$  (Ecuación. 6)

#### 1. 4. 2. Normalización por volumen y $\Delta Ct$

Los datos crudos se pueden estandarizar respecto a la cantidad de material biológico, esto permite descartar la acción inhibitoria que el tejido ejerce sobre la muestra (presencia de nucleasas) [70].

Así mismo, la cuantificación se puede expresar con respecto a la cantidad total de RNA extraído. Las especies predominantes como el RNA ribosomal (rRNA) (que varían con respecto a la cantidad de RNA total) pueden utilizarse como normalizador. Sin embargo, cuando se trabaja con suero estas estrategias pierden su validez [70]; debido principalmente a que las especies de rRNA son necesarias para llevar a cabo el proceso de traducción en las células, sin embargo, esta misma suposición no aplica a las especies de RNA en suero.

Además, como se menciono anteriormente, se desconoce el contenido exacto de las vesículas, y si es que hay una especie de RNA predominante en ellas [61].

Normalizar la cantidad de miRNAs en suero con respecto a la cantidad inicial de material biológico, en este caso volumen de suero, ha demostrado ser relativamente útil, aunque controversial [71].

La expresión relativa normalizando con respecto a volumen puede obtenerse mediante la fórmula:

$$Q_{rel} = E^{-(Cq_{muestra\ problema} - Cq_{promedio\ de\ todas\ las\ muestras})} = ef\ PCR \quad (\text{Ecuación. 7})$$

*ef PCR* = eficiencia de la PCR

$Cq$  = ciclo de cuantificación (pudiendo adaptarse a **Threshold cycles' Ct** [71]).

Si se encuentra propiamente optimizada la eficiencia, entonces la cantidad de la referencia relativa a al volumen se convierte en:

$$Q_{rel} = 2^{-(Cq_{muestra\ problema} - Cq_{promedio\ de\ todas\ las\ muestras})} \quad (\text{Ecuación. 8})$$

A fin de comparar la validez de la normalización por volumen con la utilización de un gen normalizador; Song, J y cols. (2011) también desarrollaron un método que permite realizar la normalización a partir de la  $\Delta Ct$  obtenida de los datos de expresión del gen problema y del normalizador [71]. El cual se representa de la siguiente manera:

$$Q_{rel} = E^{-(Cq_{muestra\ problema} - Cq_{normalizador})} \quad (\text{Ecuación. 9})$$

Así mismo, si se encuentra propiamente optimizada la eficiencia, entonces la cantidad de la referencia relativa al volumen se convierte en:

$$Q_{rel} = 2^{-(Cq_{muestra\ problema} - Cq_{normalizador})} \quad (\text{Ecuación. 10})$$

### 1. 4. 3. NormFinder

Todos los genes muestran algún tipo de variación, además en la mayoría de los ensayos de qPCR la muestra consta de dos o más grupos, y basta con tan solo una pequeña variación entre estos para llegar a una interpretación errónea de los datos. Además de la variación total, este algoritmo toma en consideración la variación que se presenta entre los subgrupos en la muestra [72].

La evaluación de la estabilidad de un gen candidato presenta el problema de que no existe una referencia estable para medirlo (el normalizador debería proveer la referencia estable para la cuantificación de la especie de RNA deseada). Para resolver este problema se utiliza un enfoque basado en un modelo para la estimación de la variación en la expresión, como lo es la herramienta basada en Excel® NormFinder [72].

El modelo: Siendo  $Y_{ij}$  la medida logarítmica-transformada<sup>27</sup> de la expresión génica para el gen  $i$  en la  $j'$ -ésima muestra del grupo  $g$ . Se tienen un total de  $k$  genes y  $G$  grupos, el número de muestras en un grupo es  $n_g$  [72].

---

<sup>27</sup> Transformación logarítmica que se aplica para reducir el sesgo en los datos; permite la linealización de los datos crudos.

El modelo consiste en expresar  $Y_{igj}$  como la suma de tres términos.

$$Y_{igj} = \alpha_{ig} + \beta_{gj} + \varepsilon_{igj} \quad (\text{Ecuación. 11})$$

Términos:

- $\alpha_{ig}$  = representa el nivel de expresión general para el gen candidato  $i$  dentro del grupo  $g$ .
- $\beta_{gj}$  = Representa la cantidad de la especie de RNA de interés en la muestra  $j$ .
- $\varepsilon_{igj}$  = Variación aleatoria causada por factores biológicos y experimentales, con una media de cero y varianza  $\sigma_{ig}^2$ .

Estimación de la variación intra-grupal: para estimar esta variación es necesario formar los residuales usuales para un modelo aditivo, elevarlos al cuadrado, y tomar la suma sobre las muestras que pertenecen al grupo [72]. Al dividir la suma por  $(n_g - 1)(1 - 2/k)$ , obtenemos el término  $S_{ig}^2$  y el estimado de  $\sigma_{ig}^2$  es:

$$\hat{\sigma}_{ig}^2 = S_{ig}^2 - \frac{1}{k(k-1)} \sum_{v=1}^k S_{vg}^2 \quad (\text{Ecuación. 12})$$

En este caso  $\hat{\sigma}_{ig}^2$  es un estimado imparcial de  $\sigma_{ig}^2$ .

Estimación de la variación inter-grupal: Siendo  $Z_{ig}$  el promedio de  $Y_{igj}$  sobre todas las muestras en el grupo  $g$ . Si  $\theta_g$  es el promedio de  $\beta_{gj}$

sobre las muestras en el grupo  $g$ , la media de  $Z_{ig}$  es  $\alpha_{ig} + \theta_g$ , y la varianza es  $\sigma_{ig}^2/n_g$ . Con respecto a la variación inter-grupal, es la variación de  $Z_{ig} - \theta_g$ ,  $g = 1, \dots, G$  la que define la idoneidad del gen  $i$  como gen normalizador [72].

Valor de Estabilidad: habiendo estimado las variaciones intra e inter-grupal ambos se combinan para obtener el valor de estabilidad, el cual adiciona ambas fuentes de variación y representa una medida del error sistemático que será introducido cuando se use el gen normalizador analizado. Siendo  $\alpha_i$  la media de  $\alpha_{ig}$ . Se estima  $Z_{ig} - \theta_g - \alpha_i$ , asumiendo que el promedio de  $\alpha_{ig}$  sobre los genes  $i = 1, \dots, k$  es independiente del grupo  $g$ . Entonces  $Z_{ig} - \theta_g - \alpha_i$  es naturalmente estimado por  $d_{ig} = Z_{ig} - \bar{Z}_i - \bar{Z}_g + \bar{Z}_{..}$ , donde las barras indican promedio, entonces, el valor de estabilidad se convierte en [72]:

$$\rho_{ig} = \frac{\widehat{y}^2 |d_{ig}|}{\widehat{y}^2 + \widehat{\sigma}_{ig}^2/n_g} + \sqrt{\frac{\widehat{\sigma}_{ig}^2/n_g}{\widehat{y}^2 + \widehat{\sigma}_{ig}^2/n_g} + \frac{\widehat{y}^2 \widehat{\sigma}_{ig}^2/n_g}{\widehat{y}^2 + \widehat{\sigma}_{ig}^2/n_g}} \quad (\text{Ecuación. 13})$$

Donde  $\gamma^2$  es la varianza de  $\alpha_{ig}$ , este se estima mediante:

$$\frac{1}{(k-1)(G-1)} \sum_{i=1}^k \sum_{g=1}^G d_{ig}^2 - \frac{1}{kG} \sum_{i=1}^k \sum_{g=1}^G \widehat{\sigma}_{ig}^2/n_g \quad (\text{Ecuación. 14})$$

La validez de este enfoque aumenta cuando el número de muestras y candidatos aumenta. Un grupo debería de contar con por lo menos 2 muestras por grupo y el número de candidatos debería de ser de por lo menos tres por razones técnicas (aunque de ser posible se recomienda aumentar el número tanto como sea posible) [72].

#### 1. 4. 4. GeNorm

Se trata de una herramienta creada para utilizarse en Excel® la cual automáticamente calcula **la medida de la estabilidad 'M' para todos los genes control** de una serie de muestras [73].

Este algoritmo toma en consideración que para realizar mediciones más cercanas al valor real de los niveles de expresión es necesario utilizar múltiples genes normalizadores en vez de uno solo. El factor de normalización considera los niveles de expresión de los genes normalizadores más estables. Este realiza un promedio de los genes **normalizadores 'óptimos' utilizando la 'media geométrica' en vez de la media aritmética**, dadas las posibles diferencias en la expresión entre los distintos genes. El número de genes normalizados se determina en relación a consideraciones prácticas (experimentalmente posible) y la precisión [73].

Se recomienda utilizar al menos tres genes candidatos para calcular el 'factor de normalización' (NF), considerando la abundancia de muestras y de las especies de RNA de interés en ellas. Esta medida determinará si es necesario utilizar un solo gen candidato o combinaciones entre ellos [73].

$$(\forall j, k \in [1, n] \text{ y } j \neq k):$$

Para toda combinación de dos genes normalizadores endógenos j y k, un arreglo  $A_{jk}$  de los m elementos es calculado, este consiste de los radios de expresión transformados  $\log_2 a_{ij}/a_{ik}$ .

$$A_{jk} = \left\{ \log_2 \left( \frac{a_{1j}}{a_{1k}} \right), \log_2 \left( \frac{a_{2j}}{a_{2k}} \right), \dots, \log_2 \left( \frac{a_{mj}}{a_{mk}} \right) \right\} = \left\{ \log_2 \left( \frac{a_{ij}}{a_{ik}} \right) \right\}_{i=1 \rightarrow m} \quad (\text{Ecuación. 15})$$

La variación por parejas  $V_{jk}$  para los genes normalizadores j y k se define como la desviación estándar de los elementos  $A_{jk}$ .

$$V_{jk} = \sigma (A_{jk}) \quad (\text{Ecuación. 16})$$

La medida de la estabilidad  $M_j$  para el gen normalizador j es la media aritmética de las variaciones por parejas  $V_{jk}$  [73].

$$M_j = \frac{\sum_{k=1}^n V_{jk}}{n-1} \quad (\text{Ecuación. 17})$$

#### 1. 4. 5. BestKeeper

Esta es una herramienta basada en Excel®, la cual tiene la capacidad de comparar los niveles de expresión de hasta 10 genes normalizadores junto con 10 genes blanco, cada uno con un máximo de 100 muestras biológicas.

Este define el normalizador 'óptimo' empleando el análisis de correlación por pares (*pair-wise correlation analysis*) y calcula la media geométrica<sup>28</sup> de los candidatos con el mejor comportamiento. Los datos crudos utilizados como 'input' son los 'Crossing Points' (CP) o 'Threshold cycles' (Ct). Tiene la limitante de ser invalido para aplicarse entre grupos de genes altamente expresados (CP~15) y genes pobremente expresados (CP 30-35), debido a que no pueden ser correlacionados paramétricamente (diferencia de varianzas invalida el *coeficiente de correlación de Pearson*) [70].

Índice BestKeeper =

$$\sqrt[n]{CP_1 \times CP_2 \times CP_3 \times \dots \times CP_z} \quad (\text{Ecuación. 18})$$

---

<sup>28</sup> La media geométrica (MG) se utiliza en datos relativos y se define como la raíz n-ésima del producto; se calcula por medio de la siguiente fórmula:

$$MG = \sqrt[n]{x_1 \times x_2 \dots \times x_n} [124].$$

El índice BestKeeper específico para la respectiva muestra es calculado como la media geométrica de los mejores genes candidatos a normalizador (Ecuación. 5);  $z$  es el total de genes candidatos incluidos [70].

#### 1. 4. 6. Delta Ct comparativa

De entre los programas que permiten seleccionar a un normalizador óptimo, algunos tienen la desventaja de que no se pueden usar en datos obtenidos de muestras con cantidades iniciales pequeñas de material genético [70] [74]. Así mismo, el uso de cantidades constantes de material genético sintético para normalizar (*Spike in*) resulta contraproducente cuando se trabaja con concentraciones iniciales bajas. De ahí que Silver, N y cols. (2006) plantearan un método para encontrar un normalizador óptimo aplicable a muestras con cantidades iniciales pequeñas de material genético (en nuestro caso miRNA); el método de la delta CT comparativa [74].

Este método consiste en formar pares de genes y comprarlos utilizando su  $\Delta Ct$ . Bajo la premisa de que si el valor de  $\Delta Ct$  entre dos genes permanece constante cuando es analizado en distintas muestras, significa que ambos genes están expresados de manera estable en esas

muestras. Ahora bien, si el valor de  $\Delta Ct$  varía, entonces, uno de los genes se está expresando de manera variable [74].

Cuando se introducen más genes candidatos al análisis, las comparaciones se vuelven más informativas acerca de cuáles pares presentan una menor variabilidad, de manera que se puede crear un ranking. Los genes más variables son eliminados del análisis en base a sus valores de  $\Delta Ct$ , hasta que uno de los genes prevalece, siendo este el normalizador óptimo para el set de datos que se está trabajando [74].

Múltiples grupos de investigación han estudiado la asociación de ciertos miRNAs en fluidos biológicos (suero y plasma) cuyos niveles de expresión se encuentran desregulados en una cierta patología. En la siguiente tabla (Tabla 5) se recopiló la información concerniente a varios de estos estudios.

Tabla 5. Estudios de la normalización de miRNAs en suero/plasma para distintas patologías.

Normalizador	Muestra	Patología	Grupo de edad (años)	Método	Tipo de normalizador	Candidatos	Ref.
Cuantificación absoluta	Suero	Astrocitoma maligno (grado III y IV), meningioma, oligodendroglioma ependimoma	Pacientes	Curva estándar	Volumen	Ninguno	[75]
			44.83(30.42-59.24), 32.8(23.36-42.24), 42.89(31.11-54.67), 47.49(34.88-60.1), 47.2(35.8-58.6)				
			Controles	Método $-\Delta\Delta Ct$	Gen endógeno	RNU6B RNU44, RNU48, miR-16, Let7 trio <sup>29</sup>	
			46.8(35.3-58.3)		Spike in	miRNAs exógenos de <i>C. elegans</i> y plantas	
Cuantificación absoluta	Suero	Astrocitomas (grado II, III y IV)	Pacientes	Curva estándar	Volumen	Ninguno	[76] [77] [78]
			50.1(37-63.2), 49.7(35.9-63.5), 52.1(37.8-66.4)				
			Controles				
			49.2(33-65.4), 49.1(35.1-63.1)				

<sup>29</sup> La normalización usando el trío de Let-7-g, Let-7-i y Let-7-d arrojo resultados similares a los obtenidos mediante la cuantificación relativa (ver información suplementaria de referencia [75]).

Normalizador	Muestra	Patología	Grupo de edad (años)	Método	Tipo de normalizador	Candidatos	Ref.
let-7d-5p	Suero	Diabetes autoinmune del tipo I y melanoma maligno	Pacientes	Método <b>-ΔCt</b>	Gen endógeno	RNU6B, miR-16, miR-374a, miR-374b, let7d	[79]
			23.5(11.4-35.6), 60.1(43.4-76.8)				
			Controles		Spike in	Cel-lin-4	
			27.4 (16.5-38.3), 58.3 (47.7-68.8)				
mmu-miR-295	Plasma	Glioma (grado II, III y IV), Meningioma, Hipofisoma	Pacientes	Método <b>-ΔΔCt</b>	Spike in	mmu-miR-295	[80]
			47.9 (25-71), 45.9 (25-72), 51.3 (27-75), 46.1 (18-60), 49.2 (35-73)				
			Controles				
			Sin información				
let-7d, let-7g, let-7i	Suero	Cáncer pulmonar de células no pequeñas, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer colorrectal, cáncer esofágico, cáncer pancreático, cáncer cérvico, hepatocarcinoma, enfermedades inflamatorias, diabetes tipo II de distintas edades	Pacientes	Método <b>-ΔΔCt</b> , GeNorm, Norm-Finder	Gen endógeno	β-actin, GAPDH, 28S rRNA, U6, RNU44, RNU48, SNORD24, SNORD38B, SNORD43, SNORA66 and SNORA74A	[81]
			60.77(51.35-70.19), 63.24(55.92-70.56), 60.88(52.28-69.48), 59.29(49.33-69.25)				
			Controles				
			36.51(13.86-59.16), 60.69(52.25-69.13), 59.19(49.09-69.29), 58.63(49.12-68.14)				

Normalizador	Muestra	Patología	Grupo de edad (años)	Método	Tipo de normalizador	Candidatos	Ref.
miR-16, miR-93	Suero	Cancer gastrico (estadio I, II, III y IV)	Pacientes	GeNorm, Norm-Finder, Best-keeper, Método $-\Delta Ct$	Gen endógeno	let-7a, miR-16, miR-93, miR-103, miR-192, and miR-451 and RNU6B	[71]
			59.5 (35-88)				
			Controles				
			41 (27-60)				
miRNA-191, miRNA-484	Suero	Cáncer de mama, Cáncer de pulmón, cáncer cervical, cáncer gástrico, carcinoma hepatocelular	Pacientes	Método $-\Delta Ct$ , Método $-\Delta\Delta Ct$	Gen endógeno	RNU6B, cel-miR-39, miRNA-191, miRNA-484, miR-16	[82] [83]
			54.00 (43.7-64.3),				
			52.99(40.09-65.89),				
			M <sup>30</sup> : 48, M: 49				
			Controles				
51.04 (38.24-63.84), 49.16(37.38-60.94)							
miR-16, miR-484, cel-miR-39	Suero	Cáncer de mama localizado, cáncer de mama metastásico con tratamiento y cáncer de mama metastásico sin tratamiento	Pacientes	Método $-\Delta Ct$	Gen endógeno	miR-16, miR-484,	[84] [82]
			<50 (43 %), ≥50(57 %)				
			Controles		Spike in	cel-miR-39	[85]
			Sin información				

<sup>30</sup> MD: media de la edad.

Normalizador	Muestra	Patología	Grupo de edad (años)	Método	Tipo de normalizador	Candidatos	Ref.	
SNORD43	Suero	Cáncer prostático, cáncer vesical no músculo invasivo, cáncer vesical músculo invasivo, carcinoma de células renales de tipo células claras, cistectomía radical, nefrectomía, hiperplasia prostática benigna, incontinencia urinaria	Pacientes	Método - $\Delta$ Ct, Norm-Finder, geNorm	Gen endógeno	RNU1-4, RNU6B, SNORD43, SNORD44, SNORD48, SNORA74A, miR-let-7a-1, miR-106a	[86]	
			64.5(43-76), 65.1(44-80), 67.58(50-80), 70.27(52-84)					
			Controles		Spike in			
			57.24(49-83)					
cel-miR-39	Suero	tumor de las células de leydig, quiste epidermoide, teratoma maduro, tumor adenomatoide, infartación testicular, tumor de células fusiformes, tejido cicatrizante	Pacientes	Método - $\Delta\Delta$ Ct	Spike in	cel-miR-39	[87]	
			34.5(21-51), 37.1(24-51), 31.9(21-46), 35.9(14-59), 38.2(23-59), 31.1(14-54), 32.4(19-64)					
			Controles					Curva de calibración
			28.7(19-49), 31.9(18-57)					

Normalizador	Muestra	Patología	Grupo de edad (años)	Método	Tipo de normalizador	Candidatos	Ref.
Cuantificación absoluta	Plasma	Carcinoma esofágico de células escamosas	Pacientes	Curva de calibración	Volumen	Ninguno	[88]
			49(47%), 56(53%)				
			Controles				
			Sin información				
miR-16	Suero	linfoma difuso de células B grandes <i>de novo</i>	Pacientes	Método $-\Delta Ct$	Gen endógeno	miR-16, RNU6B, S5	[89]
			63(52-74)				
			Control				
			M: 57				
RNU6B	Suero	Cáncer cervical, cáncer colorrectal, cáncer de ovario, cáncer de mama, cáncer gástrico, cáncer del endometrio	Pacientes	Método $-\Delta\Delta Ct$	Gen endógeno	Ninguno	[90]
			47.86(37.98-57.74)				
			Controles				
			46.16(36.05-56.27)				
miR-16, cel-miR-54	Exosomas de suero	Melanoma avanzado, melanoma con metástasis, melanoma libre de enfermedad	Pacientes	Método NCT-miR	Gen endogeno	Ninguno	[91]
			x: 53, x: 54				
			Controles		Spike in		
			Similares				

Normalizador	Muestra	Patología	Grupo de edad (años)	Método	Tipo de normalizador	Candidatos	Ref.
miR-30c-5p, miR-181a-5p	Suero	Melanoma primario (estadios I-III)	Pacientes	Norm- Finder, normaliza- ción respecto al Cp promedio	Gen endógeno	hsa-miR- 30c, hsa- miR-27a, hsa-miR- 181a, hsa- miR-27b, hsa-miR- 142-3p, hsa- miR-92a, hsa-miR- 660, hsa- miR-451, hsa-miR- 320b, hsa- miR-320a	[92]
			61(21-96), 59.5(25- 88)				
			Controles				
			Sin información				

En la tabla 5 es posible observar que en algunos de los estudios las poblaciones son extremadamente heterogéneas, y presentan una gran variación en la edad de los pacientes. Lo cual puede afectar la veracidad de los resultados obtenidos, ya que se ha demostrado que la edad es un factor determinante de los niveles de expresión de ciertos miRNAs en suero [93].

De entre todos los genes que son utilizados como referencias endógenas en los estudios contenidos en la tabla 5, se seleccionaron a los genes

RNU6-6P, SNORD61, y Let7g como candidatos para actuar como el gen normalizador de los niveles de expresión de miRNA en nuestra población de estudio.

Estos genes cuentan con un cierto nivel de aceptación de entre las referencias endógenas previamente aplicadas en distintos trabajos. Y se han elegido bajo la consideración del grupo de edad de la población, el tipo de patología y los perfiles de expresión de miRNAs obtenidos previamente en tejido [94].

En un estudio anterior realizado con muestras de tejido proveniente de los mismos pacientes se encontraron una serie de miRNAs que presentan una expresión diferencial significativa en los pacientes con Ast con respecto a muestras de tejido con gliosis [94]. Por esta razón en el presente estudio se decidió utilizar uno de estos miRNAs para corroborar el efecto del normalizador en la cuantificación relativa de los niveles de expresión de un gen problema (miR130a).

## 2. Hipótesis

El gen que presente un comportamiento más estable resultará ser el mejor normalizador de entre los candidatos para la cuantificación relativa de miRNAs en la población de estudio.

### 3. Objetivos

#### 3. 1. Objetivo general

- Identificar el gen normalizador para el estudio de miRNAS en suero de pacientes pediátricos con astrocitomas infantiles.

#### 3. 2. Objetivos particulares

- Determinar la expresión de los genes candidatos en las muestras control y problema mediante qPCR.
- Determinar la referencia que presente la menor variabilidad entre muestras mediante la técnica de la delta comparativa y la aplicación de los algoritmos: GeNorm y NormFinder.
- Validar el desempeño del normalizador óptimo en relación a los otros genes candidatos mediante la cuantificación relativa del miR130a por el método  $2^{\Delta\Delta Ct}$  y la normalización por volumen.

## 4. Metodología

### 4. 1. Población de estudio

Población problema: Se colectaron muestras de suero de pacientes en edad pediátrica (0-16 años) diagnosticados con Ast, y con otros tumores del sistema nervioso central (Meduloblastoma y Pineoblastoma).

Población control: se realizo un pool de sueros provenientes de pacientes en edad pediátrica que acudieron a servicios de consulta externa, como criterio de exclusión se consideró el hecho de que no tuvieran antecedentes de cáncer.

Tabla 6. Información de las muestras trabajadas.

Clave	Grupo	Tipo Tumor Cerebral	Edad	Tratamiento
1	Astrocitoma sin tratamiento	Astrocitoma	12a	No
2		Astrocitoma	11a	No
3	-----	Astrocitoma Difuso	12a	Si
4	Astrocitoma con tratamiento	Astrocitoma Difuso	----	Si
5		Glioblastoma Multiforme	4a2m	Si
6	Otros tumores del sistema nervioso central	Pineoblastoma	12a	Si
7		Meduloblastoma	11a	Si
8	Control	Control (Consulta externa)	9a	-----
9			3a	
			2a	
		Control (Alergias)	13a	-----
9a				

a: años, m: meses

#### 4. 2. Obtención del suero

Se tomó una muestra de sangre periférica (3 mL) con un tubo de colección al vacío (vacutainer® BD Becton, Dickinson and Company, New Jersey) con activadores de la coagulación, se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente, y se centrifugó a 750 xg por 15 min y se reservó el suero para su posterior aplicación. Almacenar a -20° C.

#### 4. 3. Genes candidatos

Se realizó una revisión bibliográfica para encontrar posibles genes que puedan ser utilizados para normalizar la concentración de miRNAs en el suero de los pacientes con Ast pediátricos y los controles; considerando lo reportado anteriormente por estudios similares. Los genes candidatos elegidos fueron: RNU6-6P, SNORD61 y Let-7g.

##### 4. 3. 1. Validación

Para verificar el efecto de la selección del normalizador sobre los datos se planteó normalizar la expresión del miRNA mir130a con respecto a todos los genes candidatos.

#### 4. 4. Preparación de la muestra

Las muestras de suero fueron descongeladas en hielo, y centrifugadas a 750 xg por 10 minutos. Del sobrenadante se obtuvo el suero que fue utilizado en las aplicaciones posteriores, y el pellet se descartó. Esta última centrifugación se realiza a fin de eliminar ciertos residuos que se concentran en suero y que en dado caso podrían interferir con la purificación del RNA (restos celulares, lípidos, agregados proteicos).

#### 4. 5. Purificación de RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el Total RNA purification kit (Norgen **Biotek Corp., Ontario Canadá**) a partir de 200 µL de suero siguiendo las instrucciones del fabricante. El RNA purificado se almacenó a -20° C hasta su utilización. La concentración se determinó por medio de la absorbancia UV en el equipo NanoDrop 1000 (Thermo Scientific, Massachusetts EUA). Debido a las bajas concentraciones de RNA obtenidas a partir del suero en algunos casos la concentración obtenida no fue la necesaria para alcanzar los 200 ng de RNA recomendados para la reacción de la transcriptasa reversa, por lo que se utilizó un volumen fijo de muestra (12 µL) como se ha realizado en estudios similares anteriormente [95, 96].

#### 4. 6. Transcripción reversa

Para la síntesis de cDNA se utilizó el kit comercial 'miScript II RT kit' (Qiagen, Hilden Alemania). Los volúmenes utilizados fueron los siguientes: 4  $\mu\text{L}$  de 5x 'miScript HiSpec Buffer', 2  $\mu\text{L}$  de 10x 'miScript Nucleics Mix' y 2 de c 'miScript reverse transcript Mix', todos reactivos de Qiagen. A esto le fue añadido el volumen de RNA purificado necesario para alcanzar los 200 ng de RNA completando el volumen total a 20  $\mu\text{L}$  con agua libre de nucleasas. En caso de que la concentración obtenida fuera menor a los 17 ng/ $\mu\text{L}$  solo se adicionaron 12  $\mu\text{L}$  del RNA purificado. La reacción se llevo a cabo utilizando el protocolo recomendado (37° C, 60 min; 95° C, 5 min; mantener a 4° C). Los productos obtenidos fueron almacenados a -20° C hasta el momento de ser utilizados.

#### 4. 7. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)

La detección de los miRNAs maduros de interés se llevo a cabo por medio del 'miScript PCR System' (Qiagen, Hilden Alemania). Se utilizo el 'miRNA-specific miScript Primer Assay' para los genes: RNU6-6P, SNORD61, Let-7g y mir130a; y el 'miScript SYBR Green PCR Kit'. Los volúmenes utilizados fueron los siguientes: 12.5  $\mu\text{L}$  de 2x 'QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix', 2.5  $\mu\text{L}$  de 10x 'miScript Universal Primer' y

2.5 µL de 10x 'miScript Primer Assay', todos reactivos de Qiagen. La reacción se realizó en el termociclador 'StepOne™ Real-Time PCR Systems' de Applied Biosystems (Life Technologies, California EUA). El programa utilizado consistió de 40 ciclos de 4 etapas (95° C, 15 min; 94° C, 15 segundos; 55° C, 30 segundos; 70° C, 30 segundos). Todos los ensayos fueron realizados por duplicado. El procesamiento de los datos crudos se llevo a cabo software 'StepOne® Software V2.1'. Como un estándar de calidad se busco que la desviación estándar entre las dos réplicas fuera menor a 2 Cts.

#### 4. 8. Análisis y manejo de datos

Los valores de Ct fueron obtenidos de acuerdo a los valores arrojados por el software configurado a analizar los datos para obtener la cuantificación relativa de los mismos. Las reacciones fallidas, réplicas con una desviación estándar mayor al valor de 2 Cts y reacciones con Cts iguales o mayores a 37 ciclos fueron descartadas del análisis.

En primer lugar los datos crudos obtenidos directamente por el software de la qPCR fueron sometidos a un análisis estadístico simple para evaluar la variabilidad entre réplicas y entre muestras de un mismo grupo. Posteriormente tuvieron que ser convertidos a la forma  $2^{Ct}$  [72], para obtener el "input data" necesario para el análisis con el algoritmo:

Normfinder (Department of Molecular Medicine MOMA, Aarhus University Hospital Dinamarca) [72]. Además también se analizaron los datos mediante el algoritmo GeNorm (Biogazelle, Ghent University Bélgica) [73], el cual no requiere de un tratamiento previo de los datos; y el método de la Delta Ct Comparativa [74].

Todos los algoritmos se obtuvieron de la herramienta basada en internet llamada "RefFinder" [97] de la Universidad de Carolina del Este (East Carolina University) con la dirección web:

<http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>.

Los resultados obtenidos por los algoritmos junto con los resultados obtenidos mediante el método de la Delta Ct Comparativa fueron contrastados entre ellos. La mejor referencia fue la que obtuvo los valores de estabilidad más bajo (menor variación entre individuos), tomando en consideración las limitaciones propias de cada método.

Además se realizó una validación de la elección de normalizador comparando los resultados obtenidos al normalizar los niveles de expresión del mir130a con los genes candidatos. Se utilizaron los métodos de normalización relativa  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [65] y la normalización por volumen [71]. En la normalización por volumen para determinar si los

valores obtenidos por los grupos eran significativamente diferentes al control se realizó el test-t **de comparación por parejas** (“**pairwise comparisons**”) con la **corrección de Bonferroni para ajustar el p-value**; y el análisis de comparación de múltiples medias de Tukey [71]. Los diagramas **del tipo “Cajas y bigotes”** y el análisis estadístico se llevaron **a cabo utilizando la herramienta “R”** [98].

Las demás gráficas y la mayor parte del análisis estadístico se realizó con la herramienta Office Excel® de Microsoft®.

**Simplifica la parte de “Análisis de datos”, parece análisis. Un diagrama de flujo que muestre tu metodología sería de mucha ayuda.**

## 5. Resultados

### 5. 1. Purificación de RNA

Tabla 7. Cuantificación de RNA total a partir de 200  $\mu$ L de suero (medición y réplica).

Clave	RNA total (ng/ $\mu$ L)	
1	6.1	6.26
2	5.62	5.57
3	6.62	6.58
4	6.41	6.08
5	5.37	5.54
6	5.8	6.1
7	4.76	4.85
8	6.26	6.71
9	7.63	7.52

### 5. 2. Transcripción reversa

Tabla 8. Cuantificación de cDNA obtenido a partir del RNA purificado (medición y réplica).

Clave	Cuantificación cDNA (ng/ $\mu$ L)		Promedio (ng/ $\mu$ L)
1	482.2	480.75	481.5
3	489.28	493.96	491.62
4	491.58	500.39	495.99
5	500.05	498.6	499.33
6	495.88	504.09	499.99
7	500.94	502.99	501.97
8	502.92	506.26	504.59
9	494.75	496.17	495.46

### 5. 3. Reacción en Cadena de la Polimerasa Cuantitativa (qPCR)

Tabla 9. Ct de SNORD61. Valores experimentales obtenidos mediante qPCR

Código	Ct raw 1	Ct raw 2	Ct diferencia réplicas	Promedio Ct raw	Desv. Est.
1	35.55	35.17	0.38	35.36	0.26870058
2	35.64	34.9	0.74	35.27	0.52325902
4	36.05	35.2	0.85	35.625	0.60104076
5	35.28	35.52	-0.24	35.4	0.16970563
6	36.27	35.91	0.36	36.09	0.25455844
7	35.94	36.69	-0.75	36.315	0.53033009
8	35.95	35.72	0.23	35.835	0.16263456
9	36.29	35.58	0.71	35.935	0.50204581
Desviación estándar promedio Ct raw				0.37669379	

Raw: Datos crudos obtenidos directamente del software 'StepOne® Software V2.1'. Des. Est= Desviación estándar entre réplicas.

Tabla 10. Ct de Let7g. Valores experimentales obtenidos mediante qPCR

Código	Ct raw 1	Ct raw 2	Ct diferencia réplicas	Promedio Ct raw	Desv. Est.
1	33.2	33.44	-0.24	33.32	0.16970563
2	35.96	36.68	-0.72	36.32	0.50911688
4	34.52	34.51	0.01	34.515	0.00707107
5	34.51	34.62	-0.11	34.565	0.07778175
6	33.52	33.96	-0.44	33.74	0.31112698
7	34.33	34.41	-0.08	34.37	0.05656854
8	33.78	34.55	-0.77	34.165	0.54447222
9	30.23	30.67	-0.44	30.45	0.31112698
Desviación estándar promedio Ct raw				1.65723401	

Raw: Datos crudos obtenidos directamente del software 'StepOne® Software V2.1'. Des. Est= Desviación estándar entre réplicas.

Tabla 11. Ct de RNU6-6P. Valores experimentales obtenidos mediante qPCR

Código	Ct raw 1	Ct raw 2	Ct diferencia réplicas	Promedio Ct raw	Desv. Est.
1	30.87	30.86	0.01	30.865	0.00707107
2	35.53	33.84	1.69	34.685	1.19501046
4	31.78	31.81	-0.03	31.795	0.0212132
5	33.29	33.01	0.28	33.15	0.1979899
6	34.23	34.99	-0.76	34.61	0.53740115
7	34.21	35.87	-1.66	35.04	1.17379726
8	34.77	34.92	-0.15	34.845	0.10606602
9	33.48	33.73	-0.25	33.605	0.1767767
Desviación estándar promedio Ct raw				1.54718509	

**Raw: Datos crudos obtenidos directamente del software 'StepOne® Software V2.1'.** Des. Est= Desviación estándar entre réplicas.

Para comprobar el poder normalizador de los genes candidatos, se obtuvieron los niveles de expresión del gen mir130a. De tal forma que la expresión del gen mir130a pueda ser referida de acuerdo a los distintos genes candidatos.

Tabla 12. Ct de mir130a. Valores experimentales obtenidos mediante qPCR

Código	Ct raw 1	Ct raw 2	Ct diferencia réplicas	Promedio Ct raw	Desv. Est.
1	31.79	30.8	0.99	31.295	0.70003571
2	30.94	30.28	0.66	30.61	0.46669048
4	32.91	31.91	1	32.41	0.70710678
5	30.15	30.35	-0.2	30.25	0.14142136
6	32.51	32.25	0.26	32.38	0.18384776
7	33.11	32.65	0.46	32.88	0.32526912
8	30.92	30.65	0.27	30.785	0.19091883
9	30.66	30.95	-0.29	30.805	0.20506097
Desviación estándar promedio Ct raw				0.98958843	

Raw: Datos crudos obtenidos directamente del software 'StepOne® Software V2.1'. Des. Est= Desviación estándar entre réplicas.

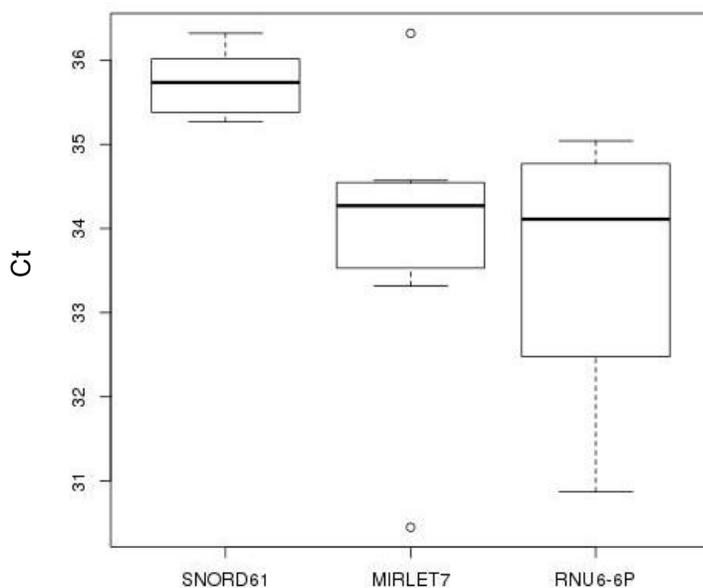


Figura 18. Variabilidad de los datos crudos (Ct) obtenidos para los tres genes candidatos (las cajas indican los rangos cuartiles (1°, 3°) y la mediana con una barra negra, los bigotes indican los rangos min-max [71]).

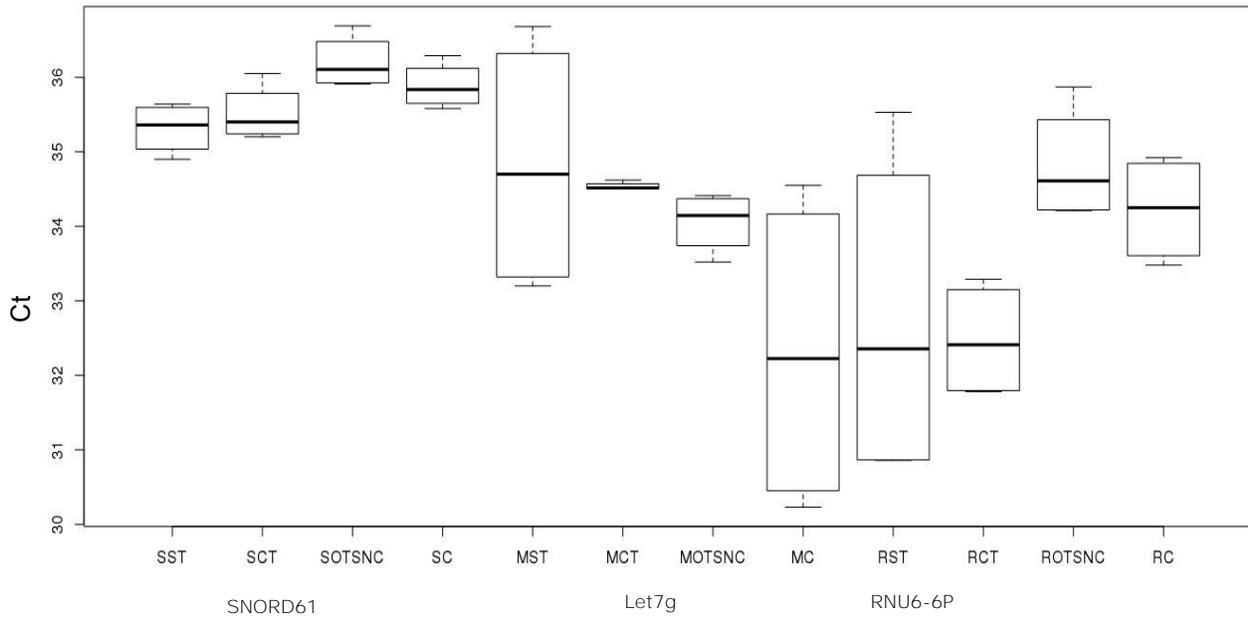


Figura 19. Variabilidad de los datos crudos (Cts) de las muestras por grupo (SST: SNORD61 sin tratamiento, SCT: SNORD61 con tratamiento, SOTSNC: SNORD61 otros tumores del sistema nervioso central, SC: SNORD61 control; MST: Let-7g sin tratamiento, MCT: Let-7g con tratamiento, MOTSNc: Let-7g otros tumores del sistema nervioso central, MC: Let-7g control; RST: RNU6-6P con tratamiento, RCT: RNU6-6P sin tratamiento, ROTSNC: RNU6-6P otros tumores del sistema nervioso central, RC: RNU6-6P Control).

#### 5. 4. Análisis y manejo de datos

Se determinó la variabilidad entre los valores obtenidos de cada muestra para cada gen candidato. Esta variabilidad fue determinada por medio de la diferencia de los valores experimentales obtenidos para cada gen con respecto a su mediana [99].

Tabla 13. Diferencia entre valores promedio de las réplicas y su mediana para SNORD61.

Código	Promedio Ct	Mediana	Mediana - promedio
1	35.36	35.73	0.37
2	35.27		0.46
4	35.625		0.105
5	35.4		0.33
6	36.09		-0.36
7	36.315		-0.585
8	35.835		-0.105
9	35.935		-0.205

Tabla 14. Diferencia entre valores promedio de las réplicas y su mediana para Let7g.

Código	Promedio Ct	Mediana	Mediana - promedio
1	33.32	34.2675	0.9475
2	36.32		-2.0525
4	34.515		-0.2475
5	34.565		-0.2975
6	33.74		0.5275
7	34.37		-0.1025
8	34.165		0.1025
9	30.45		3.8175

Tabla 15. Diferencia entre los valores promedio de las réplicas y su mediana para RNU6-6P.

Código	Promedio Ct	Mediana	Mediana - promedio
1	30.865	34.1075	3.2425
2	34.685		-0.5775
4	31.795		2.3125
5	33.15		0.9575
6	34.61		-0.5025
7	35.04		-0.9325
8	34.845		-0.7375
9	33.605		0.5025

Debido a que la mediana representa el valor central de los distintos conjuntos de datos para cada gen, la diferencia de esta con respecto a los valores obtenidos se puede tomar como una medida de la estabilidad de un determinado gen; como se muestra en la Figura 18.

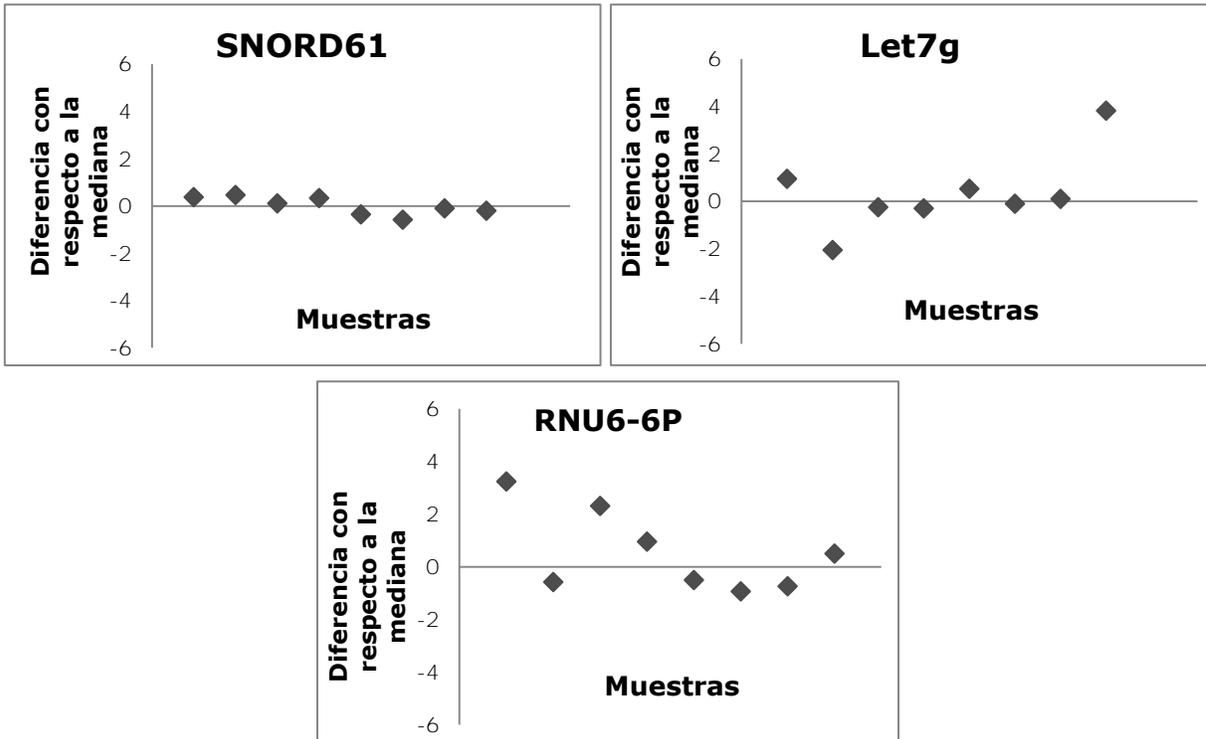


Figura 20. Nivel de variabilidad entre genes candidatos.

#### 5. 4. 1. NormFinder

Los datos se ordenaron colocando el código en la primera fila y los genes candidatos en la primera columna (Tabla 16). El "input" se conforma por los promedios de los datos crudos. Estos deben de ser transformados a la forma:  $2^{Ct}$  (Tabla 17) [72].

Tabla 16. Disposición de los datos para su análisis por medio del algoritmo NormFinder.

Código	1	2	4	5
SNORD61	35.36	35.27	35.63	35.40
Let7g	33.32	36.32	34.52	34.57
RNU6-6P	30.87	34.69	31.80	33.15
grupo	1.00	1.00	2.00	2.00
	Ast sin tratamiento		Ast con tratamiento	
Código	6	7	8	9
SNORD61	36.09	36.32	35.84	35.94
Let7g	33.74	34.37	34.17	30.45
RNU6-6P	34.61	35.04	34.85	33.61
grupo	3.00	3.00	4.00	4.00
	Otros tumores SNC		Control	

(SNC: sistema nervioso central).

Tabla 17. Transformación de los datos (Ct's) a la forma  $2^{Ct}$  para convertirlos en un "input" valido para el algoritmo.

Muestras	1	2	4	5
SNORD61	44098178054.98	41431241481.54	52989960469.31	45337946588.66
Let7g	10723077764.26	85784622114.08	24549932385.45	25415683881.34
RNU6-6P	1955648576.37	27620109728.79	3726050289.33	9531129190.34
Grupo	1.00	1.00	2.00	2.00
	Ast sin tratamiento		Ast con tratamiento	
Muestras	6	7	8	9
SNORD61	73142961991.60	85487829868.16	61292861140.46	65692062013.27
Let7g	14346701212.92	22202452569.92	19261486554.07	1466774556.94
RNU6-6P	26220933550.82	35325722096.43	30859593352.12	13065108006.16
Grupo	3.00	3.00	4.00	4.00
	Otros tumores de SNC		Control	

(SNC: sistema nervioso central).

Al aplicarse el algoritmo se observó que el gen más estable es: SNORD61, con un valor de estabilidad de 0.698 (Tabla 18). Con la alternativa de usar la combinación de Let-7g y RNU6-6P como normalizadores, ya que en compañía poseen un valor de estabilidad de 0.606.

Tabla 18. Resultados obtenidos por el Algoritmo NormFinder, los genes más estables presentan valores de estabilidad más bajos.

Gen Candidato	Valor de estabilidad
SNORD61	0.698
RNU6-6P	0.758
Let7g	0.802

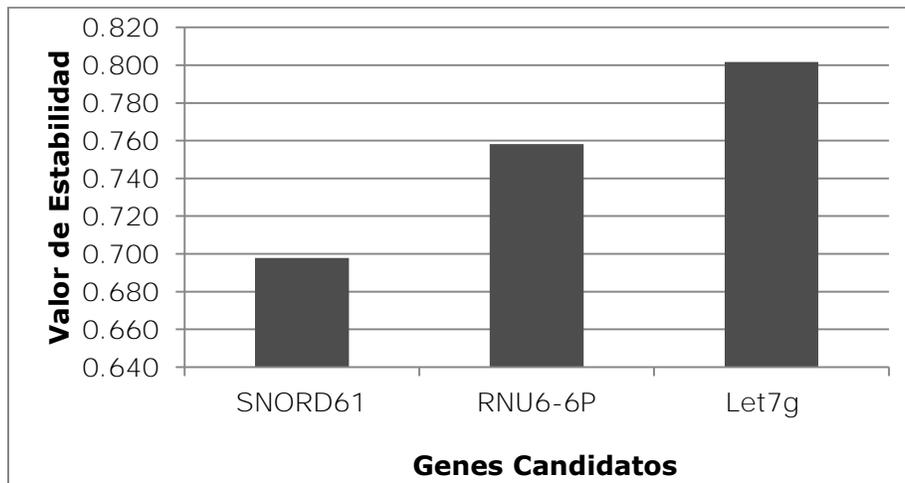


Figura 21. Comparación de los valores de estabilidad obtenidos para los distintos genes candidatos.

#### 5. 4. 2. GeNorm

El algoritmo GeNorm se especializa en encontrar genes normalizadores que cuando se utilizan en conjunto mejoran su estabilidad [73]. En este caso, la combinación de SNORD61 y RNU6-6P, fue la adecuada para fungir como normalizador ideal (Tabla 18).

Tabla 19. Valores de estabilidad de los genes candidatos, los genes con valores de estabilidad más bajos son más estables.

Gen	Valor de estabilidad
SNORD61   RNU6-6P	1.381
Let7g	1.747

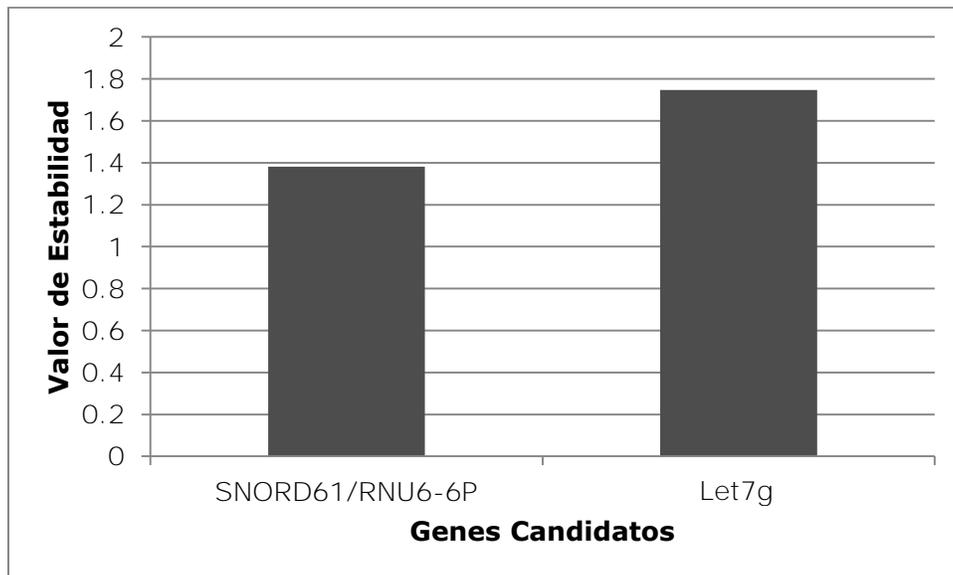


Figura 22. Comparación de los valores de estabilidad obtenidos para la combinación de SNORD61/RNU6-6P y Let7g.

#### 5. 4. 3. Análisis delta comparativa ( $\Delta Ct$ )

El análisis de la delta comparativa se especializa en determinar la estabilidad de genes candidatos que se encuentran en bajos niveles de expresión [74].

Tabla 20. Pareja SNORD61 vs Let7g

SNORD61	Let7g	Delta Ct	Desv. Est.
35.36	33.32	2.04	
35.27	36.32	1.05	
35.625	34.515	1.11	
35.4	34.565	0.835	
36.09	33.74	2.35	
36.315	34.37	1.945	
35.835	34.165	1.67	
35.935	30.45	5.485	
Promedio $\Delta$ Ct		1.798	1.833

(Desv Est: Desviación estándar).

Tabla 21. Pareja SNORD61 vs RNU6-6P

SNORD61	RNU6-6P	Delta Ct	Desv. Est.
35.36	30.865	4.495	
35.27	34.685	0.585	
35.625	31.795	3.83	
35.4	33.15	2.25	
36.09	34.61	1.48	
36.315	35.04	1.275	
35.835	34.845	0.99	
35.935	33.605	2.33	
Promedio $\Delta$ Ct		2.154	1.382

(Desv Est: Desviación estándar).

Tabla 22. Pareja RNU6-6P vs Let7g

RNU6-6P	Let7g	Delta Ct	Desv. Est.
30.865	33.32	2.455	
34.685	36.32	1.635	
31.795	34.515	2.72	
33.15	34.565	1.415	
34.61	33.74	0.87	
35.04	34.37	0.67	
34.845	34.165	0.68	
33.605	30.45	3.155	
Promedio $\Delta$ Ct		0.356	2.025

(Desv Est: Desviación estándar).

Tabla 23. Pareja RNU6-6P vs SNORD61

RNU6-6P	SNORD61	Delta Ct	Desv. Est.
30.865	35.36	4.495	
34.685	35.27	0.585	
31.795	35.625	3.83	
33.15	35.4	2.25	
34.61	36.09	1.48	
35.04	36.315	1.275	
34.845	35.835	0.99	
33.605	35.935	2.33	
Promedio $\Delta$ Ct		2.154	1.382

(Desv Est: Desviación estándar).

Tabla 24. Pareja Let7g vs SNORD61

Let7g	SNORD61	Delta Ct	Desv. Est.
33.32	35.36	2.04	
36.32	35.27	1.05	
34.515	35.625	1.11	
34.565	35.4	0.835	
33.74	36.09	2.35	
34.37	36.315	1.945	
34.165	35.835	1.67	
30.45	35.935	5.485	
Promedio $\Delta$ Ct		1.798	1.833

(Desv Est: Desviación estándar).

Tabla 25. Pareja Let7g vs RNU6-6P

Let7g	RNU6-6P	Delta Ct	Desv. Est.
33.32	30.865	2.455	
36.32	34.685	1.635	
34.515	31.795	2.72	
34.565	33.15	1.415	
33.74	34.61	0.87	
34.37	35.04	0.67	
34.165	34.845	0.68	
30.45	33.605	3.155	
Promedio $\Delta$ Ct		0.356	2.025

(Desv Est: Desviación estándar).

Tabla 26. Análisis de variabilidad de los candidatos

Gen	Delta Ct promedio	Desv. Est.	Desv. Est. promedio
SNORD61	2.154	1.382	1.6075
	1.798	1.833	
Let7g	0.356	2.025	1.929
	1.798	1.833	
RNU6-6P	2.154	1.382	1.7035
	0.356	2.025	

(Desv Est: Desviación estándar).

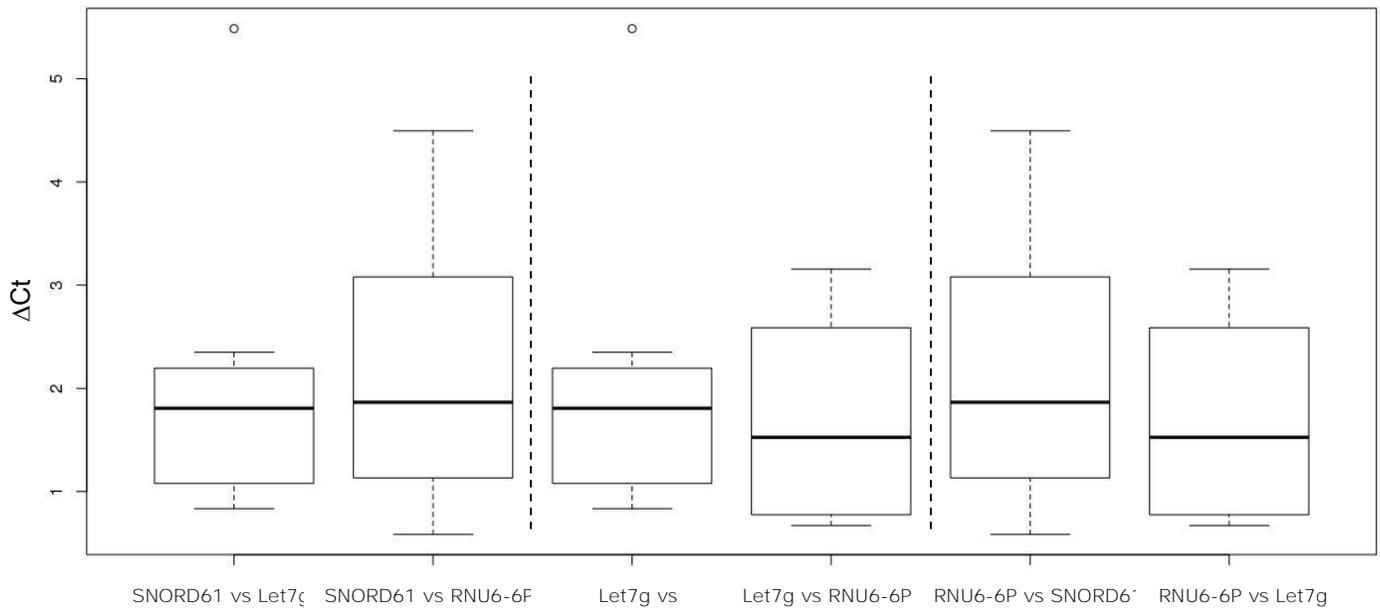


Figura 23. Variabilidad entre las parejas de genes (datos crudos).

#### 5. 4. 4. Validación

##### 5. 4. 4. 1. Normalización $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Aplicando la Ecuación 3 y posteriormente a la Ecuación 6, a los datos obtenidos para los genes candidatos y el mir130a, se obtuvieron los siguientes resultados:

Tabla 27. Promedio de los valores crudos pertenecientes a los controles por cada gen candidato y el gen a normalizar (mir130a).

	Controles		promedio controles
	8	9	
SNORD61	35.84	35.94	35.885
Let7g*	34.17	30.45	32.3075
RNU6-6P	34.85	33.61	34.225
mir130a	30.79	30.81	30.80

Tabla 28. Tratamiento de resultados obtenidos para el gen a normalizar: mir130a.

Código	Ct raw	$\Delta Ct$
1	31.295	0.5
2	30.61	-0.185
4	32.41	1.615
5	30.25	-0.545
6	32.38	1.585
7	32.88	2.085

Tabla 29. Tratamiento de resultados obtenidos para el gen candidato SNORD61.

Código	Ct raw	$\Delta Ct$	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
1	35.36	-0.53	-1.025	2.03495938
2	35.27	-0.62	-0.43	1.34723358
4	35.63	-0.26	-1.875	3.66801617
5	35.40	-0.49	0.06	-1.04246576
6	36.09	0.20	-1.38	2.60268371
7	36.32	0.43	-1.655	3.14923191

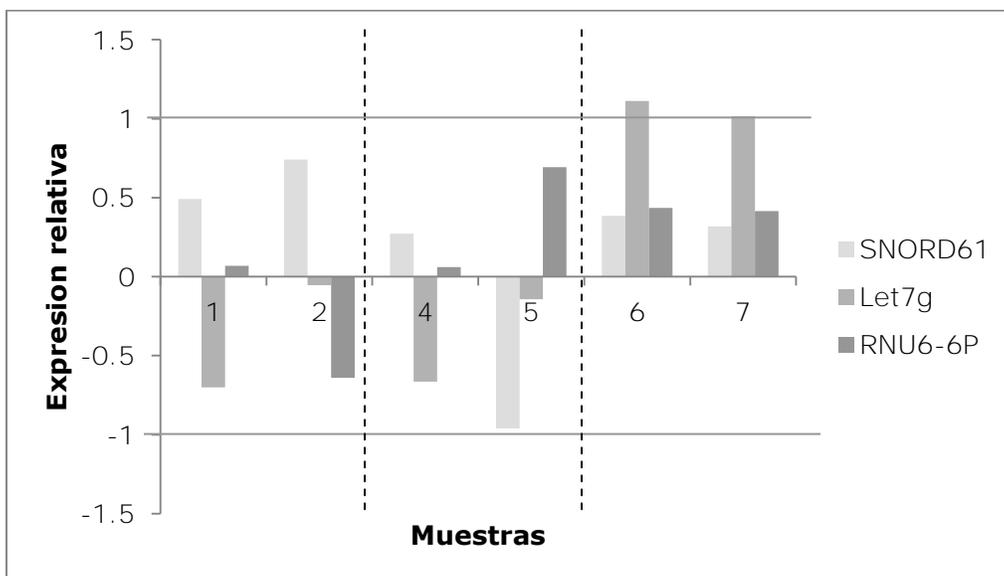
Tabla 30. Tratamiento de resultados obtenidos para el gen candidato Let-7g.

Código	Ct raw	$\Delta Ct$	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
1	33.32	1.01	0.5125	-0.70100663
2	36.32	4.01	4.1975	-0.05450378
4	34.52	2.21	0.5925	-0.66319269
5	34.57	2.26	2.8025	-0.14333869
6	33.74	1.43	-0.1525	1.11149388
7	34.37	2.06	-0.0225	1.01571806

Tabla 31. Tratamiento de resultados obtenidos para el gen candidato RNU6-6P.

Código	Ct raw	$\Delta Ct$	$-\Delta\Delta Ct$	$2^{-(\Delta\Delta Ct)}$
1	30.87	-3.36	-3.86	0.06886907
2	34.69	0.46	0.645	-0.63949279
4	31.80	-2.43	-4.045	0.06058061
5	33.15	-1.08	-0.53	0.69255473
6	34.61	0.39	-1.2	0.43527528
7	35.04	0.82	-1.27	0.41465977

Figura 24. Diferencia en la normalización de mir130a (1-2: Ast sin tratamiento, 4-5: Ast con tratamiento, 6-7: otros tumores del sistema nervioso central).



#### 5. 4. 4. 2. Normalización por volumen y $\Delta Ct$

Aplicando la Ecuación 10 a los datos experimentales se obtuvieron los siguientes valores de  $\Delta Ct$  [71]:

Tabla 32. Análisis  $\Delta Ct$  para mir130a siendo normalizado con SNORD61.

CODIGO	SNORD61	mir130a	$-\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct}$
1	35.17	31.295	4.065	0.06026546
2	34.9	30.61	4.66	0.04086288
4	35.2	32.41	3.215	0.11240007
5	35.52	30.25	5.15	0.02826156
6	35.91	32.38	3.71	0.07701055
7	36.69	32.88	3.435	0.09560287
8	35.72	30.785	5.05	0.03028146
9	35.58	30.805	5.13	0.02942616

Tabla 33. Análisis  $\Delta Ct$  para mir130a siendo normalizado con Let-7g.

CODIGO	Let-7g	mir130a	$-\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct}$
1	33.44	31.295	2.025	-0.2465556
2	36.68	30.61	5.71	-
4	34.51	32.41	2.105	0.23245263
5	34.62	30.25	4.315	-0.0502772
6	33.96	32.38	1.36	-
7	34.41	32.88	1.49	0.39412073
8	34.55	30.785	3.38	-0.3561494
9	30.67	30.805	-0.355	0.09949532

Tabla 34. Análisis  $\Delta Ct$  para mir130a siendo normalizado con RNU6-6P.

CODIGO	RNU6-6P	mir130a	$-\Delta Ct$	$2^{-\Delta Ct}$
1	30.86	31.295	-0.43	0.74226624
2	33.84	30.61	4.075	-0.06980559
4	31.81	32.41	-0.615	0.65296519
5	33.01	30.25	2.9	-0.13460298
6	34.99	32.38	2.23	-0.22059577
7	35.87	32.88	2.16	-0.26181884
8	34.92	30.785	4.06	-0.06003504
9	33.73	30.805	2.8	-0.14412659

Para realizar la normalización por volumen se aplicó la Ecuación 8 a los datos experimentales obteniéndose los siguientes resultados:

Tabla 35. Promedio de todos los valores crudos para mir134a.

Gen	Promedio de todas las muestras
mir130a	31.43

Tabla 36. Tratamiento de resultados para la normalización del mir130a.

Código	mir130a	Ct promedio	- $\Delta$ Ct	$2^{-\Delta$ Ct}
1	31.295	31.43	0.13	-0.91264456
2	30.61		0.82	-0.56767023
4	32.41		-0.98	1.97674257
5	30.25		1.18	-0.44230854
6	32.38		-0.95	1.93606179
7	32.88		-1.45	2.73800485
8	30.785		0.64	-0.64087949
9	30.805		0.62	-0.64982583

Tabla 37. Análisis por parejas (prueba-t) para resultados de normalización por SNORD61 (p-value)

	C	CT	OTSNC
CT	0.55	-	-
OTSNC	0.15	1.00	-
ST	1.00	1.00	0.79

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 38. Análisis por parejas (prueba-t) para resultados de normalización por Let-7g (p-value)

	C	CT	OTSNC
CT	0.170	-	-
OTSNC	0.019	1.00	-
ST	0.184	1.00	1.00

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 39. Análisis por parejas (prueba-t) para resultados de normalización por RNU6-6P (p-value)

	C	CT	OTSNC
CT	0.91	-	-
OTSNC	1.00	0.33	-
ST	0.53	1.00	0.18

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 40. Análisis por parejas (prueba-t) para resultados de normalización por volumen (p-value)

	C	CT	OTSNC
CT	0.405	-	-
OTSNC	0.045	1.00	-
ST	1.00	1.00	0.402

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 41. Análisis de múltiples comparaciones de la media de Tukey para resultados de normalización por SNORD61 (p-value)

	p-value
CT vs C	0.3055089
OTSNC vs C	0.1005042
ST vs C	0.7854517

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 42. Análisis de múltiples comparaciones de la media de Tukey para resultados de normalización por Let-7g (p-value)

	p-value
CT vs C	0.1119705
OTSNC vs C	0.0142521
ST vs C	0.1199547

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 43. Análisis de múltiples comparaciones de la media de Tukey para resultados de normalización por RNU6-6P (p-value)

	p-value
CT vs C	0.4502291
OTSNC vs C	0.9332499
ST vs C	0.2952668

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

Tabla 44. Análisis de múltiples comparaciones de la media de Tukey para resultados de normalización por volumen (p-value)

	p-value
CT vs C	0.2376782
OTSNC vs C	0.0332282
ST vs C	0.6442698

(C: control, ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central).

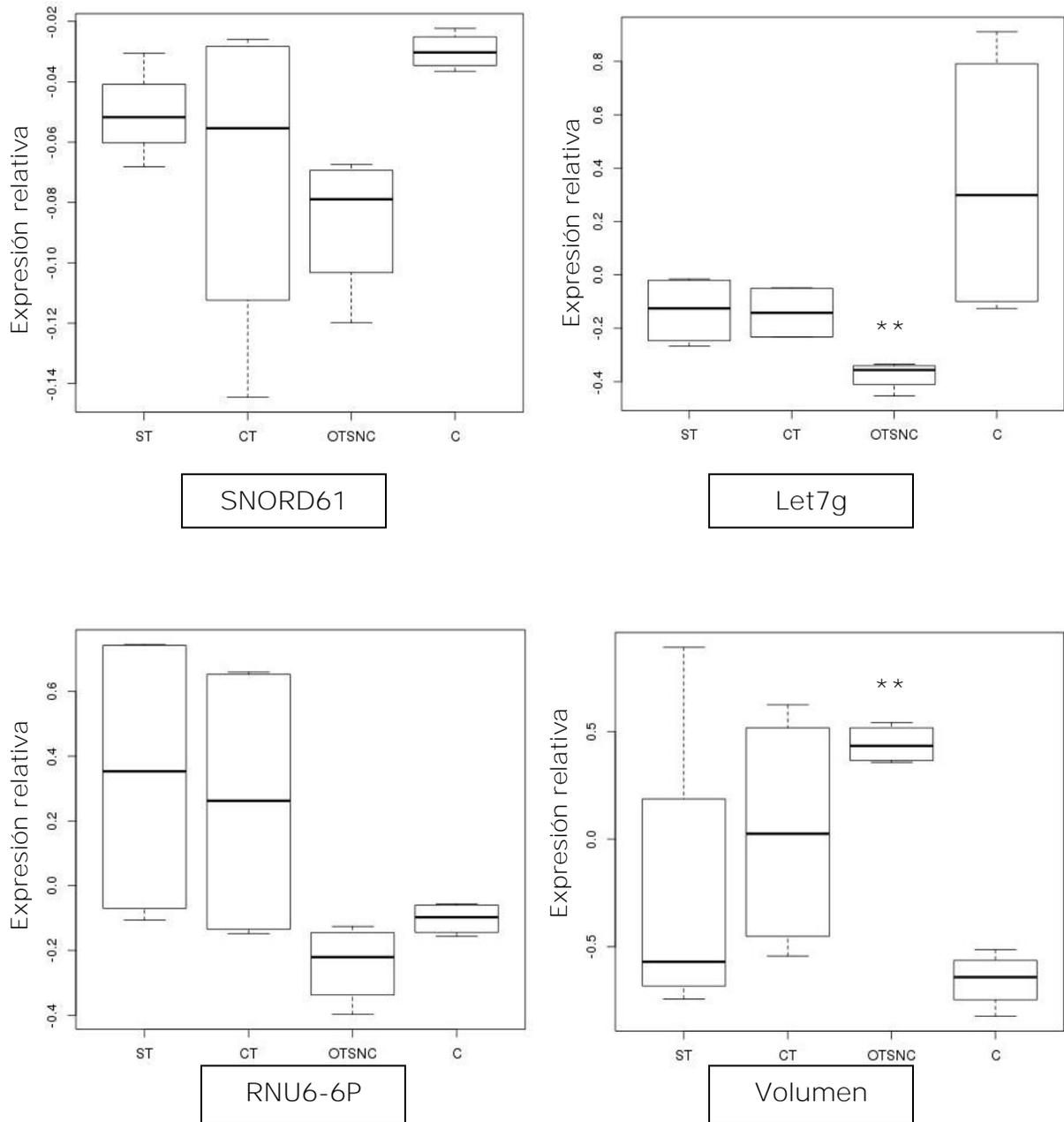


Figura 25. Comparación de la normalización de mir130a por volumen y  $\Delta Ct$  (ST: sin tratamiento, CT: con tratamiento, OTSNC: otros tumores del sistema nervioso central, C: control, \*\*: diferencia significativa con respecto al control p-value <0.05, (valores crudos).

## **6. Discusión**

La diferencia entre réplicas representa la variación intra-ensayo; como se puede observar en las Tablas 9-11 esta variación es baja para SNORD61, y aceptable para Let-7g y RNU6-6P [100]. Esto se ve reflejado en que SNORD61 presenta una variación menor en sus valores crudos promedio.

En la Figura 18 Se puede observar que las medianas de los grupos de datos pertenecientes a RNU6-6P y Let-7g son muy similares, además de que sus datos siguen una distribución parecida. En cambio, el grupo de datos de SNORD61 se presenta en una cantidad más escasa en las muestras, ya que sus valores de Ct son más elevados. Sin embargo, como se observa en la Figura 19 los datos pertenecientes a SNORD61 poseen una distribución más uniforme comparadas con las altas variaciones presentes en Let-7g y RNU6-6P.

Para profundizar en este análisis, se determinó el valor de la mediana correspondiente a cada gen. En la Figura 20 se muestra la diferencia de los valores crudos y la mediana como representación de la variación de los niveles de expresión, suponiendo que estos deberían de ser lo más constantes o parecidos entre ellos (ceranos a la mediana) [99]. Así mismo, se puede observar que Let-7g y RNU6-6P presentan variaciones

similares y apreciablemente mayores que la presentada por SNORD61 (obteniendo resultados similares a los observados en la Figura19).

Para identificar al gen que tiene la mejor posibilidad de fungir como control endógeno fue necesario realizar un análisis estadístico complejo con la ayuda de algoritmos matemáticos especialmente diseñados para este fin.

El algoritmo BestKeeper (Gene-Quantification, Alemania) [70] tuvo que ser descartado de la metodología debido a que como se menciona en la introducción pierde su validez al trabajar con niveles de expresión bajos (Cts mayores a 30-35), y los valores de expresión de los genes candidatos se encontraron dentro de ese rango.

El algoritmo NormFinder indicó que SNORD61 es el gen más estable entre los candidatos propuestos, con un valor de estabilidad de 0.698 (Tabla 18). Esto indica que SNORD61 es el gen que menos variable entre los cuatro grupos de estudio y entre los genes candidatos, de acuerdo al planteamiento enfocado a grupos de NormFinder [72].

De igual forma, el algoritmo indicó que la combinación de Let-7g y RNU6-6P podría ser una buena alternativa como normalizador, ya que en conjunto, estos presentarían un valor de estabilidad de 0.606 (es

necesario considerar que en este caso en particular, el algoritmo no está especialmente diseñado para realizar el análisis de cuál es la pareja de normalizadores más estable) [72]. En la Figura 21 se puede observar el orden de estabilidad de los genes según este algoritmo, los cuales serían, en orden del más estable al menos estable: SNORD61, RNU6-6P y Let-7g.

El algoritmo GeNorm está especialmente diseñado para identificar parejas de genes que al ser utilizados en paralelo tiene la posibilidad de actuar como un normalizador más robusto y estable [73]. Para los genes candidatos de este estudio el menor valor de estabilidad fue obtenido por la combinación de SNORD61 y RNU6-6P (Tabla 18).

La Figura 22 indica que la pareja que forman SNORD61/RNU6-6P es un normalizador más estable que Let-7g por sí solo. En este caso, se debe considerar la limitación del algoritmo al contar con solo tres opciones para formar parejas [73], sin embargo, tanto este algoritmo como NormFinder indican que SNORD61 es el gen más estable.

El análisis de la delta comparativa fue diseñado especialmente para trabajarse en muestras en donde los genes de interés presentan bajos niveles de expresión [74]; debido a que las muestras trabajadas demostraron ser de este tipo (Cts 30-36, Figura 19), este análisis fue de

gran importancia para corroborar los resultados obtenidos por los algoritmos.

Ya que este análisis se fundamenta en la variabilidad que se presenta por parejas, se formaron las distintas combinaciones posibles entre genes candidatos para ser analizadas (Tabla 20-25). Tal que, en la Tabla 26 se observan los valores de  $\Delta Ct$  obtenidos por las parejas de genes, así como la desviación estándar que presentaron los mismos.

Dado que este análisis no se basa en los valores de la  $\Delta Ct$  si no en que tanta variabilidad presentan estos datos [74], el indicador de la estabilidad de los genes es el promedio de sus desviaciones estándar. Acorde a los resultados anteriores, SNORD61 presentó el menor valor de desviación estándar promedio (1.6075, Tabla 26 o Figura 23), indicando que es el más estable de los candidatos.

Aunque los métodos para analizar la estabilidad de un normalizador han señalado a SNORD61 como el gen más estable, se llevaron a cabo dos métodos de normalización para poner a prueba el impacto del gen normalizador en la cuantificación relativa.

El método de normalización  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  permite visualizar la medida relativa de la expresión de un gen [65]. En la Figura 24 se puede observar que

como era de esperarse los valores varían de acuerdo al gen que se utilice para su normalización. Aunque casi ninguno de estos valores pudo superar una vez la propia expresión presentada por el mir130a. Lo cual indica que no hay una expresión diferencial entre el gen problema y los normalizadores.

En los grupos de pacientes con astrocitoma (con tratamiento y sin tratamiento), los valores de expresión relativa presentados por todos los genes candidatos son erráticos, hasta con SNORD61 (el que fue determinado como el candidato más estable). La falta de homogeneidad de la expresión por grupos implica que no hay una expresión diferencial la cual pueda asociarse al pronóstico del paciente, reduciendo el posible valor diagnóstico de mir130a.

Sin embargo, esto puede estar relacionado con el bajo número de muestras por grupo. Por otro lado, el grupo de pacientes con otros tumores del sistema nervioso central presentaron niveles de expresión relativamente constantes (siguiendo la misma tendencia) con todos los candidatos. Posiblemente, la tendencia de los resultados podría mejorar aumentando el número de muestras. De manera exploratoria este ensayo parece indicar que el gen mir130a no está expresado diferencialmente de una manera importante con respecto a los

controles, independientemente del gen con el cual se realice la normalización.

La normalización por volumen requirió de un análisis adicional, utilizando el análisis de normalización  $\Delta\text{Ct}$  descrito por Song, J y cols. (2011) en ambos se resta a los valores crudos de expresión el valor de expresión de un gen normalizador o el promedio de la expresión de todas las muestras (volumen) [71]. La normalización por volumen toma en consideración que todos los miRNAs fueron obtenidos de la misma cantidad de suero, por lo que en teoría deberían poder ser normalizados de acuerdo al promedio de los niveles de expresión del mismo gen [71].

Por lo tanto se realizó el tratamiento de los datos normalizando con respecto a los genes candidatos y con respecto al promedio de la expresión del mir130a. El análisis por parejas (prueba-t) y el análisis de múltiples comparaciones de las medias de Tukey (Tablas 37-44) muestran resultados similares y acordando que en la mayoría de los casos no había una diferencia significativa con respecto al control, como se observó en el análisis  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ , **solo la muestras 6 y 7 u "otros tumores del sistema nervioso central" fueron significativamente distintas al control al normalizar con el gen Let-7g.**

La normalización por volumen obtuvo los mismos resultados que la normalización utilizando a Let-7g. Aunque el análisis inicial demostró que Let-7g es inestable comparado con SNORD61 (por lo que los resultados obtenidos al utilizar este gen como normalizador tienen un mayor grado de error); el hecho de que haya compartido el mismo resultado que la normalización en volumen pone en evidencia la falta de robustez de dicho método. Ya en otros análisis se han demostrado las desventajas de utilizar este método [71], y este análisis, aunque exploratorio, no fue la excepción.

## 7. Conclusiones

Mediante la metodología utilizada fue posible purificar y cuantificar las especies de miRNA seleccionadas de manera específica. Obteniendo datos útiles que permitieron realizar un análisis de la estabilidad de los genes candidatos a normalizador, y el efecto del mismo en la cuantificación de un miRNA de interés.

SNORD61 se puede considerar como el normalizador óptimo para el grupo de datos de este estudio, metodología experimental y tratamiento en específico.

De acuerdo al análisis con los algoritmos GeNorm, NormFinder y el método delta Ct comparativa, SNORD61 presenta una mayor estabilidad con respecto a los otros genes candidatos (Let7g y RNU6-6P).

SNORD61 presentó los valores de estabilidad más bajos mediante su análisis con los algoritmos NormFinder, GeNorm y el método de la delta Ct comparativa. Debido a que los valores de estabilidad son inversamente proporcionales a la estabilidad del gen se puede concluir que su estabilidad es mayor en comparación con los otros genes candidatos.

Así mismo en la evaluación de los genes candidatos en la normalización del mir130a, se determinó que no existe una diferencia significativa de su expresión con respecto al control. Aún así hay que considerar que este como trabajo exploratorio tiene sus limitaciones y el comportamiento de los genes podría modificarse al aumentar el número de muestras; aunque según los resultados obtenidos esto parece ser poco probable.

Genes con una estabilidad baja pueden dar valores que no reflejan el estado del sistema, de ahí la importancia del análisis de estabilidad para determinar al gen con respecto al cual se determinara la expresión relativa.

Como trabajo exploratorio puede considerarse que este análisis cumplió su función analizando la estabilidad de los genes candidatos más probables a fungir como normalizadores, demostrando las diferencias que se pueden presentar si no se hace una elección cuidadosa de este gen.

## 8. Perspectivas

Debido a que la estabilidad de los genes es un parámetro relativo, puede modificarse si se amplía la selección de genes candidatos. Ampliar el número de muestras por grupo y de genes candidatos permitirá corroborar si es que el gen SNORD61 es el adecuado para la población de estudio, al proveer una mayor robustez estadística.

Una vez que se haya determinado al normalizador óptimo será posible validar en suero la expresión de los genes que Ruiz-Esparza, y cols. (2013) encontraron que poseían expresión diferencial en pacientes con Ast con respecto al control de tejido con gliosis. Si los genes mantuvieran el mismo patrón de expresión entre pacientes y controles , estos podrían ser utilizados como biomarcadores no invasivos para la detección temprana de Ast.

## 9. Bibliografía

- [1] A. G. Brown, «Nerve Cells and Nervous Systems,» de *The Nervous System and Communication*, Segunda edición ed., Singapur, Springer, 2001, p. 2.
- [2] V. Parpura y A. Verkhratsky, «Neuroglia at the crossroads of homeostasis, metabolism and signalling: evolution of the concept,» *ASN Neuro*, vol. 4, pp. 201-205, 2012.
- [3] A. J. Pereira y F. A. Furlan, «Astrocytes and human cognition: Modelling information integration and modulation of neuronal activity,» *Progress in Neurobiology*, vol. 92, pp. 405-420, 2010.
- [4] Y. Ota, A. T. Zanetti y R. M. Hallock, «The Role of Astrocytes in the Regulation of Synaptic Plasticity and Memory Formation,» *Neural Plasticity*, vol. 2013, p. 11 pages, 2013.
- [5] A. Volterra y J. Meldolesi, «Astrocytes, from Brain Glue to Communication Elements: The Revolution Continues,» *Nature*, vol. 6, pp. 626-640, 2005.
- [6] D. A. Walker, J. Liu, M. Kieran, N. Jabado, S. Picton, R. Packer y C. St. Rose, «A multi-disciplinary consensus statement concerning surgical approaches to low-grade, high-grade astrocytomas and diffuse intrinsic pontine gliomas in childhood (CPN Paris 2011) using the Delphi method,» *Neuro-Oncology*, vol. 15, n° 4, pp. 462-468, 2013.
- [7] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvett, B. W. Scheithauer and P. Kleihues, "The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System," *Acta Neuropathologica*, vol. 2, no. 114, p. 97-109, 2007.
- [8] K. J. Züch, Ed., Histological typing of tumours of the central nervous system, Geneva: World Health Organization, 1979.
- [9] P. Kleihues, P. C. Burger y B. W. Scheithauer, Edits., Histological typing of tumours of the central nervous system, Heidelberg: World Health

Organization international histological classification of tumours. Springer, 1993.

- [10] P. Kleihues y W. K. Cavenee, Edits., World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics of tumours of the nervous system, Lyon: IARC Press, 2000.
- [11] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler y W. k. Cavenee, Edits., WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, Cuarta edición ed., Lyon: IARC Press, 2007.
- [12] P. Kleihues, P. C. Burger y B. W. Scheithauer, Edits.«The new WHO classification of brain tumours,» *Brain Pathology*, vol. 3, pp. 255-268, 1993.
- [13] J. Ringertz, «Grading of gliomas,» *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, vol. 27, pp. 51-64, 1950.
- [14] C. Daumas-Duport, B. Scheithauer, J. O'Fallon y P. Kelly, «Grading of Astrocytomas A Simple and Reproducible Method,» *Cancer*, vol. 62, n° 10, pp. 2152-2165, 1988.
- [15] International Classification of Diseases for Oncology, Primera edición ed., Geneva: World Health Organization, 1976.
- [16] C. Percy, V. Van Holten y C. Muir, Edits., International Classification of Diseases for Oncology, Segunda edición ed., Geneva: World Health Organization, 1990.
- [17] A. Fritz, C. Percy, A. Jack, K. Shanmugaratnam, L. Sobin, D. M. Parkin y S. Whelan, Edits., International classification of diseases for oncology (ICD-O), Tercera edición ed., Malta: World Health Organization, 2013.
- [18] B. W. Scheithauer, C. Hawkins, T. Tihan, S. R. VandenBerg y P. C. Burger, «Pilocytic astrocitoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 14-20.
- [19] B. W. Scheithauer, C. Hawkins, T. Tihan, S. R. VandenBerg y P. C. Burger, «Pilomyxoid astrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of*

*the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 20-21.

- [20] C. Giannini, W. Paulus, D. N. Louis y P. Liberski, «Pleomorphic xanthoastrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 22-24.
- [21] U. Hjalmar, M. Kulldorff, Y. Wahlqvist y B. Lannering, «Increased incidence rates but no space-time clustering of childhood astrocytoma in Sweden,» *Cancer*, vol. 85, pp. 2077-2090, 1999.
- [22] A. R. Swensen y S. A. Bushhouse, «Childhood cancer incidence and trends in Minnesota, 1988-1994,» *Minnesota Medicine*, vol. 81, pp. 27-32, 1998.
- [23] A. von Deimling, P. C. Burger, Y. Nakazato, H. Ohgaki y P. Kleihues, «Diffuse astrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 25-27.
- [24] A. von Deimling, P. C. Burger, Y. Nakazato, H. Ohgaki y P. Kleihues, «Fibrillary astrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, p. 27.
- [25] K. Watanabe, A. Peraud, C. Gratas, S. Wakai, P. Kleihues y H. Ohgaki, «p53 and PTEN gene mutations in gemistocytic astrocytomas,» *Acta Neuropathologica*, vol. 95, pp. 559-564, 1998.
- [26] A. von Deimling, P. C. Burger, Y. Nakazato, H. Ohgaki y P. Kleihues, «Gemistocytic astrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 27-28.
- [27] A. von Deimling, P. C. Burger, Y. Nakazato, H. Ohgaki y P. Kleihues, «Protoplasmic astrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 28-29.

- [28] P. Kleihues, P. C. Burger, M. K. Rosenblum, W. Paulus y B. W. Scheithauer, «Anaplastic astrocytoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 30-32.
- [29] P. Kleihues, P. C. Burger, K. D. Aldape, D. J. Brat, W. Biernat, D. D. Bigner, Y. Nakazato, K. H. Plate, F. Giangaspero, A. von Deimling, H. Ohgaki y W. K. Cavenee, «Glioblastoma,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 33-49.
- [30] G. N. Fuller y J. M. Kros, «Gliomatosis cerebri,» de *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*, Lyon, International Agency for Research on Cancer, 2007, pp. 50-51.
- [31] V. Ambros, R. C. Lee, A. Lavanway, P. T. Williams y D. Jewel, «MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*,» *Current Biology*, vol. 13, pp. 807-818, 2003.
- [32] k. Vincent, M. Pichler, G. W. Lee y H. Ling, «MicroRNAs, Genomic Instability and Cancer,» *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 15, n° 8, pp. 14475-14491, 2014.
- [33] X. Chen, Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, Y. Zhang, J. Wang, J. Xueyuan, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, S. Xiaobin, T. Gong, G. Ning, J. Wang, K. Zen, J. Zhang y C.-Y. Zhang, «Characterization of microRNAs in Serum: a Novel Class of Biomarkers for Diagnosis of Cancer and other Diseases,» *Cell Research*, vol. 18, pp. 997-1006, 2008.
- [34] E. Huntzinger y E. Izaurralde, «Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay,» *Nature Reviews Genetics*, vol. 12, pp. 99-110, 2011.
- [35] M. A. Saunders, «Human polymorphism at microRNAs and microRNA target site,» *PNAS*, vol. 104, n° 9, pp. 3300-3305, 2007.
- [36] M. Lagos-Quintana, R. Rauhut, W. Lendeckel y T. Tuschl, «Identification of novel genes coding for small expressed RNAs,» *Science*, vol. 294, pp.

853-858, 2001.

- [37] N. C. Lau, L. P. Lim, E. G. Weinstein y D. P. Bartel, «An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*,» ***Science***, vol. 294, pp. 858-862, 2001.
- [38] N. C. Lee y V. Ambros, «An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*,» ***Science***, vol. 294, pp. 862-864, 2001.
- [39] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek y V. N. Kim, «MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II,» ***The EMBO Journal***, vol. 23, pp. 4051-4060, 2004.
- [40] Y. Lee, K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim y V. N. Kim, «microRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization,» ***The EMBO Journal***, vol. 21, pp. 4663-4670, 2002.
- [41] X. Cai, C. H. Hagedorn y B. R. Cullen, «Human micro-RNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs,» ***RNA***, vol. 10, pp. 1957-1966, 2004.
- [42] R. I. Gregory y R. Shiekhattar, «MicroRNA Biogenesis and Cancer,» ***Cancer Research***, vol. 65, n° 9, pp. 3509-3512, 2005.
- [43] R. I. Gregory, K.-p. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch y R. Shiekhattar, «The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs,» ***Nature***, vol. 432, pp. 235-240, 2004.
- [44] V. N. Kim, «MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export,» ***Cell Biology***, vol. 14, n° 4, pp. 156-159, 2004.
- [45] C. Gwizdek, E. Bertrand, C. Dargemont, J.-C. Lefebvre, J.-M. Blanchard, R. H. Singer y A. Doglio, «Terminal Minihelix, a Novel RNA Motif That Directs Polymerase III Transcripts to the Cell Cytoplasm,» ***Journal of Biological Chemistry***, vol. 276, n° 28, pp. 25910-25918, 2001.
- [46] E. Lund, S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg y U. Kutay, «Nuclear Export of MicroRNA Precursors,» ***Science***, vol. 303, n° 5654, pp. 95-98, 2004.

- [47] R. Yi, Y. Qin, I. G. Macara y B. R. Cullen, «Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs,» *Genes & Development*, vol. 17, n° 24, pp. 3011-3016, 2003.
- [48] M. T. Bohnsack, K. Czaplinski y D. Görlich, «Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs,» *RNA*, vol. 10, pp. 185-191, 2004.
- [49] D. P. Bartel, «MicroRNAs: Genomics, Review Biogenesis, Mechanism, and Function,» *Cell*, vol. 116, pp. 281-297, 2004.
- [50] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory y S. Diederichs, «Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation,» *Nature*, vol. 11, n° 3, pp. 228-234, 2009.
- [51] Y. Lee, I. Hur, S. Y. Park, Y. K. Kim, M. R. Suh y V. N. Kim, «The role of PACT in the RNA silencing pathway,» *The EMBO Journal*, vol. 25, n° 3, pp. 522-532, 2006.
- [52] T. P. Chendrimada, R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura y R. Shiekhattar, «TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing,» *Nature*, vol. 436, n° 7051, pp. 740-744, 2005.
- [53] S. Diederichs y D. A. Haber, «Dual role for Argonautes in microRNA processing and post-transcriptional regulation of microRNA expression,» *Cell*, vol. 131, pp. 1097-1108, 2007.
- [54] L. Zekri, E. Huntzinger, S. Heimstädt y E. Izaurralde, «The silencing domain of GW182 interacts with PABPC1 to promote translational repression and degradation of microRNA targets and is required for target release.,» *Molecular Cell Biology*, vol. 29, n° 23, pp. 6220-6231, 2009.
- [55] F. Moretti, C. Kaiser, A. Zdanowicz-Specht y M. W. Hentze, «PARBP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding,» *Nature Structural Molecular Biology*, vol. 19, pp. 603-608, 2012.
- [56] G. Meister, «Argonaute proteins: functional insights and emerging

- roles,» *Nature Reviews Genetics*, vol. 14, pp. 447-459, 2013.
- [57] J.-S. Yang, M. D. Phillips, D. Betel, P. Mu, A. Ventura, C. A. Siepel, K. C. Chen y E. C. Lai, «Widespread regulatory activity of vertebrate microRNA\* species,» *RNA*, vol. 17, pp. 312-326, 2010.
- [58] H. R. Chiang, L. W. Schoenfeld, J. G. Ruby, V. C. Auyeung, N. Spies, D. Baek, W. K. Johnston, C. Russ, S. Luo, J. E. Babiarz, R. Blelloch, G. P. Schroth, C. Nusbaum y D. P. Bartel, «Mammalian microRNAs: experimental evaluation of novel and previously annotated genes,» *Genes & Development*, vol. 24, pp. 992-1009, 2010.
- [59] N. Kosaka, H. Iguchi, Y. Yoshioka, F. Takeshita, Y. Matsuki y T. Ochiya, «Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells,» *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, pp. 17442-17452, 2010.
- [60] H. Valadi, K. Ekström, A. Bossios, M. Sjöstrand, J. J. Lee y J. O. Lötvall, «Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells,» *Nature Cell Biology*, vol. 9, pp. 654-659, 2007.
- [61] C. Théry, «Exosomes: secreted vesicles and intercellular communications,» *F1000 Biology Reports*, vol. 3, n° 15, 2011.
- [62] K. B. Mullis, «Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction,» *Annales de biologie clinique*, vol. 8, n° 48, pp. 579-582, 1990.
- [63] M. W. Pfaffl y M. Hageleit, «Validities of mRNA quantification using recombinant RNA and recombinant DNA external calibration curves in real-time RT-PCR,» *Biotechnology*, vol. 23, pp. 275-282, 2001.
- [64] T. Suzuki, P. J. Higgins y D. R. Crawford, «Control selection for RNA quantification,» *BioTechniques*, vol. 29, pp. 332-337, 2000.
- [65] K. J. Livak y T. D. Schmittgen, «Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method,» *Methods*, vol. 25, pp. 402-408, 2001.
- [66] V. Serazin-Leroy, D. Denis-Henriot, M. Morot, P. de Mazancourt y Y.

- Giudicelli, «Semi-quantitative RT-PCR for comparison of mRNAs in cells with different amounts of housekeeping gene transcripts,» *Molecular Cell Probes*, vol. 12, pp. 283-291, 1998.
- [67] O. Thellin, W. Zorzi, B. Lakaye, B. De Borman, B. Coumans, G. Hennen, T. Grisar, A. Igout y E. Heinen, «Housekeeping genes as internal standards: use and limits,» *Journal of Biotechnology*, vol. 75, pp. 291-295, 1999.
- [68] D. L. Foss, M. J. Baarsch y M. P. Murtaugh, «Regulation of hypoxanthine phosphoribosyltransferase, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin mRNA expression in porcine immune cells and tissues,» *Animal Biotechnology*, vol. 9, pp. 67-78, 1998.
- [69] T. D. Schmittgen y B. A. Zakrajsek, «Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR,» *Journal of Biochemical Biophysics Methods*, vol. 46, pp. 69-81, 2000.
- [70] M. W. Pfaffl, A. Tichopad, C. Prgomet y T. P. Neuvians, «Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations,» *Biotechnology Letters*, vol. 26, pp. 509-515, 2004.
- [71] J. Song, Z. Bai, W. Han, J. Zhang, H. Meng, J. Bi, X. Ma, S. Han y Z. Zhang, «Identification of Suitable Reference Genes for qPCR Analysis of Serum microRNA in Gastric Cancer Patients,» *Digestive Diseases and Sciences- Springer*, pp. 000-000, 2011.
- [72] C. L. Andersen, J. L. Jensen y T. F. Ørntoft, «Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets,» *Cancer Research*, vol. 64, pp. 5245-5250, 2004.
- [73] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe y F. Speleman, «Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes,» *Genome Biology*, vol. 3, n° 7, p. research0034.1–research0034.11,

2002.

- [74] N. Silver, S. Best, J. Jiang y S. Lay Thein, «Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR,» *BMC Molecular Biology*, vol. 7, n° 33, pp. doi:10.1186/1471-2199-7-33, 2006.
- [75] C. Yang, C. Wang, X. Chen, S. Chen, Y. Zhang, F. Zhi, J. Wang, L. Li, X. Zhou, N. Li, H. Pan, J. Zhang, K. Zen, C.-Y. Zhang y C. Zhang, «Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas,» *International Journal of Cancer*, pp. 116-127, 2013.
- [76] F. Zhi, N. Shao, R. Wang, D. Deng, L. Xue, Q. Wang, Y. Zhang, S. Yimin, X. Xia, S. Wang, Q. Lan y Y. Yang, «Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma,» *Neuro-Oncology*, vol. 0, pp. 1-9, 2014.
- [77] Z. Feng, X. Cao, X. Xie, B. Wang, W. Dong, W. Gu, Y. Ling, R. Wang, Y. Yang y Y. Liu, «Identification of Circulating MicroRNAs as Potential Biomarkers for Detecting Acute Myeloid Leukemia,» *PLOS one*, vol. 8, n° 2, p. e56718. doi:10.1371/journal.pone.0056718, 2013.
- [78] C. Zhang, C. Wang, X. Chen, C. Yang, K. Li, J. Wang, J. Dai, Z. Hu, X. Zhou, L. Chen, Y. Zhang, Y. Li, H. Qiu, J. Xing, Z. Liang, B. Ren, C. Yang, K. Zen y C.-Y. Zhang, «Expression Profile of MicroRNAs in Serum: A Fingerprint for Esophageal Squamous Cell Carcinoma,» *Clinical Chemistry*, vol. 56, n° 12, pp. 1871-1879, 2010.
- [79] R. Qi, M. Weiland, X.-H. Gao, L. Zhou y Q.-S. Mi, «Identification of Endogenous Normalizers for Serum MicroRNAs by Microarray Profiling: U6 Small Nuclear RNA Is Not a Reliable Normalizer,» *Hepatology*, vol. 55, n° 5, pp. 1640-1643, 2012.
- [80] Q. Wang, P. Li, A. Li, W. Jiang, H. Wang, J. Wang y K. Xie, «Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma,» *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, vol. 31, n° 97, 2012.

- [81] X. Chen, H. Liang, D. Guan, C. Wang, X. Hu, L. Cui, S. Chen, C. Zhang, J. Zhang, K. Zen y C.-Y. Zhang, «A Combination of Let-7d, Let-7g and Let-7i Serves as a Stable Reference for Normalization of Serum microRNAs,» *PLOS one*, vol. 11, n° 8, p. e79652. doi:10.1371/journal.pone.0079652, 2013.
- [82] Z. Hu, J. Dong, L.-E. Wang, H. Ma, J. Liu, Y. Zhao, J. Tang, X. Chen, J. Dai, Q. Wei, C. Zhang y H. Shen, «Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls,» *Carcinogenesis*, vol. 33, n° 4, pp. 828-834, 2012.
- [83] Q. Li, M. Liu, F. Ma, Y. Luo, R. Cai, L. Wang, N. Xu y B. Xu, «Circulating miR-19a and miR-205 in Serum May Predict the Sensitivity of Luminal A Subtype of Breast Cancer Patients to Neoadjuvant Chemotherapy with Epirubicin Plus Paclitaxel,» *PLOS one*, vol. 9, n° 8, p. e104870. doi:10.1371/journal.pone.0104870, 2014.
- [84] V. Müller, S. Gade, B. Steinbach, S. Loibl, G. von Minckwitz, M. Untch, K. Schwedler, K. Lübke, C. Schem, P. A. Fasching, C. Mau, K. Pantel y H. Schwarzenbach, «Changes in serum levels of miR-21, miR-210, and miR-373 in HER2-positive breast cancer patients undergoing neoadjuvant therapy: a translational research project within the Geparquinto trial,» *Breast Cancer Research Treat*, vol. 147, pp. 61-68, 2014.
- [85] E. van Schooneveld, M. C. Wouters, I. Van der Auwera, D. J. Peeters, H. Wildiers, P. A. Van Dam, I. Vergote, P. B. Vermeulen, L. Y. Dirix y S. J. Van, «Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers,» *Breast Cancer Research*, vol. 14, 2012.
- [86] I. Sanders, S. Holdenrieder, G. Walgenbach-Brünagel, A. von Ruecker, G. Kristiansen, S. C. Müller y J. Ellinger, «Evaluation of reference genes for the analysis of serum miRNA in patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma,» *International Journal of Urology*, pp. 1017-1025, 2012.
- [87] I. Syring, J. Bartels, S. Holdenrieder, G. Kristiansen, S. C. Müller y J. Ellinger, «Circulating serum microRNA (miR-367-3p, miR-371a-3p, miR-

- 372-3p, miR-373-3p) as biomarkers for patients with testicular germ cell cancers,» *The Journal of Urology*, p. doi: 10.1016/j.juro.2014.07.010., 2014.
- [88] S. Komatsu, D. Ichikawa, S. Hirajima, T. Kawaguchi, M. Miyamae, W. Okajima, T. Ohashi, T. Arita, H. Konishi, A. Shiozaki, H. Fujiwara, K. Okamoto, N. Yagi y E. Otsuji, «Plasma microRNA profiles: identification of miR-25 as a novel diagnostic and monitoring biomarker in oesophageal squamous cell carcinoma,» *British Journal of Cancer*, pp. 1-11 | doi: 10.1038/bjc.2014.451, 2014.
- [89] C. H. Lawrie, S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A. H. Banham, F. Pezzella, J. Boulton, J. S. Wainscoat, C. S. R. Hatton y H. L. Adrian, «Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma,» *British Journal of Haematology*, vol. 141, pp. 672-675, 2008.
- [90] L. Juan, H.-I. Tong, P. Zhang, G. Guo, Z. Wang, X. Wen, Z. Dong y Y.-p. Tian, «Identification and characterization of novel serum microRNA candidates from deep sequencing in cervical cancer patients,» *Scientific Reports*, vol. 4, n° 6277, pp. 1-9, 2014.
- [91] E. Alegre, M. F. Sanmamed, C. Rodriguez, O. Carranza, S. Martín-Algarra y Á. González, «Study of Circulating MicroRNA-125b Levels in Serum Exosomes in Advanced Melanoma,» *Archives of Pathology and Laboratory*, vol. 138, pp. 828-832, 2014.
- [92] N. H. Fleming, J. Zhong, I. Pires da Silva, E. Vega-Saenz de Miera, B. Brady, S. Won Han, D. Hanniford, J. Wang, R. L. Shapiro, E. Hernando y I. Osman, «Serum-Based miRNAs in the Prediction and Detection of Recurrence in Melanoma Patients,» *Cancer*, pp. 1-9, 2014.
- [93] N. Noren Hooten, M. Fitzpatrick, W. H. Wood, S. De, N. Ejiogu, Y. Zhang, **J. A. Mattison, K. G. Becker, A. B. Zonderman and M. K. Evans**, "Age-related changes in microRNA levels in serum," *Aging*, vol. 10, no. 5, pp. 725-740, 2013.
- [94] R. Ruiz Esparza-Garrido, M. Á. Velázquez-Flores, J. Diegopérez-Ramírez, E. López-Aguilar, G. Siorda-Reyes, M. Hernández-Ortiz, Á. G. Martínez-

- Batallar, S. Encarnación-Guevara, F. Salamaca-Gómez y D. J. Arenas-Aranda, «A Proteomic Approach of Pediatric Astrocytomas: MiRNAs and Network Insight,» *Journal of Proteomics*, vol. 94, pp. 162-175, 2013.
- [95] E. M. Kroh, R. K. Parkin, P. S. Mitchell y M. Tewari, «Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR),» *Methods*, vol. 50, n° 4, pp. 298-301, 2010.
- [96] N. H. H. Heegaard, A. J. Schetter, J. A. Welsh, M. Yoneda, E. D. Bowman y C. C. Harris, «Circulating microRNA Expression Profiles in Early Stage Non-Small Cell Lung Cancer,» *Int J Cancer*, vol. 130, n° 6, pp. 1378-1386, 2012.
- [97] East Carolina University, «Cotton Est Database,» 2014. [En línea]. Available: <http://www.leonxie.com/referencegene.php?type=reference>. [Último acceso: 27 Febrero 2015].
- [98] R core Team, «R: a Language and Environment for Statistical Computing,» R Foundation for Statistical Computing, 2014. [En línea]. Available: <http://www.R-project.org/>.
- [99] F. Benz, C. Roderburg, D. Vargas Cardenas, M. Vucur, J. Gautheron, A. Koch, H. Zimmermann, J. Janssen, L. Nieuwnhuijsen, M. Luedde, N. Frey, F. Tacke, C. Trautwein y T. Luedde, «U6 is unsuitable for normalization of serum miRNA levels in patients with sepsis or liver fibrosis,» *Experimental & Molecular Medicine*, n° 45, p. doi:10.1038/emm.2013.81, 2013.
- [100] G. Tang, X. Shen, K. Lv, Y. Wu, J. Bi y Q. Shen, «Different Normalization Strategies Might Cause Inconsistent Variation in Circulating microRNAs in Patients with Hepatocellular Carcinoma,» *MEDICAL SCIENCE MONITOR*, n° 21, pp. 617-624, 2015.
- [101] A. Yajima, K. Teshima y K. Noda, «Cytologic Changes of Cervical Cancer According to the Degree of Invasion,» *Tohoku Journal of Experimental Medicine*, vol. 126, pp. 295-299, 1978.
- [102] J. W. Reagan, I. L. Seidemann y Y. Saracusa, «The Cellular Morphology of Carcinoma in situ and Dysplasia or Atypical Hyperplasia of the Uterine

Cervix,» *Cancer*, vol. 6, n° 2, pp. 224-235, 1953.

- [103] A. B. P. Ng, J. W. Reagan y E. A. Linder, «The cellular manifestations of microinvasive squamous cell carcinoma of the uterine cervix,» *Acta Cytologica*, vol. 16, pp. 5-13, 1972.
- [104] C. Giannini, B. W. Scheithauer, P. C. Burger, M. R. Christensen, P. C. Wollan, T. J. Sebo, P. A. Forsyth y C. J. Hayostek, «Cellular Proliferation in Pilocytic and Diffuse Astrocytomas,» *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, vol. 58, n° 1, pp. 46-53, 1999.
- [105] W. S. Bullough, «Mitotic Activity in the Tissues of Dead Mice, and in Tissues Kept in Physiological Salt Solutions,» *Experimental Cell Research*, vol. 1, pp. 410-420, 1950.
- [106] N. Evans, «Mitotic figures in malignant tumours as affected by time before fixation of tissues,» *Archives of Pathology*, vol. 1, pp. 894-898, 1926.
- [107] R. E. Scully, R. I. Kempson y H. J. Norris, «Mitosis Counting,» *Human Pathology*, vol. 7, n° 4, pp. 481-484, 1976.
- [108] «ICD-10 Version:2010,» World Health Organization , 2014. [En línea]. Available: <http://apps.who.int/classifications/icd10/browse/2010/en>. [Último acceso: 14 Octubre 2014].
- [109] D. N. Louis y W. K. Cavenee, «Neoplasms of the central nervous system,» de *Cancer: Principles & Practice of Oncology*, V. T. DeVita, S. Hellman y S. A. Rosenberg, Edits., Filadelfia, PA: Lippincott Williams &Wilkins, 2005, pp. 1827-1834.
- [110] H. S. Bell, I. R. Whittle, M. Walker, H. A. Leaver y S. B. Wharton, «The development of necrosis and apoptosis in glioma: experimental findings using spheroid culture systems\*,» *Neuropathology and Applied Neurobiology*, vol. 27, pp. 291-304, 2001.
- [111] F. J. Wippold II, A. Perry y J. Lennerz, «Neuropathology for the Neuroradiologist: Rosenthal Fibers,» *American Journal of Neuroradiology*, vol. 27, n° 10, pp. 958-961, 2006.

- [112] W. Rosenthal, «Über eine eigenthümliche, mit Syringomyelie complicirte Geschwulst des Rückenmarks,» *Beitrage zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie*, vol. 23, n° 1, pp. 11-43, 1898.
- [113] Y. Lee, C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim y V. N. Kim, «The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing,» *Nature*, vol. 425, pp. 415-419, 2003.
- [114] Y. Siregar, Ed., «MiRNA in cancer,» de *Oncogene and Cancer - From Bench to Clinic*, Rijeka, In Tech, 2013, pp. 366-372.
- [115] E. Bernstein, A. A. Caudy, S. M. Hammond y G. J. Hannon, «Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference,» *Nature*, vol. 409, pp. 295-296, 2001.
- [116] H. Y. Lee, K. Zhou, A. M. Smith, C. L. Noland y J. A. Doudna, «Differential roles of human Dicer-binding proteins TRBP and PACT in small RNA processing,» *Nucleic Acids Reseach*, vol. 41, n° 13, pp. 6568-6576, 2013.
- [117] H. Ota, M. Sakurai, R. Gupta, L. Valente, B.-E. Wulff, K. Ariyoshi, H. Iizasa, R. V. Davuluri y K. Nishikura, «ADAR1 Forms a Complex with Dicer to Promote MicroRNA Processing and RNA-Induced Gene Silencing,» *Cell*, vol. 153, pp. 575-589, 2013.
- [118] K. Okamura, K. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler y E. C. Lai, «The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila,» *Cell*, vol. 130, pp. 89-100, 2007.
- [119] E. Maniatakis y Z. A. Mourelatos, «A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA,» *Genes & Development*, vol. 19, pp. 2979-2990, 2005.
- [120] G. B. Robb y T. M. Rana, «RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading,» *Molecular Cell*, vol. 26, pp. 523-537, 2007.
- [121] M. Johnston, M. C. Geoffroy, A. Sobala, R. Hay y G. Hutvagner, «HSP90 protein stabilizes unloaded argonaute complexes and microscopic P-bodies in human cells,» *Molecular Biology Cell*, vol. 21, pp. 1462-1469,

2010.

- [122] A. Volterra y J. Meldolesi, «Astrocytes, from Brain Glue to Communication Elements: The Revolution Continues,» ***Nature***, vol. 6, pp. 626-640, 2005.
- [123] X. Chen, J. Zhang, K. Zen y C.-Y. Zhang, «MicroRNAs as Blood-based Biomarkers of Cancer,» de ***MicroRNAs in Cancer Translational Research***, W. C. S. Cho, Ed., Springer Science+Business Media, 2011, pp. 499-532.
- [124] J. C. Benjumea Acevedo, D. Fernández Ternero, M. C. Márquez García, J. Núñez Valdés y J. A. Vilches Alarcón, *Matemáticas avanzadas y estadística para ciencias e ingenierías*, Sevilla: Universidad de Sevilla, 2006, p. 140.