



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

**EXPRESIÓN DE miR-100-5p, 124-3p, 128-1-3p, 221-3p Y  
SUS GENES BLANCO EN EL  
TUMOR RABDOIDE/TERATOIDE ATÍPICO.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE ESPECIALISTA EN  
**PATOLOGÍA PEDIÁTRICA**

PRESENTA:  
**ANAID PALMIRA DE ANDA VILLICAÑA**

TUTOR:  
DRA PILAR EGUIA AGUILAR

CIUDAD DE MÉXICO FEBRERO 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



---

Dra. Pilar Eguia Aguilar

Departamento Patología

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Director de Tesis



---

Dr. Carlos Serrano Bello

Hospital Infantil de México Federico Gómez

Director Metodológico

## Dedicatoria

ボーイフレンド ♡

お母さん

まい

ねこちゃん

トウインキーちゃん

## Índice

Dedicatoria	2
<b>Antecedentes</b>	<b>5</b>
<b>Marco Teórico</b>	<b>6</b>
Tumor Rabdoide Teratoide Atípico	6
Clasificación	7
Epidemiología	7
Características clínicas	8
Localización	8
Manifestaciones clínicas	8
Estudios de Imagen	9
Histopatología	10
Macroscopia	10
Microscopia	10
Inmunohistoquímica	11
Histogénesis	11
Genética	11
Pronóstico	12
Clasificación molecular	13
Síndrome de predisposición tumoral rabdoide teratoide atípico.	14
Diagnóstico Diferencial	14
Tratamiento	15
Cirugía	15
Quimioterapia	15
Radioterapia	16
MicroRNA	16
MicroRNA y cáncer	17
miR-100-5p	19
miR-124-3p	19
miRNA -128-1	20
miR-221-3p	20
Genes blanco	21
SMARCA5	21
AP1AR	21
N-MYC	22
AURKA	23
SUZ12	23
SOX2	24

SOX10	25
GLI2	25
Planteamiento del problema	<b>26</b>
Pregunta de investigación	<b>27</b>
Justificación	<b>27</b>
Objetivos	<b>27</b>
Objetivo general	27
Objetivos específicos	27
Métodos	<b>28</b>
Criterios de selección	28
Criterios de exclusión	28
Materiales	28
Muestras biológicas	28
Extracción de RNA y RT-qPCR	29
Análisis de expresión de genes blanco	29
Plan de análisis estadístico	<b>29</b>
Descripción de variables	<b>30</b>
Resultados de estudio	<b>30</b>
Discusión	<b>31</b>
Conclusión	<b>34</b>
Cronograma de actividades	<b>34</b>
Referencias bibliográficas	<b>35</b>
Limitación del estudio	<b>40</b>
Anexos	<b>41</b>

## **Antecedentes**

Representa del 1 al 2 % de los tumores pediátricos de sistema nervioso central (SNC), es un tumor de comportamiento agresivo. La característica más frecuente es la mutación o pérdida en la expresión del gen INI1 (hSNF5/SMARCB1) y con menos frecuencia la inactivación de SMARCA4 (2-3 %); estas alteraciones genéticas son determinantes, sin embargo, no explican la heterogeneidad clínica de este tumor. Varios son los mecanismos genéticos y epigenéticos que se han encontrado alterados en estos tumores, un mecanismo central es la regulación post-transcripcional a través de los microRNAs, su función es regular la traducción de moléculas de RNA mensajero blanco por lo que pueden disminuir de manera drástica la síntesis de proteínas, muchas de estas proteínas tienen funciones supresoras de tumor o bien oncogénicas y con ello facilitan la progresión del tumor. En un estudio anterior se cuantificó la expresión de un grupo de microRNAs con funciones supresoras de tumor. Estos han sido reportados en otros tumores como cáncer de vejiga, ovario y gliomas y se han descrito genes blancos importantes como mTOR. De esta investigación previa destacó un grupo de microRNAs miR-124, -128 (considerados como supresores de tumor), y miR-100 y -221 (considerados como oncogenes). Los genes blanco validados de estos microRNAs se relacionan con auto-renovación de célula troncal y proliferación celular y existe un gran número de blancos no explorados.

## Marco Teórico

### Tumor Rabdoide Teratoide Atípico

El tumor rabdoide fue descrito originalmente por Beckwith y Palmer como una variante del tumor de Wilms con un componente rabdomiosarcomatoso. Además del riñón, se reportaron tumores rabdoides en muchos órganos, incluidos los tejidos blandos y el sistema nervioso central (SNC). El TR/TA en SNC se reconoció por primera vez en 1987, cuando se lo denominó simplemente “tumor rabdoide”. Se definió como una entidad distinta en 1996 y se incluyó en la clasificación de tumores del SNC de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2000. El TR/TA actualmente constituye uno de los tres principales tumores embrionarios del SNC y se clasifica como grado IV por la OMS debido a su naturaleza altamente maligna. Las células tumorales muestran diversidad histológica con una combinación de células rabdoides y elementos neuroectodérmicos, epiteliales y mesenquimatosos, pero carecen de desarrollo de tejido divergente patognomónico de teratoma, y por lo tanto, se designa como teratoide. A pesar del progreso en las modalidades de tratamiento, este tumor altamente maligno del SNC tiene un pronóstico sombrío. Hasta el momento, no hay consenso con respecto al manejo óptimo de este tumor. La ubicación crítica del tumor impide la resección completa y la edad temprana de los pacientes restringe la integración óptima de la radioterapia y quimioterapia en el tratamiento de este tumor agresivo. (Biswas, et al 2016).

Los tumores cerebrales se clasifican según la histología, pero el análisis inmunohistoquímico, los hallazgos citogenéticos y genéticos moleculares, y las medidas de actividad mitótica se utilizan cada vez más en el diagnóstico y la clasificación de tumores. La ubicación del tumor y la extensión de la diseminación son factores importantes que afectan el tratamiento y el pronóstico, es un tumor de comportamiento agresivo y de mal pronóstico a corto plazo.

La característica más frecuente es la pérdida en la expresión del gen INI1 en el gen SMARCB1, localizado en el Cromosoma 22q11.2 y en 2 al 3 % de casos la

inactivación del gen BRG1, en el gen SMARCA4, localizado en el cromosoma 19p13.2; estas alteraciones genéticas son determinantes, sin embargo, no explican la heterogeneidad clínica de este tumor (Roberts, 2009). Estas alteraciones pueden evaluarse utilizando inmunohistoquímica para las proteínas correspondientes, con la pérdida de la expresión nuclear en correlación con la alteración genética (en el contexto de la expresión de control adecuada).

Si un tumor tiene características histológicas de TR/TA pero no presenta ninguna de las alteraciones genéticas de diagnóstico, solo está disponible un diagnóstico descriptivo de un tumor embrionario del SNC con características rabdoideas; en otras palabras, el diagnóstico de TR/TA requiere confirmación del defecto molecular característico. (Louis et al., 2016).

#### Clasificación

Se encuentra en la clasificación de la OMS entre los tumores embrionarios del sistema nervioso central, junto con los meduloblastomas, el tumor embrionario con rosetas multicapa, alterado por C19MC, el tumor embrionario con rosetas multicapa, el meduloepitelioma, el neuroblastoma del SNC, el ganglioneuroblastoma del SNC, el tumor embrionario del SNC, y el tumor embrionario del SNC con características rabdoideas, todos estos son grado IV. (Louis et al., 2016).

#### Epidemiología

Representa el 1 a 2 % de todos los tumores pediátricos de sistema nervioso central, es la neoplasia maligna más frecuente del SNC en niños menores de 6 meses de edad (Biswas, et al 2016). Representa el 40% -50% de todos los tumores embrionarios del SNC en el primer año de vida. Las tasas de incidencia específicas por edad disminuyen a partir de entonces: 8.1 por millón por debajo de 1 año, 2.2 a 1-4 años, 0.6 a 5-9 años, y cerca de cero a los 10-14 años (Frühwald et al 2016). La edad mediana en el momento del diagnóstico varía de 1,2 años a 2,3 años, tiene una preponderancia masculina leve hasta la edad de 3 años. Se ha

encontrado que alrededor del 14% -21% de los pacientes en diferentes series tienen enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico. (Biswas, et al 2016)

En adultos solo se han reportado 50 casos hasta el momento. (Chan et al , 2018) se localizan principalmente en la región supratentorial, siendo las regiones selar y supraselar el sitio preferencial, y tiene un curso clínico y supervivencia a largo plazo mucho más favorable que el de los pacientes pediátricos. (Biswas, et al 2016)

## Características clínicas

### Localización

Las localizaciones primarias son SNC, raíces nerviosas periféricas, riñones, cabeza y cuello, músculos paravertebrales, hígado, mediastino, retroperitoneo, vejiga, pelvis, corazón, escroto y subcutis. (Frühwald et al 2016)

Se ha descrito en prácticamente todas las ubicaciones del SNC, incluidas la cisterna de ángulo cerebelopontino, las meninges, los nervios craneales, el canal espinal y extradural. Existe una discrepancia con respecto al sitio más común de afectación, algunas series sugieren la región supratentorial, mientras que otras series sugieren la región infratentorial, y algunas series han mostrado igual participación de las regiones supratentorial e infratentorial. (Biswas, et al, 2016) Los tumores rabdoides pueden ocurrir de manera sincrónica en 2 o más ubicaciones, típicamente debido a que el paciente porta una alteración de SMARCB1 de la línea germinal. En la mayoría de los casos, la ubicación será el SNC. (Frühwald et al 2016)

### Manifestaciones clínicas

Dependen de la localización del tumor y la edad del paciente. Los pacientes generalmente presentan síntomas de hipertensión intracraneal, que incluyen cefalea, vómitos, letargo, falla del crecimiento, regresión de los hitos del desarrollo, irritabilidad y macrocefalia en niños muy pequeños. La participación del hemisferio cerebeloso puede provocar síntomas de ataxia, inclinación de la cabeza y nistagmo. Los pacientes también pueden presentar parálisis de los nervios

craneales (nervios craneales VII y VIII) si el ángulo cerebelopontino está afectado por el tumor. (Biswas, et al, 2016)

### Estudios de Imagen

La tomografía computarizada del cerebro demuestra una lesión hiperdensa atribuible a la alta celularidad del tumor y una mejora heterogénea en las imágenes posteriores al contraste. La calcificación se puede observar en hasta el 40% de los tumores. La resonancia magnética (RM) es la modalidad de imagen de elección en pacientes con TR/TA. En la RM, el TR/TA muestra una señal heterogénea de isointensidad tanto en imágenes de RM ponderadas en T1 como en T2. La RM con contraste muestra un realce variable (heterogénea, nodular periférica, intensa y leve). Los componentes quísticos localizados periféricamente se demuestran comúnmente en las imágenes de RM y son una característica distintiva útil. La mayoría de los TR/TA supratentoriales se originan en los hemisferios cerebrales, el lóbulo frontal está comúnmente involucrado, muestran una pared gruesa irregular con realce heterogéneo, con lesiones centrales quísticas o necróticas circundantes. En una serie, se demostró que esta característica tiene una alta especificidad y un valor predictivo negativo para TR/TA. (Biswas, et al, 2016)

El principal diagnóstico radiológico diferencial de TR/TA. es meduloblastoma (MB). Otros diferenciales incluyen tumor neuroectodérmico primitivo supratentorial (SPNET), ependimoma, teratoma, tumores del plexo coroideo, astrocitoma pilocítico y ganglioglioma infantil desmoplásico. Existen ciertas características radiológicas que pueden ayudar a diferenciar TR/TA de MB, como la ubicación fuera de la línea media y presencia de quiste excéntrico, calcificación y hemorragia intratumoral. Tanto TR/TA como MB muestran restricción de difusión en la RM ponderada por difusión.

La afectación del líquido cefalorraquídeo a través de la diseminación leptomeníngea se puede encontrar en el 15% a 30% de los pacientes; por lo tanto, la RM de neuroaxis completa y la citología del líquido cefalorraquídeo forman parte integral de la evaluación diagnóstica. La investigación adicional incluye una ecografía renal

para descartar un tumor rabdoide renal, ya que los pacientes con síndrome de predisposición tumoral rabdoide pueden desarrollar múltiples tumores rabdoides. (Biswas, et al, 2016)

## Histopatología

### Macroscopia

Estos tumores (y sus depósitos a lo largo de las vías del líquido cefalorraquídeo) generalmente tienen una apariencia macroscópica similar a la del meduloblastoma y otros tumores embrionarios del SNC. Tienden a ser suaves, de color rojo rosado y, a menudo, parecen estar demarcados del parénquima adyacente. Por lo general, contienen focos necróticos y pueden ser hemorrágicos. Aquellos con cantidades significativas de tejido mesenquimático pueden ser firmes y de color canela en algunas regiones. Los tumores que surgen en el ángulo del cerebelo pontino se envuelven alrededor de los nervios y vasos craneales e invaden el tronco encefálico y el cerebelo en diferentes grados. En raras ocasiones, TR/TA pueden mostrar compromiso óseo. (Loui,s et al, 2016)

### Microscopia

Los TR/TA son tumores heterogéneos que a menudo son difíciles de reconocer histológicamente. Muestran patrones histológicos complejos que resultan de una mezcla íntima de elementos neuroectodérmicos primitivos junto con células rabdoides. El fenotipo rabdoide se caracteriza por células grandes con abundante citoplasma, inclusiones citoplasmáticas globulares paranucleares que corresponden a agregados de filamentos intermedios, núcleos excéntricos con cromatina vesicular, un prominente nucleolo eosinófilo. El componente neuroectodérmico primitivo se caracteriza por células azules redondas pequeñas no diferenciadas. El componente mesenquimal está representado por células fusiformes dentro de un fondo mixoide basófilo. El componente epitelial, que rara vez se detecta, se puede observar como estructuras escamosas, papilares, adenomatosas o similares a una cinta. Las figuras mitóticas son frecuentes

(incluidas las figuras mitóticas atípicas), al igual que las áreas de necrosis geográfica y hemorragia. Sobre la base de la histopatología sola, la diferenciación de TR/TA de SPNET y MB sigue siendo difícil. (Biswas, et al, 2016)

#### Inmunohistoquímica

Muestran una reactividad polifenotípica, demostrando inmunopositividad para vimentina, antígeno de membrana epitelial, actina de músculo liso, sinaptofisina y, en menor medida, citoqueratina, proteína ácida fibrilar glial y proteína de neurofilamentos. Son tumores altamente proliferativos y muestran índices de marcaje Ki67 altos. Aunque las células rabdoideas pueden ser positivas para actina de músculo liso, no expresan miogenina ni desmina lo cual indicaría una diferenciación rabiomioblástica verdadera.

El marcador de mayor sensibilidad y especificidad diagnóstica es la falta de expresión nuclear de la proteína INI1, la cual es positiva en el resto de las neoplasias del sistema nervioso y en el resto de las células no neoplásicas. (Biswas, et al, 2016)

#### Histogénesis

La histogénesis de estos tumores no se conoce. Se ha sugerido que derivan de células fetales pluripotenciales. También se han propuesto orígenes meníngeos, de cresta neural y de células germinales. (Louis, et al 2016)

#### Genética

Estos tumores se pueden presentar de manera esporádica o bien asociados al síndrome de predisposición al tumor Rabdoide Teratoide.

La mayoría de los TR/TA muestran la pérdida de SMARCB1/INI1, mientras que la pérdida de la expresión de SMARCA4/BRG1 se observa en una pequeña proporción de casos.

Integrase interactador 1 (INI1), el producto génico de SMARCB1, es una proteína expresada de forma constitutiva que está presente en todos los tejidos normales,

así como en la mayoría de las neoplasias. En el TR/TA hay una pérdida de expresión nuclear de esta proteína, debido a la eliminación o mutación del locus SMARCB1 en 22q11.2; un sello genético de este tumor. La pérdida de expresión del INI1 por inmunohistoquímica se presenta en la mayoría de los tumores rabdoides teratoides atípicos, mientras que las mutaciones o pérdidas son demostrables hasta en el 75%, lo cual hace a la inmunohistoquímica más sensible para detectar la inactivación del INI1. Este gen pertenece al grupo de SWI/SNF del complejo de remodelación de la cromatina, y es importante para la formación del huso mitótico y para la regulación del ciclo celular.

En raras ocasiones, los tumores con características histológicas típicas de TR/TA muestran una expresión de INI1 retenida. Estos TR/TA muestran una pérdida de la expresión nuclear de BRG1, resultante de la mutación e inactivación del gen SMARCA4, y se asocian con un pronóstico más precario. Por lo tanto, la pérdida de cualquiera de estos marcadores es esencial para establecer un diagnóstico de TR/TA. (Biswas, et al, 2016)

#### Pronóstico

El pronóstico de los pacientes con TR/TA es grave. Sin embargo, algunos pacientes responden favorablemente al tratamiento estándar, lo que sugiere la existencia de heterogeneidad intertumoral molecular. Históricamente, la supervivencia en pacientes ha sido desalentadora, con una supervivencia media notificada de aproximadamente 1 año. Los factores de mal pronóstico asociados con el TR/TA son la edad menor a 2 años, la enfermedad metastásica en el momento del diagnóstico y el inicio tardío de la radioterapia. Los pacientes con localización tumoral supratentorial tienen un resultado relativamente favorable. (Biswas, et al 2016)

#### Clasificación molecular

En un estudio se identificaron tres subtipos moleculares distintos mediante el análisis genético y epigenético del tejido tumoral. La pérdida de expresión de

SMARCB1 se observó en 188 pacientes (98%). Cuatro casos habían conservado la expresión SMARCB1, de los cuales se confirmó que tres casos tenían una mutación SMARCA4.

En el subgrupo TR/TA-TYR, los pacientes eran más jóvenes (generalmente menores a 1 año) y tenían en su mayoría un tumor infratentorial. Este subgrupo se caracterizó por una amplia eliminación y sobreexpresión de SMARCB1 de genes melanosomales - TYR y MITF.

En el subgrupo TR/TA-SHH, los pacientes tenían tumores tanto supratentoriales como infratentoriales. Este subgrupo se caracterizó por la aberración focal de SMARCB1 y la sobreexpresión de los genes de la vía de Sonic Hedgehog (SHH) - MYCN y GLI2.

En el subgrupo TR/TA-MYC, los pacientes eran mayores (generalmente mayores a 1 año) y tenían en su mayoría tumores supratentoriales. Este subgrupo se caracterizó por la eliminación y sobreexpresión focal de SMARCB1 de MYC, HOTAIR y el grupo de genes HOX.

No se observó predilección sexual en ninguno de los subtipos moleculares mencionados anteriormente.

Los genes que fueron altamente expresados en casi todos los TR/TA en comparación con el cerebro normal incluían componentes del Complejo 2 de Represión Polycomb (PRC2) - EZH2, SUZ12 y EED - confirmando informes anteriores que sugieren una relación antagónica entre los miembros del complejo SWI / SNF y complejo PRC2 en remodelación de cromatina y silenciamiento epigenético de genes. (Pascal et al, 2016)

Síndrome de predisposición tumoral rabdoide teratoide atípico.

El síndrome de predisposición al tumor rabdoide (RTPS, por sus siglas en inglés) se caracteriza por un riesgo notablemente mayor de desarrollar tumores rabdoides: tumores malignos muy agresivos y poco frecuentes que aparecen predominantemente en lactantes y niños menores de tres años. Los tumores

rabdoides pueden aparecer en casi cualquier ubicación anatómica, comúnmente en el sistema nervioso central, aproximadamente el 50% se producen en el cerebelo. Otras localizaciones comunes incluyen tumores rabdoides malignos extracraneales (tumores rabdoides de cabeza y cuello, músculos paravertebrales, hígado, vejiga, mediastino, retroperitoneo, pelvis y corazón), tumor rabdoide del riñón (RTK) y posiblemente carcinoma de células pequeñas del ovario (tipo hipercalcémico). Se relaciona principalmente con las alteraciones de la línea germinal de SMARCB1, las personas con RTPS suelen presentarse antes de los 12 meses de edad con tumores sincrónicos de tumor rabdoide en tejidos blandos, renal y/o TR/TA, tumores rabdoides malignos bilaterales del riñón o tumores rabdoides malignos en dos o más hermanos. Se cree que hasta un tercio de los TR/TA surgen en el entorno de RTPS, y la mayoría de estos ocurren dentro del primer año de vida. Los tumores que se presentan en este contexto tienen un curso clínico más agresivo. El diagnóstico de RTPS se establece en un probando con un tumor rabdoide y / o antecedentes familiares de tumor rabdoide y / o múltiples tumores deficientes en SMARCA4 o SMARCB1 (sincrónicos o metacrónicos) y la identificación de una variante patógena heterocigótica de línea germinal en SMARCA4 o SMARCB1 por pruebas genéticas moleculares. (Nemes, et al, 2017)

#### Diagnóstico Diferencial

Las principales neoplasias a considerar en el diagnóstico diferencial son meduloblastoma, tumor neuroectodérmico primitivo central (PNET), carcinoma de plexos coroides, glioblastoma y tumores de células germinales.

Meduloblastoma y PNET : El meduloblastoma es el principal diagnóstico diferencial del TR/TA debido a la localización anatómica, y la morfología celular . La distinción entre estas 2 neoplasias es importante debido a que el TR/TA no responde a los esquemas de quimioterapia comúnmente utilizados para el tratamiento del meduloblastoma. La presencia de células de aspecto rabdoide, aun siendo escasas, debe hacer sospechar fuertemente el diagnóstico de TR/TA y obligar a realizar estudios de inmunohistoquímica para confirmar el diagnóstico.

Carcinoma de plexos coroides : Esta neoplasia poco frecuente, que se origina de las cavidades ventriculares, puede ser confundida en ocasiones con el TR/TA, debido a que este último puede presentar áreas de aspecto epitelial, crecimiento papilar, y crecimiento intraventricular. Además algunos carcinomas de plexos coroides pueden mostrar características rabdoides focalmente, lo cual complica el diagnóstico diferencial, haciendo imposible en ocasiones separar estas entidades por morfología.

## Tratamiento

### Cirugía

La cirugía proporciona un alivio rápido de los síntomas en pacientes con TR/TA. La extensión de la resección quirúrgica está influenciada por la edad del paciente, la ubicación y el tamaño del tumor. El impacto de la extensión de la resección en el resultado de supervivencia no es concluyente. El objetivo de la cirugía debe ser la resección máxima segura con la preservación adecuada de la función neurológica. Además de la resección, se requiere intervención quirúrgica para la colocación de la derivación ventriculoperitoneal para aliviar la presión intracraneal y para la colocación del catéter y reservorio ventricular para administrar quimioterapia intraventricular. (Biswas, et al 2016)

### Quimioterapia

La quimioterapia ha sido componente integral del manejo multimodal de pacientes con TR/TA. La quimioterapia adyuvante en las TR/TA es intensiva, y las series publicadas han usado dos tipos de quimioterapia: el Grupo de Cáncer Infantil (CCG) -9921 y los protocolos Intergrupo de rhabdomyosarcoma III (IRS III). (Biswas, et al 2016). Diversos estudios muestran variación en los resultados y supervivencia, por lo cual no existe actualmente un protocolo de quimioterapia específico para tratar esta entidad.

## Radioterapia

La radioterapia es un componente importante del tratamiento en pacientes con TR/TA. Como la mayoría de los pacientes diagnosticados con TR/TA son menores de 3 años, la radioterapia se ha diferido a menudo en el contexto postoperatorio, ya que este es el momento crítico para el desarrollo neurológico en un niño. Se ha utilizado el volumen de tratamiento variable (eje craneoespinal, cerebro completo o lecho tumoral con margen) al planificar la RT en estos pacientes. Irradiación craneoespinal se ha utilizado en niños mayores (mayores de 3 años) debido a la alta propensión a la diseminación leptomenígea (15% -30%) del tumor. La dosis de RT requerida en pacientes con TR/TA no se ha estandarizado tal vez debido a la rareza del tumor y al uso limitado de la RT en muchas series de casos. La dosis de radioterapia en el lecho tumoral varía de 50 Gy a 56 Gy, mientras que la dosis a neuroaxis varía de 23.4 Gy a 36 Gy en fraccionamiento convencional. (Biswas, et al 2016)

## MicroRNA

Los miRNAs son moléculas de RNA no codificante de 18 a 24 nucleótidos que regulan la expresión de genes a nivel post-transcripcional. Se expresan en un amplio número de organismos como animales, plantas y virus y en cada tipo celular. Se estima que el genoma de los vertebrados codifica más de 1,000 miRNAs diferentes, los cuales regulan la expresión de al menos el 30% de los genes. Cerca de 28,645 miRNAs se han identificado en el genoma humano. Este número se ha incrementado rápidamente en los últimos años, sin embargo, poco se conoce acerca de sus blancos específicos y las funciones biológicas que desempeñan en el desarrollo del cáncer y otras enfermedades. Un mecanismo central es la regulación post-transcripcional a través de los microRNAs, su función es regular la traducción de moléculas de RNA mensajero blanco por lo que pueden disminuir de manera drástica la síntesis de proteínas. Muchas de estas proteínas tienen funciones supresoras de tumor o bien oncogénicas y con ello facilitan la progresión del tumor (Hammond et al, 2015).

Los microRNA se descubrieron en 1993 en estudios con *Caenorhabditis elegans*, tras su descubrimiento se ha reconocido que poseen un gran significado funcional, principalmente regular la síntesis proteica uniéndose a las secuencias complementarias de RNA mensajero no traducido en la región 3', regulando negativamente la traducción del RNA mensajero. (Lim et al, 2003)

La creciente evidencia sugiere que los miRNA juegan un papel importante en el control del desarrollo del SNC, al regular la proliferación celular, la diferenciación y la apoptosis. Investigaciones recientes basadas en miRNA revelan que los perfiles de miRNA de las células tumorales son diferentes de las células normales y que los perfiles de expresión de miARN en tumores de orígenes de desarrollo similares tienen alteraciones similares. (Braoudaki, et al, 2014)

Destaca un grupo de microRNAs miR-124, -128 (considerados como supresores de tumor), y miR-100 y -221 (considerados como oncogenes). Los genes blanco validados de estos microRNAs se relacionan con auto-renovación de célula

### MicroRNA y cáncer

Aunque se han hecho enormes avances en los conocimientos disponibles sobre el cáncer, aún encontramos fenómenos en el comportamiento biológico de la neoplasias que no podemos explicar por los medios actuales, por ejemplo tumores que histológicamente son de buen pronóstico y terminan comportándose de manera agresiva y letal. Los últimos años han visto un aumento en los estudios preclínicos que intentan identificar dianas moleculares en TR/TA. Sin embargo, la gran mayoría de estos experimentos todavía se basaban en el uso de líneas celulares, mientras que el panorama transcriptómico y epigenómico del TR/TA primario sigue siendo un territorio en gran parte inexplorado (Pascal, et al, 2016). En años recientes numerosas investigaciones se centran en determinar la participación o función de los microRNA en la biología del cáncer. Algunas de ellas demostraron la importancia de ciertos microRNA en la regulación de la expresión del RNA mensajero, modificando así el crecimiento tumoral, la capacidad de invasión, la

angiogénesis y evasión inmune. Esto ha dado lugar a la creación de perfiles tumorales de microRNA que permiten la subclasificación en grupos pronósticos y de tratamiento. Se reconoce el papel de los miRNAs en la fisiopatología de varios tipos de tumores. Cada neoplasia tiene un perfil de miRNA característico que los distingue de sus contrapartes normales.

En el año 2002 por primera vez se asoció la desregulación de miRNA al cáncer, en ese entonces se encontró disregulación del miR-15 y miR-16 en leucemia linfocítica crónica. La aparición de microRNAs ha sido uno de los desarrollos definitorios en la biología del cáncer en la última década, y la explosión de conocimiento en esta área ha generado nuevas oportunidades diagnósticas y terapéuticas. La importancia de los microARN en el cáncer ha sido subrayada por la identificación de alteraciones en los sitios de unión a diana de los microARN y la maquinaria de procesamiento de microARN en las células tumorales. Los ensayos clínicos que utilizan el perfil de microARN para el pronóstico del paciente y la respuesta clínica ya están en marcha, y el primer imitador de microARN ingresó a la clínica para terapia contra el cáncer en 2013. Los microARNs se han convertido en reguladores clave de la biología celular del cáncer, pueden definir los tipos de tumores, la susceptibilidad, el pronóstico y la respuesta, los MicroRNAs circulantes proporcionan una fuente potencial de biomarcadores. La modulación de actividades microRNA específicas es una vía terapéutica potencial. (Hayes, et al 2014) La detección de estos microRNAs asociados a cáncer puede realizarse en distintos fluidos corporales lo cual permite un diagnóstico y monitoreo menos invasivo.

#### miR-100-5p

La unión de este miRNA está involucrada en el silenciamiento génico postranscripcional. La desregulación de este miRNA se asocia a carcinoma urotelial de vejiga de alto riesgo, y peor pronóstico, (Inamoto, et al, 2018) confiere menor supervivencia global y agrega resistencia a la doxorubicina en el osteosarcoma (Li, et al, 2015) y se observó una mayor expresión de miR-100-5p en

los astrocitomas y ependimomas en comparación con los meduloblastomas: en promedio 3.8 veces. (Eguia, et al. 2017)

Está demostrado que la baja expresión miR-100 está presente en poblaciones celulares que son relativamente insensibles a la radiación, por ejemplo, en células tipo célula madre en cáncer de próstata y en cáncer de próstata resistente a la castración (Li, et al, 2015). miR1005p tiene una alta expresión en los tejidos de carcinoma de células renales en comparación con la de los tejidos adyacentes normales. miR1005p participó en la viabilidad celular, la migración, la invasión y la apoptosis en líneas celulares ACHN y 786O RCC. (Chen et al, 2017). La infección por *Helicobacter pylori* puede causar una disfunción de la barrera epitelial gástrica al aumentar los niveles de miR-100, que posteriormente inhiben la señalización de mTOR (Wang , et al 2017) La transferencia exosómica de miR-100 de las células madre mesenquimales disminuye la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) a través de la modulación del eje mTOR / HIF-1 en células de cáncer de mama (Li , et al, 2015).

#### miR-124-3p

MicroRNA-124-3p reprime el crecimiento celular y la motilidad celular dirigiéndose a EphA2 en el glioma. (Wu, et al , 2018)

Regula la proliferación celular, la invasión, promueve la apoptosis y la bioenergética al tener como blanco al oncogen PIM1 en el astrocitoma (Deng et al 2016) . Hay cambios consistentes asociados con la depresión en la expresión de miR-124-3p (Bashkar, et al, 2016). Afecta la proliferación, migración y apoptosis de células de cáncer de vejiga a través de AURKA . (Yuan et al, 2017). La disminución de la expresión de miR-124-3p impulsa la progresión celular en el cáncer de mama principalmente a través de Beclin-1 (Zhang, et al 2016) Actúa directamente a PDCD6 para inhibir la metástasis en el cáncer de mama (Zhang, et al, 2017).

## miRNA -128-1

Se encuentra abundantemente en el cerebro y normalmente participa en el desarrollo del sistema nervioso y en el mantenimiento de las funciones fisiológicas neuronales. En las células tumorales, la expresión de miR-128 se desregula a través de una variedad de eventos genéticos y epigenéticos. La desregulación de miR-128 tiene efectos profundos sobre la génesis neoplásica y el mantenimiento de las células tumorales a través de alteraciones en la proliferación celular, diferenciación, metabolismo y apoptosis. El uso de miR-128 como herramienta diagnóstica y o terapéutica puede resultar en mejoras en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de numerosos cánceres (Huang, et al, 2015). El miR-128 está reprimido en células de glioma, y podría inhibir la proliferación de gliomas al atacar genes como E2F3a y BMI1. La desregulación de miR-128 en el cáncer de ovario promueve la resistencia al cisplatino (Li, et al, 2014)

## miR-221-3p

La regulación negativa de miR-221-3p y la regulación positiva de su gen objetivo PARP1 son biomarcadores pronósticos para pacientes con cáncer de mama triple negativo y se asocian con un pronóstico desfavorable (Deng, et al, 2017). MiR-221-3p se dirige a ARF4 e inhibe la proliferación y migración de las células epiteliales de cáncer de ovario (Wu, et al, 2018) Los niveles plasmáticos de miR-221-3p aumentan en pacientes con embolia pulmonar aguda (Li, et al, 2018). El nivel de expresión del miR 221 está regulado al alza en la diferenciación de monocitos a macrófagos. La regulación negativa del receptor CD4 tras la diferenciación de los monocitos en macrófagos es el resultado de la focalización mediada por miR 221 de los ARNm de CD4. Al actuar sobre CD4, el microARN 221 controla la susceptibilidad de las células THP-1 diferenciadas a la infección por VIH-1 (Lodge, et al, 2017). miR-221 aumenta la proliferación, invasión y migración de células de osteosarcoma en parte a través de la regulación negativa de PTEN (Zhu, et al, 2015)

Genes blanco

## SMARCA5

Locus: 4q31.21. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de proteínas SWI / SNF. Los miembros de esta familia tienen actividades de helicasa y ATPasa y se piensa que regulan la transcripción de ciertos genes al alterar la estructura de la cromatina alrededor de esos genes. La proteína codificada por este gen es un componente del complejo de remodelación de la cromatina y el factor de espaciamiento RSF, un facilitador de la transcripción de genes de clase II por la ARN polimerasa II. La proteína codificada es similar en secuencia a la proteína remodeladora de la cromatina ISWI de *Drosophila*. El SMARCA5 es necesario para la proliferación y diferenciación de las células madre y células progenitoras hematopoyéticas.

Es un gen de codificación de proteínas. Las enfermedades asociadas con SMARCA5 incluyen el sarcoma de Ewing extraesquelético y el síndrome de Williams-Beuren. Entre sus vías relacionadas están la regulación / acetilación de la cromatina y el daño al ADN. Las anotaciones de ontología de genes (GO) relacionadas con este gen incluyen la unión a los ácidos nucleicos y la actividad hidrolasa. Un parólogo importante de este gen es SMARCA1.

La sobreexpresión de SMARCA5 se correlaciona con la proliferación celular y la migración en el cáncer de mama. (OMIM 603375)

## AP1AR

Locus: 16q22.2. Necesario para el transporte dependiente entre la red trans-Golgi y los endosomas del complejo de proteínas adaptadoras. Regula el tráfico de la membrana endosomal a través de la asociación con AP-1 y KIF5B, lo que vincula el transporte microtubular basado en kinesina plus- al tráfico de membrana dependiente de AP-1. Puede actuar como efector de AP-1 en la secreción de endolisosoma inducida por calcio. Inhibe la función del complejo Arp2 / 3; Regula

negativamente la propagación celular, el tamaño y la motilidad a través del secuestro intracelular complejo del Arp2 / 3. (OMIM 603533)

## N-MYC

Locus: 2p24.3. El gen N-MYC proporciona instrucciones para producir una proteína que juega un papel importante en la formación de tejidos y órganos durante el desarrollo antes del nacimiento. Los estudios en animales sugieren que esta proteína es necesaria para el desarrollo normal de las extremidades, el corazón, los riñones, los pulmones, el sistema nervioso y el sistema digestivo. La proteína N-MYC regula la actividad de otros genes uniéndose a regiones específicas de ADN y controlando el primer paso de la producción de proteínas (transcripción). Sobre la base de esta acción, esta proteína se llama factor de transcripción. (OMIM 615968)

El gen N-MYC pertenece a una clase de genes conocidos como oncogenes. Cuando se mutan, los oncogenes tienen el potencial de causar que las células normales se vuelvan cancerosas. El gen N-MYC es un miembro de la familia de oncogenes Myc. Estos genes desempeñan funciones importantes en la regulación del crecimiento y la división celular (proliferación) y la autodestrucción de las células (apoptosis). Una región de 130 kb del cromosoma 2, que contiene el gen N-MYC, se amplifica con frecuencia en los neuroblastomas.

N-MYC es un impulsor de múltiples tipos de tumores que se derivan a través de un mecanismo que implica una diferenciación directa dentro del mismo linaje (por ejemplo, en el caso de neuroblastoma, meduloblastoma y leucemia mieloide aguda) y a menudo se asocia con un pronóstico desfavorable. Los datos emergentes sugieren que N-MYC también controla otros tipos de tumores a través de un mecanismo que promueve un cambio de linaje y que este interruptor puede ser explotado con fines terapéuticos. (Rickman, et al, 2018)

## AURKA

Locus: 20q13.2 La Aurora A es proteína codificada por este gen. Es una quinasa regulada por el ciclo celular que parece estar involucrada en la formación de

microtúbulos y/o la estabilización en el polo del huso durante la segregación de cromosomas. La aurora A se activa mediante una o más fosforilaciones y su actividad alcanza su punto máximo durante la transición de la fase G2 a la fase M en el ciclo celular. La proteína codificada se encuentra en el centrosoma en las células interfásicas y en los polos del huso en la mitosis. (OMIM 603072)

Este gen puede desempeñar un papel en el desarrollo y la progresión del tumor. Las enfermedades asociadas con AURKA incluyen el cáncer colorrectal y el adenocarcinoma colorrectal. Entre sus vías relacionadas se encuentran los eventos de señalización de la Red de Cáncer Gástrico 1 y PLK1. Las anotaciones de Ontología de genes (GO) relacionadas con este gen incluyen la actividad de la transferasa, la transferencia de grupos que contienen fósforo y la actividad de la proteína tirosina quinasa. Un parálogo importante de este gen es AURKB. Existe una sobreexpresión de Aurora A en el cáncer de mama, mientras que los tejidos sanos circundantes tienen niveles normales de expresión de Aurora A, y controla la renovación de las células que inician el cáncer de mama y promueve la estabilización de wnt3a mediante la supresión de miR-128 (V. Eterno, et al, 2016) También se ha demostrado que Aurora A está involucrada en la transición epitelial-mesenquimatosa y en la transdiferenciación neuroendocrina de las células del cáncer de próstata agresivo. Aurora A desempeña un doble papel en la migración y la supervivencia de las células de glioblastoma humano según la concentración de CXCL12. (Willems E, et al 2019)

## SUZ12

Locus: 17q11.2. Este gen de dedo de zinc se ha identificado en los puntos de ruptura de una translocación cromosómica recurrente informada en el sarcoma del estroma endometrial. La recombinación de estos puntos de ruptura da como resultado la fusión de este gen y JAZF1. La proteína codificada por este gen contiene un dominio de dedo de zinc en el extremo C de la región de codificación. La función específica de este gen aún no se ha determinado.

En condiciones hipóxicas, el SUZ12 precursor experimenta un empalme trans regulado con el JAZF1, lo que da como resultado una isoforma quimérica que puede proteger contra la apoptosis. La transcripción quimérica se caracteriza por los exones JAZF1 1-3 unidos al SUZ12 exón 2-16. La transcripción quimérica se expresa principalmente en el endometrio desde las fases tardías secretoras y proliferativas tempranas del ciclo menstrual, pero no en el miometrio normal en ninguna fase del ciclo. Su expresión está ligeramente inducida por niveles bajos de progesterona, pero se suprime por estrógeno y niveles altos de progesterona. (Li, et al 2008)

SUZ12, como parte de Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2), puede estar involucrado con el silenciamiento de la cromatina junto con el ARNc de HOTAIR, utilizando su dominio de dedo de zinc para unirse a la molécula de ARN. (OMIM 606245)

#### SOX2

Locus: 3q26.33. Este gen carente de intrones, codifica un miembro de la familia de factores de transcripción HMG-box (SOX) relacionados con SRY, involucrados en la regulación del desarrollo embrionario y en la determinación del destino celular. El producto de este gen es necesario para el mantenimiento de las células madre en el sistema nervioso central y también regula la expresión de genes en el estómago. Las mutaciones en este gen se han asociado con hipoplasia del nervio óptico y con microftalmia síndrónica, así como malformaciones de SNC. Este gen se encuentra dentro de un intrón de otro gen denominado transcripción superpuesta SOX2 (SOX2OT). (OMIM 184429) El astrocitoma con sobreexpresión de CD133 y Sox2 tuvo un pronóstico desfavorable y una respuesta clínica deficiente al protocolo terapéutico actual. (Abdelrahman, et al, 2018)

#### SOX10

Locus: 22q13.1. Este gen codifica un miembro de la familia SOX de factores de transcripción involucrados en la regulación del desarrollo embrionario y la

determinación del destino celular. La proteína codificada actúa como un activador transcripcional después de formar un complejo de proteínas con otras proteínas. Esta proteína actúa como una proteína lanzadera nucleocitoplásmica y es importante para la cresta neural y el desarrollo del sistema nervioso periférico. En particular, la proteína SOX10 es esencial para la formación de nervios entéricos y para la producción de melanocitos. Se relaciona con síndrome de Hirschsprung, síndrome de Kallmann, síndrome de Waardenburg. En las células melanocíticas existe evidencia de que la expresión del gen SOX10 puede estar regulada por MITF, la cual influye en el desarrollo de los melanocitos, así como en la formación de la cresta neural. La interacción entre SOX10 y NMI parece estar coexpresada en las células gliales, los gliomas y la médula espinal y se ha demostrado que modula la actividad transcripcional de SOX10. (OMIM 602229)

SOX10 puede actuar tanto como un oncogén como un supresor de tumores dependiendo del origen del tumor. Se informó que SOX10 posee actividades promotoras de tumores en melanoma y gliomas. Por otro lado, se observó que la disminución de la expresión de SOX10 promueve la progresión de las células tumorales de las células de Schwannoma de Merlin-null. Se ha demostrado que la metilación indujo silencio de SOX10 en el cáncer digestivo múltiple, incluido el cáncer colorrectal, el cáncer gástrico y el carcinoma de esófago. SOX10 suprimió la señalización de  $\beta$ -catenina, así como la transición epitelial-mesenquimatosa (EMT) y la potencia de las células tumorales, lo que conduce aún más a la inhibición de la migración / invasión de células tumorales (Xu et al, 2016).

## GLI2

Locus: 2q14.2. Este gen codifica una proteína que pertenece a la subclase de proteína de dedo de zinc de tipo C2H2 de la familia Gli. Los miembros de esta subclase se caracterizan como factores de transcripción que se unen al ADN mediante motivos de dedos de zinc. Estos motivos contienen enlaces H-C conservados. Las proteínas de dedo de zinc de la familia GLI son mediadoras de la señalización de Sonic hedgehog (SHH) y están implicadas como oncogenes

potentes en la célula de carcinoma embrionario. La proteína codificada por este gen se localiza en el citoplasma y activa la expresión del gen homólogo de *Drosophila* parcheado (PTCH). También se cree que desempeña un papel durante la embriogénesis. La proteína codificada está asociada con varios fenotipos: síndrome de cefalopolisindactilia de Greig, síndrome de Pallister-Hall, polidactilia preaxial tipo IV, polidactilia postaxial tipos A1 y B y holoprosencefalia no sindrómica. Las alteraciones de SUFU son comunes en el subgrupo meduloblastoma (MBH) de Sonic Hedgehog (SHH) humano. La pérdida de Sufu por sí misma es incapaz de inducir la formación de MB (meduloblastoma) en ratones, debido a la insuficiente activación de GLI2. La pérdida simultánea de Spop, una ubiquitina ligasa E3 dirigida a GLI2, restaura la activación robusta de GLI2 e induce la rápida formación de MB en el contexto de eliminación de Sufu. Está demostrado también un papel promotor de tumores de Sufu en MB activado por Smo (aproximadamente el 60% de SHH MB humano) al mantener una fuerte actividad de GLI ( Yin et al 2019) (OMIM 165230).

### **Planteamiento del problema**

Los tumores embrionarios presentan una elevada mortalidad con baja respuesta al tratamiento, un mejor pronóstico dependerá de la identificación de eventos moleculares asociados. En estudios anteriores en tumores de SNC se ha determinado un grupo de microRNAs que presentan expresión alterada y diferencial tanto con respecto a tejido control sano, como entre tipos tumorales (astrocitomas, ependimomas y meduloblastomas). En este proyecto se enfoca a estudiar un grupo específico de microRNAs y su relación con sus genes blanco determinados en base a su alta probabilidad de unión y por lo tanto de inhibición.

### **Pregunta de investigación**

Los microRNAs 100-5p, 124-3p, 128-1-3p y 221-3p se encuentran diferencialmente expresados en el TR/TA en comparación con el tejido nervioso de paciente no

oncológico, ¿Esta expresión se correlaciona de manera inversa con sus genes blanco?

### **Justificación**

El TR/TA es clasificado por la OMS como GIV y a nivel molecular se han identificado tres subtipos, con escasa información de los mecanismos epigenéticos involucrados y menos aún con respecto la participación de RNAs no codificantes. En estudios recientes se describen tres subgrupos moleculares en base a características epigenéticas y delinean la importancia de los cambios en el genoma no codificante. La delección de SMARCB1 es evidente en un grupo de casos, pero en otros no hay factores bien establecidos que reflejen las características de malignidad. es importante conocer la relación de los mRNA con sus genes blanco, así como las vías biológicas del TR/TA, para poder desarrollar terapias blanco en un futuro.

### **Objetivos**

Objetivo general

Describir la expresión de miR-100-5p, 124-3p, 128-1-3p y miR-221-3p en pacientes pediátricos con TR/TA del HIMFG y correlacionar con la expresión de sus genes blanco SMARCA5, AP1AR, N-MYC, AURKA, SUZ12, SOX10 y GLI2.

Objetivos específicos

Correlacionar los resultados de expresión de los genes blanco con la expresión de los microRNAs.

Correlacionar los valores de expresión obtenidos de los genes blanco con los datos clínico-patológicos del paciente

Describir la frecuencia del tumor Rabdoide/Teratoide atípico del sistema nervioso central en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

## **Métodos**

### Criterios de selección

Muestras tumorales de tejido fijado en formol e incluido en parafina con diagnóstico de TR/TA con lesión representativa (tejido neoplásico viable en más del 90%), con los que cuente el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México del año 2000 al 2019

Expediente clínico completo.

### Criterios de exclusión

Material con RNA insuficiente

Material con necrosis extensa (tejido neoplásico viable en menos del 10%)

### Materiales

#### Muestras biológicas

En el periodo de 2000 a 2019, se identificaron 29 TR/TA, de los cuales 16 fueron infratentoriales, 9 supratentoriales, 1 infra y supratentorial y 3 intrarraquídeos. Adicionalmente, se contabilizaron 2 casos de sitio no especificado, 2 de tumor rabdoide renal y 4 de tumor rabdoide extrarrenal (tejidos blandos y otras localizaciones). De los 29 TR/TA, se excluyeron los casos que no contaron con material suficiente y adecuado para la extracción del RNA. Se incluyeron únicamente TR/TA infra y supratentoriales, con un total de 25 muestras, de las cuales solo en 12 fue posible extraer RNA en cantidad y calidad suficiente para la amplificación, y de estos se excluyó un caso, por baja expresión de los genes endógenos, dejando un total de 11 casos. Como controles se incluyeron 10 muestras de cerebro y cerebelo de autopsias de pacientes libres de cualquier tipo de tumor, de los cuales solo fue posible extraer en 3 casos RNA en cantidad y calidad suficiente para la amplificación, debido a que estos tejidos de autopsia tuvieron una fijación prolongada en formaldehído, y esto degrada el RNA.

## Extracción de RNA y RT-qPCR

Se extrajo el RNA de las muestras de tejido en parafina utilizando la técnica con trizol. Se realizó tratamiento con DNAsa en todas las muestras. Se determinó la concentración y pureza del RNA total de cada muestra en un Nanodrop-1000 (Thermo Fisher Scientific Waltham, MA, USA) y se incluyeron los que tuvieron una relación de  $A_{260}/A_{280}$  de 1.7 a 2.1. Se utilizaron sondas de hidrólisis (TaqMan) para amplificar los microRNAs miR-100, 124, 128 y -221, y el gen de referencia RNU48. Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Stratagene 3500 (Agilent) con el programa de amplificación: 50°C 2 min, 95 °C 10 min, posteriormente 40 ciclos a 95 °C 15 seg (desnaturalización) y 60 °C 1 min (alineamiento/extensión). Se realizó cuantificación relativa mediante el método Ct comparativo (Delta Ct). Los valores de expresión de los miRNAs se compararon contra los valores de expresión de los controles (cerebro y cerebelo de pacientes no oncológicos) mediante la prueba t-student.

## Análisis de expresión de genes blanco

En la base de datos targetscan se realizó una búsqueda sobre los principales blancos de los microRNAs. Los genes blancos seleccionados fueron miR-100: SMARCA5, AP1AR; miR-124: MYCN, AURKA, miR-128: SUZ12, SOX2; miR-221: SOX10 Y GLI2. Se analizó su expresión mediante RT-qPCR con los ensayos de 96 pozos RT2 qPCR primer assay (Qiagen).

## **Plan de análisis estadístico**

Estudio transversal , retrospectivo, comparativo y observacional.

La expresión de los genes se evaluó mediante cuantificación relativa con la fórmula  $2^{-\Delta Ct}$ . Los valores de expresión obtenidos se compararon con la prueba t-student entre los pacientes con tumor y grupo control.

## **Descripción de variables**

Edad: Tiempo transcurrido entre el nacimiento y la presentación del tumor, variable cuantitativa discreta

Sexo: Fenotipo de los pacientes, variable cualitativa nominal

Localización de la lesión: Localización dentro del sistema nervioso central, variable cualitativa nominal

Expresión de cada microRNA: Valor de expresión por PCR, variable continua

Expresión de genes blanco: Valor de expresión por PCR, variable continua

## **Resultados de estudio**

De 100% (n15) casos incluidos en el estudio, fueron 53% (n8) femenino y 46% (n7) masculino (Ver gráfica 1). Los pacientes tenían entre 15 días de vida a 3 años, y el promedio fue 1.4 años de edad (ver gráfica 2). El 73% (n11) fueron infratentoriales, y el 26 % (n4) supratentoriales (ver gráfica 3). En tres casos la localización fue en lóbulo frontal y 1 parietofrontal, Los mRNAs evaluados fueron miR-100, -124, -128 y 221. La expresión de estos mRNAs fue baja en los TR/TA, comportándose como supresores de tumor. En el caso de miR-100 se evaluaron como blancos los RNAm de SMARCA5 y AP1AR, en los TR/TA su expresión fue alta en ambos casos; para miR- 124 se evaluaron como blanco MYCN y AURKA, en los TR/TA la expresión fue disminuida para MYCN y aumentada para AURKA, para miR-128 los blancos fueron SUZ12 el cual fue disminuido y SOX2 que fue aumentado. miR-221 tuvo como blanco a SOX10 y GLI2 en los TR/TA su expresión fue disminuida para SOX10 y aumentada para GLI2. (Ver tabla 1) (Ver gráfica 4)

## Discusión

En un estudio previo se determinó la expresión de los mRNAs miR-100, -124, -128 y 221. La expresión de estos mRNAs fue baja en los TR/TA comportándose como supresores de tumor.

La unión de miR-100-5p está involucrada en el silenciamiento génico postranscripcional. Contrario a lo que se obtuvo en este estudio, se ha reportado una mayor expresión de miR-100-5p en los astrocitomas y ependimomas en comparación con los meduloblastomas (Eguia, et al. 2017), pero esta reportado que en células tipo célula madre en cáncer de próstata relativamente resistentes a la radioterapia y en cáncer de próstata resistente a la castración, el miR-100-5p está menos expresado (Li, et al, 2015), como en nuestro estudio.

MicroRNA-124-3p igual a lo demostrado en este estudio, está reportado que actúa como supresor tumoral, reprimiendo el crecimiento celular y la motilidad celular dirigiéndose a EphA2 en gliomas. (Wu, et al , 2018), regula la proliferación celular, la invasión, promueve la apoptosis al tener como blanco al oncogen PIM1 en el astrocitoma (Deng et al 2016), afecta la proliferación, migración y apoptosis de células de cáncer de vejiga a través de AURKA. (Yuan et al, 2017).

miRNA -128- se encuentra abundantemente en el cerebro y normalmente participa en el desarrollo del sistema nervioso y en el mantenimiento de las funciones fisiológicas neuronales. En las células tumorales de gliomas, la desregulación de miR-128 tiene efectos profundos sobre la génesis neoplásica y el mantenimiento de las células tumorales a través de alteraciones en la proliferación celular, diferenciación, metabolismo y apoptosis. El uso de miR-128 como herramienta diagnóstica y o terapéutica puede resultar en mejoras en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento de numerosos cánceres, incluyendo el TR/TA.

La regulación negativa de miR-221-3p y la regulación positiva de su gen objetivo PARP1 son biomarcadores pronósticos para pacientes con cáncer de mama triple

negativo y se asocian con un pronóstico desfavorable (Deng, et al, 2017), y aumenta la proliferación, invasión y migración de células de osteosarcoma en parte a través de la regulación negativa de PTEN (Zhu, et al, 2015).

Está demostrado que la menor expresión de los mencionados miRNAs, se asocia a un peor pronóstico y mayor resistencia al tratamiento de otras neoplasias, dada la escasa literatura disponible del TR/TA y su asociación con estos miRNAs, consideramos que este puede ser un punto de partida para desarrollo de bases diagnósticas utilizándolos como biomarcadores pronósticos en el TR/TA y a su vez, para la posterior investigación de posibles terapias blanco.

En este estudio se evaluó la expresión de ocho genes blanco de estos microRNAs y se intentó correlacionar la expresión entre ellos. En la mayoría de los casos la correlación es negativa debido a que los microRNAs se unen a sus genes blanco y disminuyen la traducción, esto es, la síntesis de la proteína.

En la mayoría de los casos la expresión del RNAm también disminuye, pero en otros no.

En el caso de miR-100 se evaluaron como blancos los RNAm de SMARCA5 Y AP1AR, en los TR/TA su expresión fue alta en ambos casos, la sobre expresión de SMARCA5 se asocia con el Ewing extraesquelético y el síndrome de Williams-Beuren, así como la proliferación celular y la migración en el cáncer de mama. Por otro lado AP1AR se sobre expresa en carcinomas hepatocelulares y una fracción de cáncer colorrectal, algunos gliomas y linfomas.

miR- 124 tiene como blanco a: MYCN y AURKA, en los TR/TA la expresión fue disminuida para MYCN y aumentada para AURKA. El gen N-MYC desempeña funciones importantes en la proliferación y la apoptosis, su expresión, al estar la baja en los TR/TA difiere de los neuroblastomas, en donde se amplifica con frecuencia y otorga peor pronóstico. Al igual que en el TR/TA, AURKA se sobre expresa en el cáncer de mama, y controla la renovación de las células que inician el cáncer de mama y promueve la estabilización de wnt3a mediante la supresión de

miR-128 (V. Eterno, et al, 2016), y desempeña un doble papel en la migración y la supervivencia de las células de glioblastoma humano según la concentración de CXCL12. (Willems E, et al 2019)

miR-128 tiene como blanco a: SUZ12 y SOX2 en los TR/TA su expresión fue disminuida para SUZ12 y aumentada para SOX2. Está descrito que la regulación negativa de SUZ12 acelera la migración y la invasión de células de cáncer de hígado mediante la activación de la vía ERK1 / 2 (Xue, et al, 2019), y SOX2 sobre expresado en el astrocitoma, tuvo un pronóstico desfavorable y una respuesta clínica deficiente al protocolo terapéutico actual (Abdelrahman, et al, 2018), de la misma manera que TR/TA tiene mala respuesta y mal pronóstico. SOX2 en condiciones normales produce una proteína que es necesaria para el mantenimiento de las células madre en el sistema nervioso central.

miR-221 tiene como blanco a SOX10 y GLI2 en los TR/TA su expresión fue disminuida para SOX10 y aumentada para GLI2. el SOX10 puede actuar tanto como un oncogén como un supresor de tumores dependiendo del origen del tumor, en el TR/TA actuó como supresor, se ha informado que SOX10 posee actividades promotoras de tumores en melanoma y gliomas, SOX10 suprimió la señalización de  $\beta$ -catenina, así como la transición epitelial-mesenquimatosa y la potencia de las células tumorales, lo que conduce aún más a la inhibición de la migración / invasión de células tumorales (Xu et al, 2016). Mientras que GLI2 actuó como oncogen, como está reportado en el carcinoma embrionario, las proteínas de dedo de zinc de la familia GLI son mediadoras de la señalización de Sonic hedgehog (SHH) y están implicadas como oncogenes potente, igualmente está reportado que en el 60% meduloblastoma subtipo SHH hay actividad aumentada del GLI2. ( Yin et al 2019) (OMIM 165230).

Respecto a la mayoría de los tejidos de los controles, no fue posible extraer RNA en cantidad y calidad suficiente para la amplificación, debido a que estos tejidos de autopsia tuvieron una fijación prolongada en formaldehído, y esto desnatura el RNA. El formaldehído contiene un grupo carbonilo que reacciona para formar bases de Schiff con los grupos imino o amino de guanina, adenina y citosina. Estos aductos covalentes previenen el apareamiento normal de bases y mantienen el ARN en un estado desnaturado (Rio, 2015)

### **Conclusión**

Los resultados sugieren que la menor expresión de los mencionados miRNAs, se asocia a un peor pronóstico y mayor resistencia al tratamiento de otras neoplasias, dada la escasa literatura disponible del TR/TA y su asociación con estos miRNAs, consideramos que este puede ser un punto de partida para desarrollo de bases diagnósticas utilizándolos como biomarcadores pronósticos en el TR/TA y a su vez, para la posterior investigación de posibles terapias blanco.

### **Cronograma de actividades**

Fecha de inicio del protocolo: junio 2018

Búsqueda de tema y referencias: junio 2018 a diciembre 2018

Búsqueda de base de datos: diciembre 2018 a enero 2019

Exposición de tema de tesis: diciembre 2018

Desarrollo de protocolo de investigación: octubre 2018 a febrero 2019

Procesamiento de tejidos y análisis de datos: enero 2019 a marzo 2019

Elaboración del análisis estadístico, conclusiones y formato final: marzo 2019

Entrega de tesis: 24 Mayo 2019

## Referencias bibliográficas

1. Pascal D. J., Erkek S., et al, (2016) Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumors Are Comprised of Three Epigenetic Subgroups with Distinct Enhancer Landscapes. *Cancer Cell*, 29 (3) 379-393. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.001>
2. Braoudaki, M., Lambrou, G. I., et al. (2014), MicroRNA expression signatures predict patient progression and disease outcome in pediatric embryonal central nervous system neoplasms. *Journal of Hematology & Oncology*,7,(96). <http://doi.org/10.1186/s13045-014-0096-y>.
3. Hayes J, Peruzzi P.P., Lawler S. (2014). MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 20 (8) 460-469. <http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2014.06.005>
4. Biswas, A., Kashyap, L., et al. (2016). Atypical teratoid/rhabdoid tumors: challenges and search for solutions. *Cancer Management and Research*, 8, 115–125. <http://doi.org/10.2147/CMAR.S83472>
5. Frühwald M.C., Biegel J.A., et al. (2016) Atypical teratoid/rhabdoid tumors—current concepts, advances in biology, and potential future therapies, *Neuro-Oncology* 8, (6) 764–778, <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov264>
6. Din, N. U., Barakzai, A., et al. (2017). Atypical Teratoid/ Rhabdoid Tumor of Brain: a Clinicopathologic Study of Eleven Patients and Review of Literature. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 18(4), 949–954. <http://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.4.949>.
7. Cicero-Onetoa C, Zapata-Tarrés M., Tumores sólidos malignos neonatales en el Hospital Infantil de México Federico Gómez. Experiencia de 69 años. (2013) *Gaceta Mexicana de Oncología*, 12 (3):143-149
8. Roberts, C. W. M., & Biegel, J. A. (2009). The role of SMARCB1/INI1 in development of rhabdoid tumor. *Cancer Biology & Therapy*, 8(5), 412–416.

9. Sredni, S.T., Bonaldo, M.F., et al. (2010), Upregulation of mir-221 and mir-222 in atypical teratoid/rhabdoid tumors: potential therapeutic targets. *Child's Nervous System* 26 (3) 279-283. <https://doi.org/10.1007/s00381-009-1028-y>
10. Nemes K, Bens S, Bourdeaut F, et al. Rhabdoid Tumor Predisposition Syndrome. (2017) Dec 7. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2018.
11. Eguía-Aguilar, P., Gutiérrez-Castillo, L., Pérez Peña-Díaz Conti, M. et al. *Childs Nerv Syst* (2017) 33: 2117. <https://doi.org/10.1007/s00381-017-3569-9>
12. Inamoto, T., Uehara, H., Akao, Y., Ibuki, N., Komura, K., Takahara, K., Azuma, H. (2018). A Panel of MicroRNA Signature as a Tool for Predicting Survival of Patients with Urothelial Carcinoma of the Bladder. *Disease markers*, 5468672. doi:10.1155/2018/5468672
13. Chen , P., Lin, C., Quan, J., Lai, Y., He, T., Zhou, L. Lai, Y. (2017). Oncogenic miR-100-5p is associated with cellular viability, migration and apoptosis in renal cell carcinoma. *Molecular Medicine Reports*, 16, 5023-5030. <https://doi.org/10.3892/mmr.2017.7139>
14. Wang , F., Liu, J., Zou, Y., Jiao, Y., Huang, Y., Fan, L. Sun, G. (2017). MicroRNA-143-3p, up-regulated in H. pylori-positive gastric cancer, suppresses tumor growth, migration and invasion by directly targeting AKT2. *Oncotarget*, 8(17), 28711–28724. doi:10.18632/oncotarget.15646
15. Louis, D. N., Perry, A., Reifenberger, G., Von Deimling, A., Figarella-Branger, D., Cavenee, W. K., Ellison, D. W. (2016). The 2016 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta neuropathologica*, 131(6), 803-820.

16. Lim, L. P., Lau, N. C., Weinstein, E. G., Abdelhakim, A., Yekta, S., Rhoades, M. W., Bartel, D. P. (2003). The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes & development*, 17(8), 991–1008. doi:10.1101/gad.1074403
17. Hammond S. M. (2015). An overview of microRNAs. *Advanced drug delivery reviews*, 87, 3–14. doi:10.1016/j.addr.2015.05.001
18. Wu Q, Xu L, Wang C, Fan W, Yan H, Li Q. (2018), MicroRNA-124-3p represses cell growth and cell motility by targeting EphA2 in glioma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018 Sep 18;503(4):2436-2442. doi: 10.1016/j.bbrc.2018.06.173.
19. Roy, B., Dunbar, M., Shelton, R. C., & Dwivedi, Y. (2016). Identification of MicroRNA-124-3p as a Putative Epigenetic Signature of Major Depressive Disorder. *Neuropsychopharmacology: official publication of the American College of Neuropsychopharmacology*, 42(4), 864–875. doi:10.1038/npp.2016.175
20. Yuan Q, Sun T, Ye F, Kong W, Jin H. (2017) MicroRNA-124-3p affects proliferation, migration and apoptosis of bladder cancer cells through targeting AURKA. *Cancer Biomark*. 2017;19(1):93-101. doi: 10.3233/CBM-160427.
21. Chan V, Marro A, Findlay J, Schmitt L, Das S. (2018) A Systematic Review of Atypical Teratoid Rhabdoid Tumor in Adults. *Frontiers in Oncology*. Vol 8. p567. doi=10.3389/fonc.2018.00567
22. PDQ. Pediatric Treatment Editorial Board. PDQ Childhood Central Nervous System Atypical Teratoid/Rhabdoid Tumor Treatment. Bethesda, MD: National Cancer Institute. <https://www.cancer.gov/types/brain/hp/child-cns-atrt-treatment-pdq>.
23. Zhang, F.; Wang, B.; Long, H.; Yu, J.; Li, F.; Hou, H.; Yang, Q. (2016) Decreased miR-124-3p Expression Prompted Breast Cancer Cell Progression Mainly by Targeting Beclin-1, *Clinical Laboratory* 62(6): 1139-1145.

24. Zhang, L., Chen, X., Liu, B., & Han, J. (2017). MicroRNA-124-3p directly targets PDCD6 to inhibit metastasis in breast cancer. *Oncology letters*, 15(1), 984–990. doi:10.3892/ol.2017.7358
25. Li B, Chen H, Wu N, Zhang WJ, Shang LX. (2014) Deregulation of miR-128 in ovarian cancer promotes cisplatin resistance. *Int J Gynecol Cancer*. Oct;24(8):1381-8. doi: 10.1097/IGC.0000000000000252.
26. Huang DQ, Guo P, Lv NH, Luo LY., (2015) MiR-128, a key regulator of oncogenic properties. *Mol Biol (Mosk)*. Jan-Feb;49(1):46-54.
27. Deng, L., Lei, Q., Wang, Y., Wang, Z., Xie, G., Zhong, X., ... Zheng, H. (2017). Downregulation of miR-221-3p and upregulation of its target gene PARP1 are prognostic biomarkers for triple negative breast cancer patients and associated with poor prognosis. *Oncotarget*, 8(65), 108712–108725. doi:10.18632/oncotarget.21561.
28. Wu Q, Ren Z, Zhang Y, Fu X, Li Y, Peng Y, Xiao Q, Li T, Ouyang C, Hu Y, Zhang Y, Zhou W, Yan W, Guo K, Li W, Hu Y, Yang X, Shu G, Xue H, Wei Z, Luo Y, Yin G. (2018) MiR-221-3p targets ARF4 and inhibits the proliferation and migration of epithelial ovarian cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 497, 4, 1162-1170. doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.002
29. Liu, T., Kang, J., & Liu, F. (2018). Plasma Levels of microRNA-221 (miR-221) are Increased in Patients with Acute Pulmonary Embolism. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research*, 24, 8621–8626. doi:10.12659/MSM.910893
30. Lodge, R., Gilmore, J. C., Ferreira Barbosa, J. A., Lombard-Vadnais, F., & Cohen, É. A. (2017). Regulation of CD4 Receptor and HIV-1 Entry by MicroRNAs-221 and -222 during Differentiation of THP-1 Cells. *Viruses*, 10(1), 13. doi:10.3390/v10010013

31. Zhu J, Liu F, Wu Q, Liu X. (2015) MiR-221 increases osteosarcoma cell proliferation, invasion and migration partly through the downregulation of PTEN *Int J Mol Med*. 2015 Nov;36(5):1377-83. doi: 10.3892/ijmm.2015.2352. Epub 2015 Sep 22.
32. Carol C. (2016) SWI/SNF-related, matrix-associated, actin-dependent regulator of chromatin, subfamily A, member 5; SMARCA5., <http://omim.org/entry/603375>
33. David S. Rickman, Johannes H. Schulte and Martin Eilers (2018), The Expanding World of N-MYC-Driven Tumors, *Cancer Discov* (8) (2) 150-163; DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-0273
34. Willems E, Dedobbeleer M, Digregorio M, Lombard A, Goffart N, Lumapat P, Lambert J, Van den Ackerveken P, Szpakowska M, Chevigné A, Scholtes F, Rogister B. (2019) Aurora A plays a dual role in migration and survival of human glioblastoma cells according to the CXCL12 concentration. *Oncogene*, 38, 73–87
35. V. Eterno, A. Zambelli, L. Villani, A. Tuscano, S. Manera, A. Spitaleri, L. Pavesi y A. Amato, (2016) AurkA controls self-renewal of breast cancer-initiating cells promoting wnt3a stabilization through suppression of miR-128. *Scientific Reports*, vol 6, Article number: 28436
36. Li H., Wang J., Mor G., Sklar J (2008). A neoplastic gene fusion mimics trans-splicing of RNAs in normal human cells. *Science* 321:1357-1361(2008)
37. Xu L, Shi T, Ma X, Li H, Wang B, Ai X, Lu J, Liu Q, Xu A, Zhang X (2016) Epigenetically induced silence of SOX10 promotes tumor proliferation and invasion in bladder cancer *Int J Clin Exp Pathol* 2016;9(7):6913-6920
38. Yin W, Satkunendran T, Mo R, Morrissy S, Zhang X, Huang E, Uusküla-Reimand L, Hou H, Son J, Liu W, Liu Y, Zhang J, Parker J, Wang X, Farooq H, Selvadurai H, Chen X, Ngan E, Cheng S, Dirks P, Angers S, Wilson M, Taylor M, Hui Ch, (2019) Dual Regulatory Functions of SUFU and Targetome of GLI2 in SHH Subgroup Medulloblastoma. *Developmental Cell*, Volume 48, Issue 2, 28 January 2019, Pages 167-183.e5.

39. Abdelrahman AE, Ibrahim HM, Elsebai EA, Ismail EI, Elmesallamy W. (2018). The clinicopathological significance of CD133 and Sox2 in astrocytic glioma. *Cancer Biomark.* 2018;23(3):391-403. doi: 10.3233/CBM-181460.
40. Rio DC. (2015). Denaturation and electrophoresis of RNA with formaldehyde. *Cold Spring Harb Protoc.* 2015 Feb 2;2015(2):219-22. doi: 10.1101/pdb.prot080994.
41. Xue, C., Wang, K., Jiang, X., Gu, C., Yu, G., Zhong, Y., ... Yang, H. (2019). The Down-Regulation of SUZ12 Accelerates the Migration and Invasion of Liver Cancer Cells via Activating ERK1/2 Pathway. *Journal of Cancer*, 10(6), 1375–1384. doi:10.7150/jca.29932

### **Limitación del estudio**

Material con RNA insuficiente.

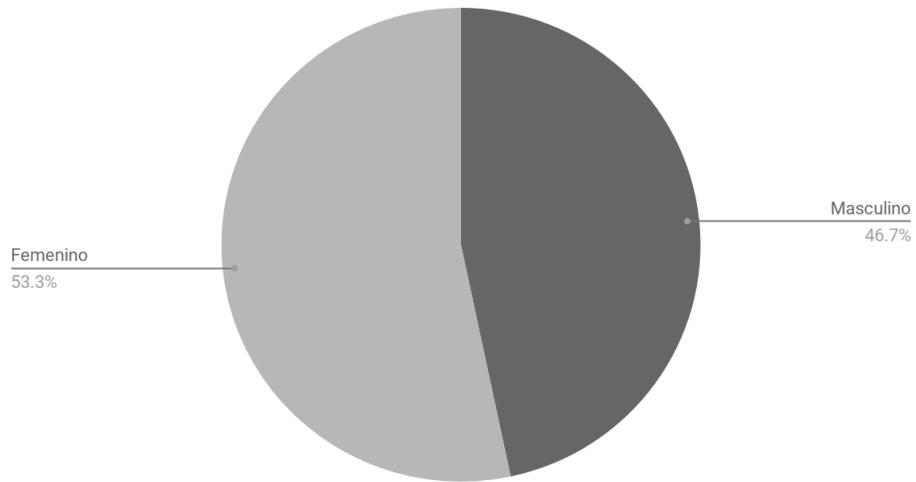
Material con necrosis extensa (tejido neoplásico viable en menos del 10%)

Disponibilidad de tejidos en buen estado para la extracción de ARN en cantidad y calidad adecuada.

Tiempo de procesamiento de las muestras, con dependencia de terceros.

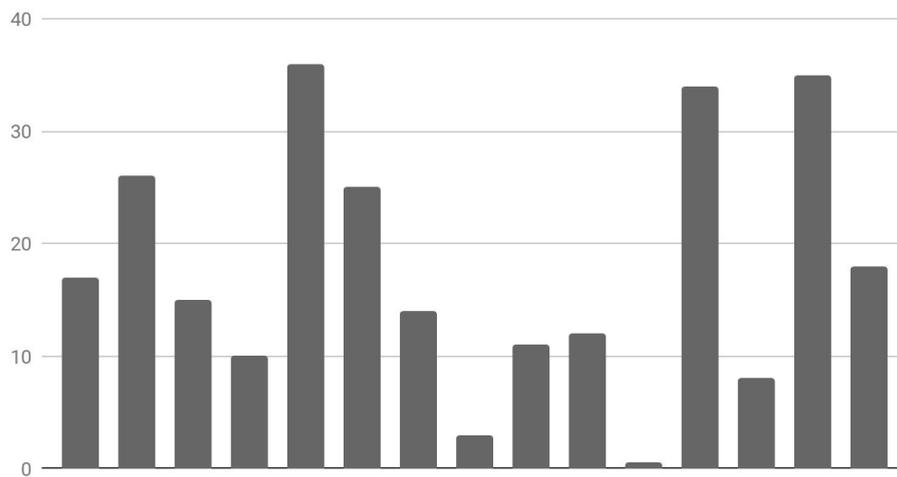
## Anexos

Relación masculino: femenino



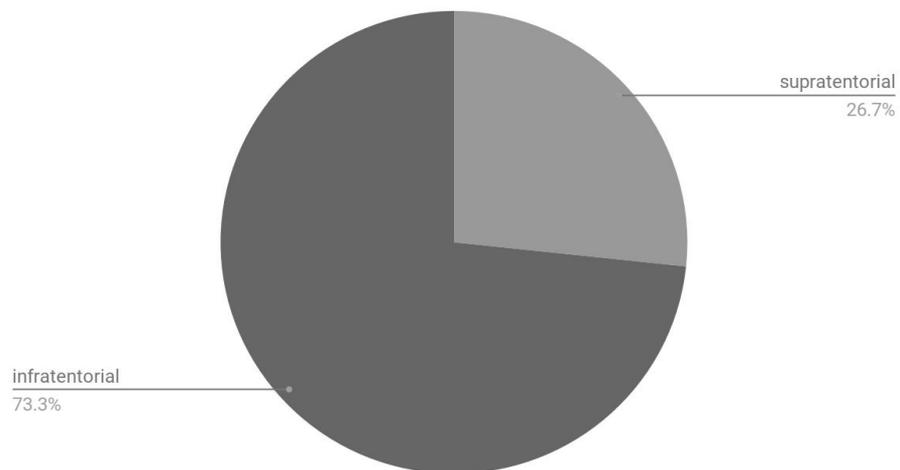
Gráfica 1.

Meses

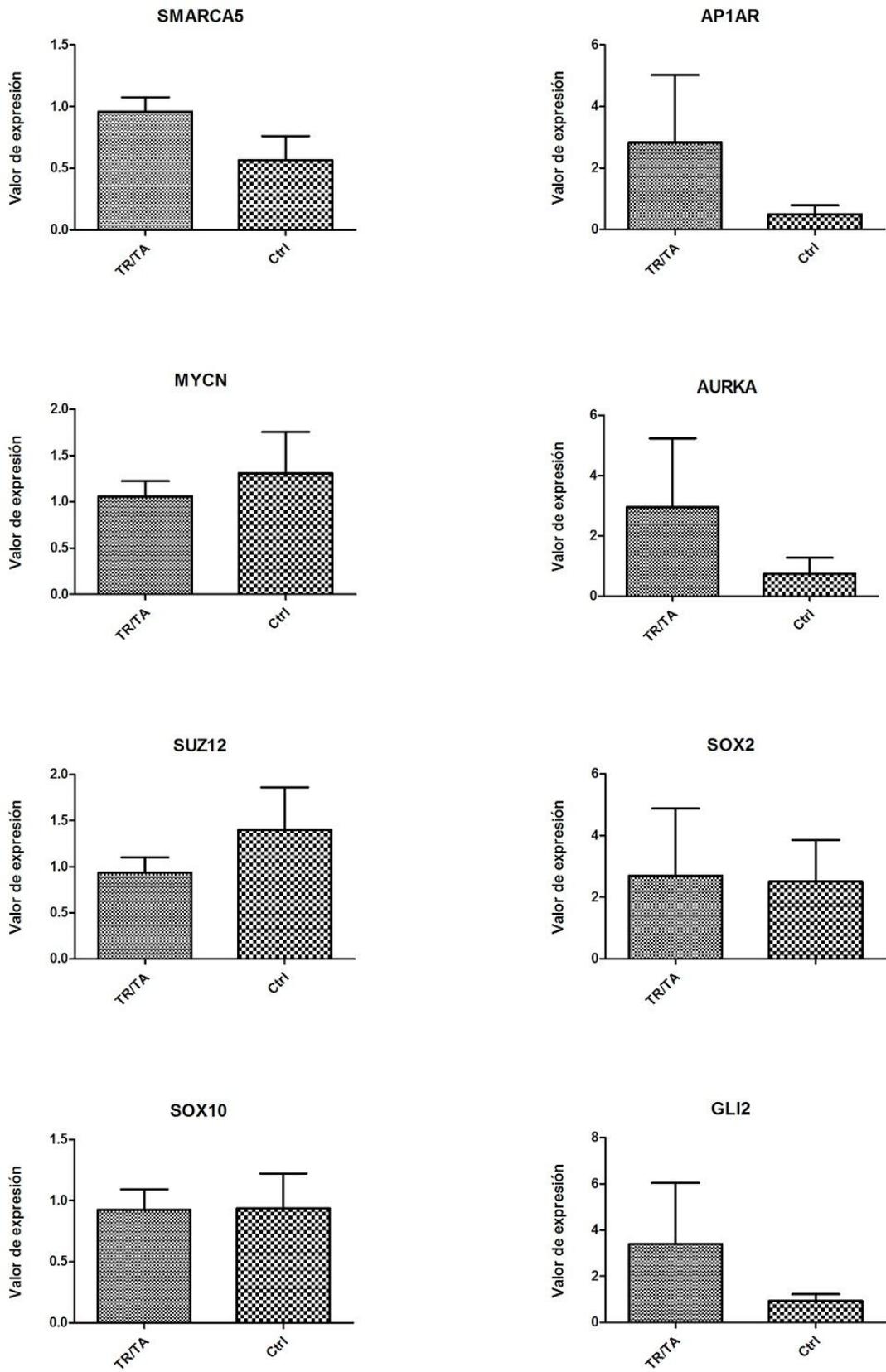


Gráfica 2.

### Localización



Gráfica 3.



Gráfica 4.

Caso	SMARCA5	AP1AR	MYCN	AURKA	SUZ12	SOX2	SOX10	GLI2
1	1.68	1.64	0.77	0.00	1.47	0.79	0.39	0.65
2	1.1	0.59	1.47	0.42	1.11	0.56	0.90	0.42
3	1.23	3.58	1.37	5.42	0.56	3.29	0.80	5.93
4	0.74	22.31	1.76	20.53	1.63	22.16	1.82	26.72
5	0.87	0.12	1.06	0.14	1.17	0.08	0.90	0.13
6	0.94	0.041	1.43	0.01	1.45	0.03	1.56	0.00
7	0.93	0.00	0.07	0.00	0.54	0.00	0.02	0.00
8	1.17	0.00	1.32	0.00	0.77	0.01	1.25	0.00
9	0.44	0.00	0.88	0.00	0.61	0.00	0.67	0.00
10	0.45	0.00	0.43	0.00	3.55	0.00	0.90	0.00
Control	0.56	0.49	1.30	0.73	1.40	2.51	0.93	1.71

Tabla 1. Cuantificación relativa (2-DCt) de genes blanco en tumores TR/TA y valores promedio de casos control.