



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE CIUDAD VICTORIA

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA

Tesis

***Identificación de RNAs no codificantes en exosomas circulantes
de pacientes pediátricos con astrocitoma***

Para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOLOGÍA

Que presenta

Juan Manuel Rodríguez Corona

G-17380867

Director de Tesis:

Dr. Jorge Víctor Horta Vega

Codirector de Tesis

Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores

Ciudad Victoria, Tamaulipas

Diciembre, 2023

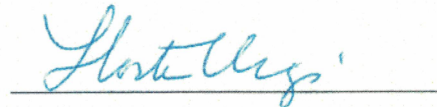


Como miembros del Comité Tutorial certificamos que la tesis desarrollada por el **C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CORONA**, con el título:

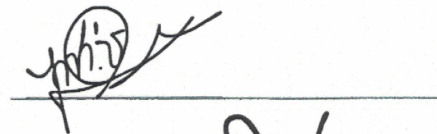
**IDENTIFICACIÓN DE RNAs NO CODIFICANTES EN EXOSOMAS CIRCULANTES DE PACIENTES
PEDIÁTRICOS CON ASTROCITOMA**

Se presenta como uno de los requisitos para obtener el Grado de Doctor en Ciencias en Biología y cumple con los criterios expresados en los Lineamientos para la Operación de Estudios de Posgrado del Tecnológico Nacional de México.

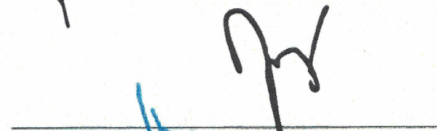
Presidente: **C. JORGE VÍCTOR HORTA VEGA**
Director de Tesis



Secretario: **C. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES**
Co-Director



Tutora 1: **C. RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO**



Tutor 2: **C. CRYSTIAN SADIEL VENEGAS BARRERA**



Tutor 3: **C. JUAN FLORES GRACIA**



Tutor suplente 4: **C. AUSENCIO AZUARA DOMÍNGUEZ**



Comité aprobado por el Claustro Doctoral


C. Ausencio Azuara Domínguez
Jefe de la División de Estudios de Posgrado e Investigación

Diciembre 2023

ccp.- Archivo. DEPI. ITC Victoria.





CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Tecnológico Nacional de México, campus Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria, el que suscribe, **C. JUAN MANUEL RODRÍGUEZ CORONA** como estudiante del Doctorado en Ciencias en Biología de esta Institución, con No. de Control G-17380867, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas o académicas, de procedencia nacional o internacional, que deriven del trabajo de investigación que realicé bajo la dirección del Profesor **C. Jorge Víctor Horta Vega**. Por tal motivo, **OTORGO LOS DERECHOS DE AUTORÍA DE MI TESIS "IDENTIFICACIÓN DE RNAs NO CODIFICANTES EN EXOSOMAS CIRCULANTES DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASTROCITOMA"** y de **LOS PRODUCTOS DE DICHA INVESTIGACIÓN** al Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria. Las patentes y secretos industriales que deriven de la tesis serán registrados a nombre del Tecnológico Nacional de México-Instituto Tecnológico de Ciudad Victoria y las regalías económicas distribuidas equitativamente entre esta Institución, el Director de la Tesis y quien suscribe, de acuerdo con las negociaciones entre las tres partes. También, **ME COMPROMETO A NO REALIZAR NINGUNA ACCIÓN** que dañe el proceso de aprovechamiento comercial de dichos productos a favor de ésta misma Institución.

Ciudad Victoria, Tamaulipas, México, a 17 de noviembre de 2023.

C. Juan Manuel Rodríguez Corona

Vo. Bo.

C. Jorge Víctor Horta Vega





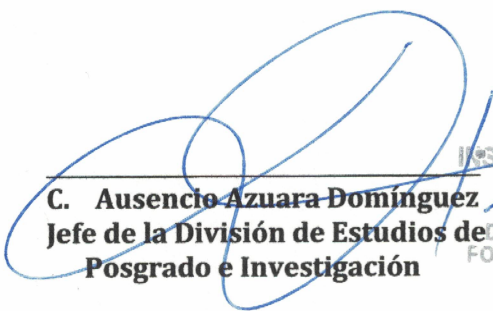
CERTIFICADO

C. Juan Manuel Rodríguez Corona
Estudiante del Doctorado en Ciencias en Biología
Presente

Resulta grato informar a Usted, que después de haber realizado un contraste entre los trabajos publicados y su tesis desarrollada en este instituto: **"IDENTIFICACIÓN DE RNAs NO CODIFICANTES EN EXOSOMAS CIRCULANTES DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON ASTROCITOMA"**, se encontró que el contenido de su trabajo presenta una similitud del 1.0 % con respecto a otros textos, producto del análisis desarrollado en el portal <https://tecnm.turnitin.com/>. El límite máximo acordado por el Consejo de Posgrado es del 25%.

Por tal motivo, se le extiende el presente **CERTIFICADO DE NO PLAGIO** en Ciudad Victoria, Tamaulipas, a los diecisiete días del mes de noviembre de dos mil veintitrés.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
"Verdad, Honestidad y Servicio"


C. Ausencio Azuara Domínguez
Jefe de la División de Estudios de
Posgrado e Investigación




C. Crystian Sadiel Venegas Barrera
Coordinador Doctorado en Ciencias
en Biología



AGRADECIMIENTOS

A los investigadores que me respaldaron y participaron este trabajo en general.

A los directores de tesis Dr. Jorge Víctor Horta Vega y Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores, la asesora externa Dra. Ruth Ruiz Esparza-Garrido y los investigadores miembros del comité académico que supervisaron mi trabajo de tesis: Dr. Juan Flores Gracia, Dr. Crystian Sadiel Venegas Barrera y al Dr. Ausencio Azuara Domínguez.

En particular quiero mucho agradecer al Dr. Jorge Víctor, pues su capacidad de análisis de los fenómenos naturales y su flexibilidad mental entre otras cosas, que ha hecho posible la implementación de un trabajo enfocado hacia la medicina pediátrica y ciencias biológicas de frontera y además por su gran paciencia hacia mi persona.

A la Dra. Ruth y el Dr. Miguel mi agradecimiento por todo el tiempo y paciencia para la revisión de escritos y datos que juntos hemos trabajado estos últimos casi 10 años. Mi admiración por su sencillez y su trato accesible y su capacidad de ver nuevas perspectivas en la ciencia.

Al Dr. Crystian Sadiel por sus importantes correcciones y sugerencias para mejorar el trabajo, al igual que el Dr. Juan Flores Gracia quien además fue mi profesor desde licenciatura que afortunadamente estudié aquí mismo en el ITCV. De igual forma se agradecen las atenciones recibidas por parte del Dr. Ausencio tanto académicas como logísticas y un agradecimiento también al Dr. Alfonso Correa Sandoval quien fungió como miembro del comité y realizó aportaciones muy interesantes al trabajo y también fue mi profesor en licenciatura.

Institucionalmente se agradece al Tecnológico Nacional de México todo el apoyo otorgado para el desarrollo de mis estudios e investigaciones en el Tecnológico de Ciudad Victoria, de esta forma incluyo no solo al personal académico y docente sino también el directivo, administrativo y operativo.

A la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, en donde se realizaron los experimentos de microarreglos y aislamiento de exosomas.

Al gobierno de México al otorgarme una beca mediante CONACYT (472835), ahora CONAHCYT, para el desarrollo de este trabajo.

Agradezco principalmente a un poder superior fuera de nuestra comprensión, que según percibo yo debo regir en medio del aparente caos e influye en nosotros todo el tiempo.

Actividades y Publicaciones Durante el Doctorado

Actividades:

Docente invitado en el curso de RNAs no codificantes en FES Iztacala UNAM con los temas: Análisis de datos masivos, herramientas de análisis de secuencias proteicas y genómicas, algoritmos para predicción de interacciones de miRNAs y Modelaje estructural de proteínas por homología y "*ab initio*" (Julio de 2019).

Catedrático de asignatura en UVM de las asignaturas de Biología celular, Biología Molecular, Agresión y defensa en medicina humana en la carrera de medicina (2018-2022).

Catedrático de asignatura de los cursos de Física aplicada a la biotecnología, introducción a las ciencias biotecnológicas y la asignatura de biotecnología en la carrera de QFBT (2018-2022).

Estancia de investigación de movilidad nacional CONACYT Julio 2019 (Laboratorio de Genómica Funcional en la Unidad de Investigación en Genética Humana, CMN SXXI).

Publicaciones:

M. Á. Velázquez-Flores, J. M. Rodríguez-Corona, J. E. López-Aguilar, G. Siordia-Reyes, G. Ramírez-Reyes, G. Sánchez-Rodríguez & R. Ruiz Esparza-Garrido. (2020). Noncoding RNAs as potential biomarkers for DIPG diagnosis and prognosis: XIST and XIST-210 involvement. *Clinical and Translational Oncology*. DOI: 10.1007/s12094-020-02443-2.

J. M. Rodríguez-Corona, R. Ruiz Esparza-Garrido, J. V. Horta-Vega & M. Á. Velázquez-Flores. (2023). Circulating Y-RNAs: A Predicted Function Mainly in Controlling the Innate Immune System, Cell Signalling and DNA Replication in Paediatric Patients with Pilocytic and Diffuse Astrocytoma. *Clinical Pediatrics*. DOI: 10.35248/2572-0775.23.8.239.

ÍNDICE GENERAL

SECCIÓN	Pag.
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. ANTECEDENTES	4
3.1 Dogma central de la biología celular en la actualidad.	5
3.2 RNAs no codificantes.	6
3.3 Vesículas extracelulares (EVs) y exosomas.	31
3.4 Biomarcadores en el cáncer.	37
4. ARTÍCULO PUBLICADO	41
5. JUSTIFICACIÓN	56
6. HIPÓTESIS	57
7. OBJETIVO GENERAL	58
7.1 Objetivos específicos	58
8. MATERIALES Y MÉTODOS	59
8.1 Muestras.	59
8.2 Microarreglos de expresión HTA 2.0. (Human Transcriptome Array 2.0) GeneChip®	60
8.3 Aislamiento de exosomas y purificación de RNA.	60
8.4 Metodología bioinformática.	61
9. RESULTADOS	72
9.1 Microscopía electrónica.	72
9.2 Expresión diferencial del transcriptoma de exosomas circulantes.	73
9.3 Expresión diferencial y filtración de datos.	77
9.4 Biomarcadores moleculares de astrocitomas.	79
9.5 Análisis con miRNAatap.	81
9.6 Análisis con miRPathDB.	82
9.7 Simulaciones de interacción de piRNAs sobreexpresados.	84
10. DISCUSIÓN	90
11. CONCLUSIONES	109

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110
13. SITIOS WEB Y BASES DE DATOS	140
14. ABREVIATURAS	141
APÉNDICE 1	143
APÉNDICE 2	151
APÉNDICE 3	156

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Pag.
Figura 1. Ejemplos de funciones de los lncRNAs.	7
Figura 2. Procesos celulares regulados por los LncRNAs.	7
Figura 3. Interacciones tambaleantes o “Wobble” en moléculas de RNA.	13
Figura 4. Matriz de bases de pares potenciales.	15
Figura 5. Solución de plegamiento probable de un RNA pequeño.	15
Figura 6. Biogénesis general de los miRNAs.	17
Figura 7. Dominios funcionales de los Y-RNAs.	25
Figura 8. Exosomas aislados de suero de pacientes con Astrocitomas pediátricos pilocítico o difuso).	72
Figura 9. Expresión diferencial secretómica de ncRNAs obtenida por microarreglos HTA 2.0.	75
Figura 10. Expresión diferencial en exosomas de p-Ast difusos vs p-Ast pilocíticos.	78
Figura 11. Diagrama de Venn, miRNAs sobreexpresados en p-Ast.	79
Figura 12. Diagrama de Venn de miRNAs subexpresados en p-Ast.	80
Figura 13. Diagrama de Venn de lncRNAs sobreexpresados en p-Ast.	80
Figura 14. Procesos biológicos para los miRNAs sobreexpresados en pilocíticos respecto a difusos.	83
Figura 15. Procesos biológicos para los miRNAs sobreexpresados en difusos respecto a pilocíticos.	83

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas	Pag.
Tabla 1. Tipos de ncRNAs existentes.	22
Tabla 2. Muestras usadas para aislamiento de exosomas en el presente estudio.	59
Tabla 3. Procesamiento de secuencias de Y-RNAs para obtener dominios asa “loop” usados en simulaciones.	64
Tabla 4. Expresión diferencial transcriptómica total en exosomas de suero de pacientes con Ast respecto a la condición control y entre los distintos tipos de tumor.	74
Tabla 5. Identificación de los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (control vs pilocítico) por tipo de RNAs, candidatos a biomarcadores en secretoma de Ast.	75
Tabla 6. Identificación de los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (control vs difuso) por tipo de RNAs, candidatos a biomarcadores en secretoma de Ast.	76
Tabla 7. Identificación de los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (difuso vs pilocítico) por tipo de RNAs, candidatos a biomarcadores en secretoma de Ast.	76
Tabla 8. Análisis de miRNAs sobreexpresados en el grupo difuso respecto al grupo pilocítico (miRNA_{atap}).	81
Tabla 9. Análisis de miRNAs subexpresados en el grupo difuso respecto al grupo pilocítico (miRNA_{atap}).	82
Tabla 10. Los miRNAs sobreexpresados en exosomas difusos y genes blanco-validados experimentalmente.	84
Tabla 11. Nivel de expresión y secuencias de piRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change).	85
Tabla 12. Nivel de expresión y secuencias de piRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change)	86
Tabla 13. Interacciones con transcritos vs piRNAs sobreexpresados de exosomas de Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change) y con el parámetro de energía libres normalizada (ndG).	86
Tabla 14. Interacciones de transcritos vs piRNAs sobreexpresados de (exosomas de Ast pilocíticos). Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change) y con el parámetro de energía libres normalizada (ndG).	88

1. RESUMEN

Antecedentes. La expresión diferencial de distintos tipos de ncRNAs se ha asociado con algunos tipos de cáncer. La amplia información de la actividad reguladora de estos RNAs, ha conducido a proponer que pudieran ser secretados por células malignas y vía sanguínea generar cambios metabólicos o genéticos en otros tejidos. La secreción celular puede ocurrir por exocitosis o a través de exosomas, que son vesículas con diverso contenido molecular, incluyendo ácidos nucleicos.

Objetivo. Caracterizar la expresión diferencial del transcriptoma global de pacientes pediátricos con astrocitoma pilocítico o difuso, a partir de exosomas aislados del suero sanguíneo.

Métodos. La expresión de ncRNAs se determinó mediante el microarreglo Human Transcriptome Array (HTA) matrices 2.0. Las muestras fueron contenidos de exosomas provenientes de suero de pacientes pediátricos con diagnóstico de astrocitoma pilocítico y difuso. Además, se realizó una aproximación bioinformática de las posibles funciones biológicas de ncRNAs con los algoritmos Random Forest (RF) y Vector Support Machine (VSM).

Resultados. Se logró determinar con relativa precisión el contenido cualitativo y cuantitativo para la expresión diferencial de las muestras del secretoma de las dos condiciones de Ast con respecto al control. Los datos obtenidos muestran una enorme diversidad de transcritos que cambian sus niveles relativos de expresión, destacando notablemente los miRNAs, snoRNAs, snRNAs Y-RNAs y piRNAs. Adicionalmente una gran variedad de mRNAs muestran desregulación. Particularmente, los Y-RNAs podrían estar implicados la activación-supresión inmunitaria, vías de señalización, transcripción selectiva y proliferación celular a través de la replicación del DNA.

Conclusiones. Se confirma la hipótesis de que en estos pacientes con astrocitoma existe un contenido diferencial de transcritos a nivel de exosomas debido a la liberación de estos por células tumorales, los cuales representan una circulación importante de transcritos con el potencial de regular diversos procesos biológicos en células cercanas o distales al tejido tumoral.

Palabras clave: Astrocitoma, Exosomas, RF, TOLL y Y-RNA.

ABSTRACT

Background: Differential expression of different types of ncRNAs has been associated with some types of cancer. The extensive information on the regulatory activity of these RNAs has led to the proposal that they could be secreted by malignant cells and via the bloodstream generate metabolic or genetic changes in other tissues. Cellular secretion can occur by exocytosis or through exosomes, which are vesicles with diverse molecular content, including nucleic acids.

Objective: To characterize the differential expression of the global transcriptome of paediatric patients with pilocytic or diffuse astrocytoma, from exosomes isolated from serum.

Methods. The expression of ncRNAs was determined using the Human Transcriptome Array 2.0. The samples were exosome contents from serum of paediatric patients diagnosed with pilocytic and diffuse astrocytoma. In addition, a bioinformatic approach to the possible biological functions of ncRNAs was carried out with the Random Forest (RF) and Vector Support Machine (VSM) algorithms.

Results. It was possible to determine with relative precision the qualitative and quantitative content for the differential expression of the secretome samples of the two Ast conditions with respect to the control. The data obtained showed an enormous diversity of transcripts that change their relative expression levels, notably miRNAs, snoRNAs, snRNAs Y-RNAs and piRNAs. Additionally, a wide variety of mRNAs showed deregulation. Particularly, Y-RNAs could be involved in immune activation-suppression, signalling pathways, selective transcription and cell proliferation through DNA replication.

Conclusions. The hypothesis is confirmed that in these patients there is a differential content of transcripts at the level of exosomes due to their release by tumour cells, which represent an important circulation of transcripts with the potential to regulate various biological processes in nearby or distal cells to tumour tissue.

Keywords: Astrocytoma, Exosomes, RF, TOLL and Y-RNA.

2. INTRODUCCIÓN

La biología molecular aborda temas diversos, entre ellos la expresión diferencial del genoma llama la atención. La información que proporciona inferirá diferencias entre organismos (humanos) sanos y enfermos (cáncer). Otros múltiples otros aspectos influyen sobre la expresión como: polimorfismos debidos a raza y género o el estado de desarrollo del organismo (embrión-infante-adulto-senescencia). A lo largo de los últimos años la tecnología para medir la expresión de transcritos de RNA se ha mejorado notablemente. Un ejemplo de ello son las técnicas de secuenciación masiva o de microarreglos de expresión del transcriptoma. En los últimos se hace uso de decenas de miles secuencias idénticas para medir el nivel de expresión de cada transcrito determinado. Todo esto produce información masiva de tipo cuantitativa (cantidad de transcritos) y cualitativa (tipo de ellos). Para poder analizar y procesar esta enorme cantidad de datos es necesario el empleo de técnicas bioinformáticas como minería de datos, programación orientada a objetos y simulaciones computacionales de interacción. En su conjunto estas técnicas proporcionan información respecto a estados patológicos determinados que serán útiles para propósitos su mejor diagnóstico y determinación de causas de ellos. Con el advenimiento de la biología molecular de RNAs no codificantes y el estudio del secretoma (información en exosomas) plantea una revolución en el mundo actual que proporcionara en su conjunto una mejor comprensión de los fenómenos biológicas a escala celular. Un desafío en integrar correctamente la información mediante el establecimiento de las redes de interacción entre los mismos RNAs y entre RNAs y proteínas, por ejemplo. Como cualquier nueva perspectiva en la ciencia hay que modificar nuestra manera de pensar y de interpretar los fenómenos biológicos. La información extraída así con técnicas experimentales es entonces complementada por las de análisis computacional “*in silico*”. Esto es posibles actualmente gracias el desarrollo de la microelectrónica, lenguajes de programación y el uso de potentes servidores web en todo el globo. Los superordenadores permiten inferir interacciones probables que a su vez podrán ser comprobada experimentalmente después de un tiempo, incluso las computadoras actuales con algo suficiente de velocidad y memoria permiten obtener simulaciones más o menos refinadas de ciertos fenómenos de interacción molecular.

3. ANTECEDENTES

Durante la segunda mitad del siglo XX se establece al DNA como el material hereditario (Cobb, 2017; Danylova & Komisarenko, 2020). Mediante un código genético (tripletes de nucleótidos) se traduce la información hacia proteínas procedente de secuencias de DNA. (Danylova & Komisarenko, 2020; Illana, 2014). El DNA en forma de cromosomas, codifica múltiples genes y sus variantes que una vez expresados perpetúan los sistemas ordenados biológicos vistos desde la entropía como en equilibrio estacionario, entendiendo esto como el tiempo en que se mantienen sistemas complejos con respecto a la tendencia al desorden en el cosmos (Ogryzko, 2008).

De esta forma existen distintos componentes celulares y relaciones metabólicas sofisticadas, que generan estructuras pluricelulares complejas, entre otros, como: plantas, hongos, vertebrados en general, pero en particular en la clase de los mamíferos, destacan aquí los primates son un orden interesante por su complejidad neurobiológica (Rilling, 2014; Schörnig & Taverna, 2021). Estos son constituidos de incuantificables células que mediante diferenciación y especialización tisular desarrollan funciones particulares, manteniendo así la homeostasis, mediante una expresión genética diferencial (Cobb, 2017). Los organismos en general crecen y se desarrollan mediante eventos de comunicación intercelular muy variados, en el caso de los pluricelulares estos eventos son muy complejos y sincronizados temporalmente (Cobb, 2017). Los componentes como receptores y moléculas señal dan respuesta a múltiples estímulos, regulando así los flujos de materia y energía con el ambiente a su alrededor y controlando el crecimiento, migración y la proliferación celular entre otros procesos biológicos (Schörnig & Taverna, 2021). En biología molecular se hipotetizó por largo tiempo sobre cómo se mantenía la estructura y función celular y el “dogma central” establecía básicamente un flujo de información (Crick, 1970).



Simultáneamente a esto, se propuso al RNA como precursor de todas las formas de vida actuales en el planeta, hipótesis conocida como “Mundo del RNA”, postulada a finales de los sesenta en el siglo pasado, esta hipótesis propuso que formas auto replicables del RNA contenían información para lograr mecanismos de auto perpetuación que fueron previos al surgimiento de las primeras células (Crick, 1970; Dworkin et al., 2003; Bernhardt, 2012). Se desarrolló entonces la idea de que la información era acumulativa en el tiempo mediante

la formación de secuencias de RNA, pero aún más establemente en las de DNA (Bernhardt, 2012). Las funciones catalíticas y bioquímicas se relacionaban principalmente a las proteínas, las cuales tienen versatilidad en su arquitectura (Illana, 2014; Cobb, 2017). Así se estableció que el RNA funcionalmente sería el intermediario entre los genes (DNA) y las proteínas (Gilbert, 1986). Luego se calculó que el número de genes codificantes para proteínas era cercano a 20,000 lo que representa sólo cerca del 2% de las secuencias genómicas, lo cual se interpretó como muy bajo (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004). Además, se determinó en forma posterior que más del 80% del genoma se transcribe continuamente (Alexander et al., 2010). No obstante esto, se descartó todavía que los RNAs tuviesen funciones importantes a las ya conocidas: RNAs mensajeros (mRNAs), RNAs de transferencia (tRNAs), RNAs ribosomales (rRNAs) e incluso se consideraba que las RNA polimerasas como enzimas que solo transcribían genes de DNA que codificaba a estos productos (Struhl, 2007). Al final del siglo XX y más recientemente, mediante secuenciación masiva paralela se evidenció que una enorme proporción del genoma humano y de otros organismos era transcrito también, hacia lo que se denominó RNAs no codificantes (ncRNAs) (Struhl, 2007). Desde entonces se descartó la noción de que sólo una pequeña parte del genoma era funcionalmente activa (codificante para proteínas) y que no era *DNA basura*, como se le denominó erróneamente, se había asumido que la enorme transcripción detectada era solamente ruido transcripcional (Struhl, 2007).

3.1. Dogma central de la biología celular en la actualidad.

Hoy en día el dogma central parece obsoleto en gran medida, una gran deficiencia del mismo fue excluir a los RNAs que no codifican mensajeros y cuyos transcritos son mayores en número llevando a cabo una enorme cantidad de actividades regulatorias y funcionales diferentes, entonces así el panorama actual de la biología molecular y celular es mucho más complejo por las interacciones entre sí mismos de los ncRNAs, así como con el DNA y proteínas en aspectos de comunicación celular (Dworkin et al., 2003; Costa dos Santos et al., 2021). De este hecho se deriva el enorme interés reciente en la investigación de estos transcritos en el área médica y biológica en general (Costa dos Santos et al., 2021).

3.2. RNAs no codificantes.

lncRNAs

Los lncRNAs o RNAs largos no codificantes son la mayor clase de RNA no codificantes para proteínas (≥ 200 nt.) y su número de genes ha sido estimado conservadoramente en aproximadamente 16,000 en el genoma humano (GENECODE) (Harrow et al., 2012). Existe aún controversia respecto a esto pues algunos estudios muestran números elevados de hasta 90,000 lncRNAs (Iyer et al., 2015). El problema de la anotación de estas secuencias ha conducido a la creación de varias bases de datos de lncRNAs, ejemplos notables son lncRNAWiki que cuenta con curación manual y computacional (Ma et al., 2015). NONCODE es base de datos de 17 especies de las cuales el humano y ratón cuentan con más anotaciones (Fang et al., 2018). Los lncRNAs son bien descritos por su participación en la regulación de la actividad genómica a varios niveles, pueden regular la expresión de genes, cercanos físicamente al mismo alelo en *cis* o en *trans*, para controlar genes en locus de diferentes cromosomas, a través de los cuales estos pueden regular expresión genética a niveles diversos, como la transcripción, el procesamiento del RNA y la traducción (Elling et al., 2016). La mayoría de los lncRNAs están localizados en el núcleo (**Figura 1**), en el cual tienen funciones regulatorias múltiples tales como andamios de interacción para complejos modificadores de la estructura de cromatina, como reguladores transcripcionales, mediante su acoplamiento a factores de transcripción (**Figura 2**) (Rinn et al., 2007; Ulitsky & Bartel., 2013).

Los sitios de transcripción de los lncRNAs y los genes de la cadena opuesta están cercanamente localizados, en los lncRNAs Intrónicos estos transcritos se localizan en el intrón de un segundo transcrito, los intergénicas que se encuentran en el espacio genómico entre 2 genes (G. Chen et al., 2013; Ma et al., 2015). Estos lncRNAs se encontrado relacionados con varias condiciones fisiológicas y patológicas como adipogénesis, inflamación, diferenciación celular, y tumorigénesis. Además, su actividad se relaciona con modulación de la expresión genómica, modificación epigenética y regulación postranscripcional en *cis* y *trans* debido a su interacción con la cromatina, proteínas nucleares y RNAs tanto en núcleo como en citoplasma (G. Chen et al., 2013; Ma et al., 2015).

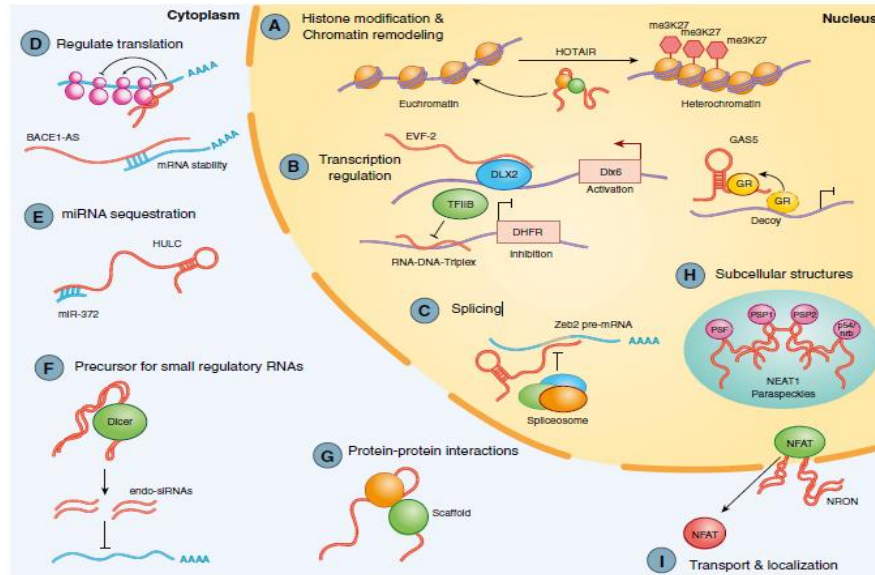


Figura 1. Ejemplos de funciones de los lncRNAs: A) modificación de histonas y remodelación de cromatina. B) Regulación de la transcripción C) Empalmosoma D) Regulación de transcripción E) Captura de miRNAs F) Como precursores de otros RNAs pequeños con función reguladora G) Andamios que median y facilitan interacciones entre proteínas H) Formación de estructuras subcelulares I) Mediadores de transporte y localización. Tomado de: “Environmental Health and Long Non-coding RNAs” (Karlsson & Baccarelli, 2016).

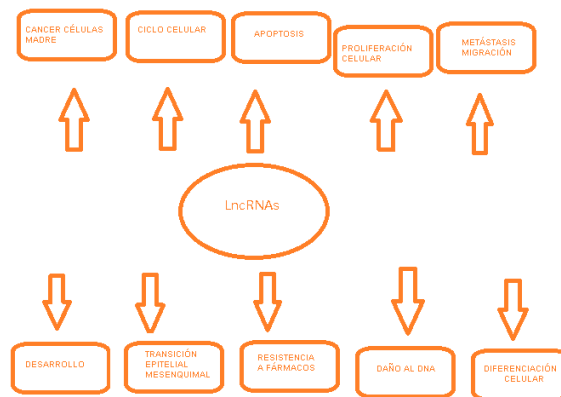


Figura 2. Procesos celulares regulados por los lncRNAs. Este tipo de RNAs no codificantes se ha encontrado asociado con numerosos procesos al interior de las células humanas desde la proliferación celular, migración y diferenciación entre otros.

En el núcleo los lncRNAs pueden modificar la expresión genética interactuando directamente con el DNA o los reguladores de la cromatina, como los factores de transcripción y proteínas de unión a RNA, actuando como potenciadores de la expresión genética o “enhancer”, andamios, anzuelos o guías. En el citoplasma los lncRNAs normalmente modulan el decaimiento de los mRNAs, así como su estabilidad en la traducción (Milligan & Lipovich, 2015). Algunos aspectos generales de las funciones y los procesos celulares regulados por lncRNAs son mostrados en las **Figuras 1 y 2**. Algunos son procesados para producir RNAs, otros absorben RNAs a modo de esponjas. Existe mucha evidencia de su expresión relacionada con enfermedades como el cáncer donde se expresan como oncogenes clásicos o supresores tumorales y se correlaciona con aspectos como transformación tumoral y migración (Ning et al., 2016).

Las importantes funciones desarrolladas por los lncRNAs se evidencian por su participación en múltiples redes de control de la expresión genética a niveles transcripcionales, post transcripcionales e incluso aspectos a niveles epigenéticos. Sin embargo, el significado biológico de la mayoría de los lncRNAs todavía deberá de ser elucidado pues se desconocen sus actividades precisas en la función celular. Es muy bien conocida la importancia de la biología del RNA en el sistema nervioso central (CNS) desde que las células nerviosas son altamente activas transcripcionalmente y exhiben una fuerte expresión de poblaciones de ncRNAs. En forma destacable está el cerebro como el órgano con una proporción mayor de lncRNAs expresados en una forma específica de tejido los cuales son expresados en forma preferencial en diferentes tipos celulares de regiones particulares (Mercer et al., 2008; Derrien et al., 2012). Estos lncRNAs en el sistema nervioso central participan en múltiples aspectos de la función cerebral y tienen influencia en patologías de enfermedades neurodegenerativas que investigan en forma intensiva (Cherubini et al., 2006; Kapranov et al., 2010; Qureshi & Mehler, 2012).

En comparación con los genes codificantes de proteínas los lncRNAs exhiben conservación de estructura secundaria y por ese motivo se ha pensado que se originan de diferentes vías evolutivas. Sus orígenes no son bien comprendidos debido al hecho de que los lncRNAs poseen bajo nivel de conservación de secuencias y tasas de evolución molecular altas en los mamíferos, se proponen actualmente varias hipótesis para explicarlo y son las siguientes:

Los lncRNAs podrían ser generados por metamorfosis de genes codificantes de proteínas a través de procesos de duplicación de genes.

Podrían haber surgido de evolución de otros segmentos completos o parciales procedentes de duplicación génica. Se pueden haber originado de *novο* por alteraciones a nivel genómico como rearrreglos cromosómicos, generación de sitios nuevos de splicing y promotores que pudieran transformar secuencias no funcionales en unas de lncRNAs que lo fuesen. Mediante la acción de elementos transposables también se podrían originar por inserciones los lncRNAs (Xing et al., 2014; Salameh et al., 2015; Wang et al., 2015). Sin embargo, se ha observado que solamente una minoría de los lncRNAs muestran similitud de secuencias a otros lncRNAs o a genes codificantes de proteínas en posiciones diferentes a elementos repetitivos, esto sugiere que los nuevos genes de lncRNAs se originan básicamente de *novο* de secuencias no exónicas o de duplicación de elementos tipo transposones (Derrien et al., 2012; Xing et al., 2014). Los lncRNAs y sus transcritos asociados tienen un contexto genómico demasiado heterogéneo en regulación ciclos de vida mecanismo de acción y perfiles funcionales. De forma amplia y general los lncRNAs se pueden clasificar basándose en su localización genómica con respecto a genes codificantes de proteínas (Qureshi & Mehler, 2012).

De acuerdo al proyecto GENCODE con respecto a las características generales de los lncRNAs a nivel de cerebro se puede afirmar que hay un 40% en proporción del total de entre 10,000 a 50,000 lncRNAs en el genoma humano en la anotación, este porcentaje representa aproximadamente de entre unos 4,000 hasta 20,000 lncRNAs que son específicos de tejido cerebral (Harrow et al., 2012). Si es comparado este número con el de los genes codificantes de proteínas que es de unos 20,000 a 25,000 en general este es extraordinariamente elevado y contrasta notablemente (Derrien et al., 2012; Harrow et al., 2012). Por lo tanto estos lncRNAs específicos del cerebro muestran elevados signos de conservación evolutiva en comparación con aquellos expresados en otros tejidos. Ciertos estudios bioinformáticos demostraron que los lncRNAs expresados en cerebro están enriquecidos en estructuras conservadas y por tal motivo es muy probable que desarrollen funciones conservadas evolutivamente (Ponjavic et al., 2009).

Además, los lncRNAs expresados en cerebro muestran una gran diferenciación en su expresión en cuanto a especificidad de localización temporal y espacial con respecto a los

mRNAs, numerosos estudios de transcriptoma revelan que varios lncRNAs son expresados diferencialmente en el tiempo y regiones tisulares específicas dentro del cerebro como el córtex, cerebelo e hipocampo entre otras durante los procesos de desarrollo y en adultos (Kadakkuzha et al., 2015; Lipovich et al., 2014; Milligan & Lipovich, 2015).

De los 62,700 genes anotados en el genoma humano, 19,396 son genes que codifican proteínas, 7,566 a ncRNA cortos y 19,922 a ncRNA largos, transcritos codificantes de proteínas 89,067, locus de transcritos de RNAs no codificantes 58,246 y pseudogenes 14,735.

Fuente (GENCODE v44 15-7-2023) <https://www.gencodegenes.org/human/stats/>

Estos últimos los ncRNAs largos o lncRNAs se pueden clasificar en 5 grandes grupos:

1. Intergénicos: Ubicados entre dos genes codificantes
2. Intrónicos: Ubicados en un intrón de un gen codificante
3. Antisentido: Ubicados en la hebra complementaria de un gen codificante
4. Bidireccionales: Transcritos desde un promotor, dirección opuesta a su gen codificante
5. Enhancers; Ubicados en regiones enhancer (Fernandes et al., 2019).

Normalmente los ncRNAs largos transcritos RNA Polimerasa II, tienen estructura Cap en 5' y cola poliA en 3'. Cada subclase tiene características que comparten y diferencian. Los ncRNA bidireccionales con un tamaño entre 200-600 nt y con estructura 5'-Cap y poliA. En cambio, los ncRNA "enhancers" o potenciadores poseen un tamaño menor a 2000 nt, estructura 5'-Cap, y son procesados por el complejo Integrador entonces carecen de cola poliA. Ambos tipos de ncRNAs son retenidos en el núcleo, tienen vida media corta y no se conocen bien sus funciones (Wu et al., 2017). Cerca del 50% de los ncRNA largos son Intergénicos (Ransohoff et al., 2018). Esta subclase es la más abundante y estudiada, algunos grupos de trabajo se refieren indistintamente a ncRNAs largos y ncRNAs largos intergénicos. Los ncRNA largos Intergénicos se localizan en núcleo y citoplasma, pero se encuentran más en el núcleo en comparación con los mRNA. Estos pueden sufrir o no splicing, son menos abundantes que los mRNAs y su expresión es altamente tejido-específica (Rinn & Chang., 2020). Tienen un tamaño de 1 kb, pero se describen hasta de 15 kb (Sunwoo et al., 2009). Los ncRNA antisentido tienen características similares a los ncRNAs Intergénicos, siendo la principal diferencia la región genoma de su codificación (Wu et al., 2017).

Los lncRNAs están también expresados en una forma muy específica de acuerdo al tipo de células, si es que son comparados con los genes codificantes de proteínas en las mismas, estudios desarrollados en neuronas corticales piramidales encontraron que 806 de 5,195 tienen expresión diferencial entre tipos neuronales, de los cuales un 55% son firmas particulares de tipo celular “signature cluster” un 32% de estos lncRNAs están relacionados a grupos independientes de tipo celular y un 10% del total se encuentran en forma mezclada entre grupos mezclados de tipo celular indicando su rol en especificación y mantenimiento e identidad celular particular (Molyneaux et al., 2016). Otra característica interesante de los lncRNAs específicos de cerebro es su localización preferencial en posición adyacente a genes codificantes de proteínas que son activos en la modulación transcripcional o en el desarrollo del sistema nervioso central (Ponjavic et al., 2009). Los análisis de secuenciación del transcriptoma durante la corticogénesis demuestran que la mayoría de los lncRNAs se traslapa con genes de tipo neurogénicos y comparten con ellos un patrón de expresión similar, indicando que los lncRNAs regulan la corticogénesis a través del ajuste de la expresión de determinantes de destino celular cercanos (Aprea & Calegari, 2015). Considerando la complejidad y la heterogeneidad en mamíferos en su (SNC) el cerebro debe ser considerado por lo tanto como el mayor repertorio de lncRNAs en comparación con otros tejidos somáticos y la especificidad de tejido de estos los hace contribuir enormemente a su destino celular mediante la especificación de linaje y mantenimiento de su identidad celular durante proceso de desarrollo del cerebro humano.

La determinación de las estructuras moleculares aproximadas de los RNAs es importante, pues de ello depende en gran parte establecer su función. Esta topología o estructura de plegamiento en 3 dimensiones esta influenciada por patrones de puentes de hidrógeno intramoleculares. La determinación del apareamiento de bases a partir de la secuencia primaria es conocida como predicción de plegamiento o de estructura secundaria (Zuker & Stiegler., 1981; Fallmann et al., 2017). Es un proceso no determinístico y polinomial en el tiempo y en bioinformática se llama un problema computacional completo (Vella., 1998). Al ser la estructura calculada muy fuertemente predictiva, en cuanto a sus funciones y propiedades bioquímicas, es necesario desarrollar predicciones en gran medida precisas por parte de los bioquímicos y biólogos moleculares. Muchos métodos distintos existen para muestrear eficientemente posibles patrones de estructura secundaria. Los más clásicos

consideran aspectos de programación dinámica y estudios recientes exploran estrategias basadas en algoritmos de aprendizaje de máquinas y evolutivos (Amaral et al., 2008). Las moléculas de RNA estructuralmente se pliegan en estructuras secundarias complejas, estas determinan sus propiedades moleculares como su estabilidad térmica y compactación. El plegamiento estructural es la base de sus funciones relacionadas con los aspectos biológicos esenciales como la traducción de proteínas, la regulación transcripcional, el empalme alternativo y muchos otros (Vella., 1998; Cooper & Hausman., 2007; Amaral et al., 2008). La estructura secundaria es importante al momento de diseñar moléculas sintéticas de RNA usadas en aplicaciones tales como experimentos de interferencia de RNA, fármacos, diseño de mensajeros de proteínas e incluso en el desarrollo de vacunas de mRNA (Cambray et al., 2018; Zhang et al., 2020). Existen interesantes métodos para determinar la estructura del RNA y se aplican en biotecnología, investigación básica y desarrollo de fármacos (Bringmann et al., 2019; L. Huang et al., 2019). Los de tipo experimental suelen ser muy caros y además laboriosos y tardados (Saha., 2017). Por esa situación son poco implementados. Una alternativa muy atractiva son los métodos computacionales los cuales pueden hacer predicciones muy precisas del plegamiento de un RNA, ejemplo un ncRNA basándose únicamente en información de su secuencia de nucleótidos. Debido a que actualmente obtenemos información en experimentos de expresión genética diferencial en forma masiva, ya sea por microarreglos o por secuenciación, estas técnicas pueden implementarse, ya sea desde las basadas más en aspectos biofísicos tomando en cuenta los aspectos termodinámicos, asignando puntajes a características estructurales predefinidas, o con modelos de aprendizaje profundo con grandes bases de datos (Zuker & Stiegler., 1981; Bellaousov et al., 2013; Lu et al., 2019; Singh et al., 2019). En la misma forma que las proteínas la estructura de las moléculas de RNA está determinada por su secuencia. La principal diferencia en cuanto al plegamiento es que en proteínas la fuerza determinante viene dada por las fuerzas hidrofóbicas, determinadas por aminoácidos de este tipo que influyen en las posiciones de los aminoácidos mismos con respecto a la interfase acuosa del citoplasma de la célula (Bellaousov et al., 2013). Los RNAs de cadena sencilla recién sintetizados dependen más bien de formación de puentes de hidrógeno entre sus nucleótidos. Al comparar la velocidad de plegamiento y formación de estructuras terciarias entre proteínas y RNAs sabemos que en los RNAs esta es más lenta. El plegamiento del RNA involucra la formación

de geometrías locales restrictivas y resultan en estructuras térmicamente estables con poca flexibilidad a diferencia de las estructuras 3D de las proteínas (Huang et al., 2019; Zhang et al., 2020). En las moléculas de RNA los apareamientos por puentes de hidrógenos estándar corresponden a GC y AU y se conocen como de Watson-Crick. Además, existen otro tipo de interacciones comúnmente y se denominan interacciones tambaleantes o “Wobble” y se dan entre G y U (Zhang et al., 2020). En la **Figura 3** se aprecian las Interacciones tipo Wobble. Esto conlleva a la formación de estructuras variadas en las moléculas de RNA como son los “loops” internos, de pasador, en bulto, multi “loops” y pueden formarse por la presencia de extremos de Hoogsteen, de CH o de ribosa, También, otras estructuras como los tripletes de bases son formados en algunas ocasiones; estos son apareamientos de bases nitrogenadas en donde se aparean tres de ellas simultáneamente, estas interacciones modulan la estabilidad de las hélices y forman incluso estructuras cuaternarias entre diferentes RNAs. Cuando se tiene una serie continua de apareamientos de bases se le denomina tallo o “stem” o también como hélice. Para calcular su formación generalmente se utilizan algoritmos de mínima energía libre. Otra situación compleja es que las estructuras de RNA forman pseudo nudos, esto ocurre cuando los pares de bases se cruzan sin traslape como se representa a continuación:

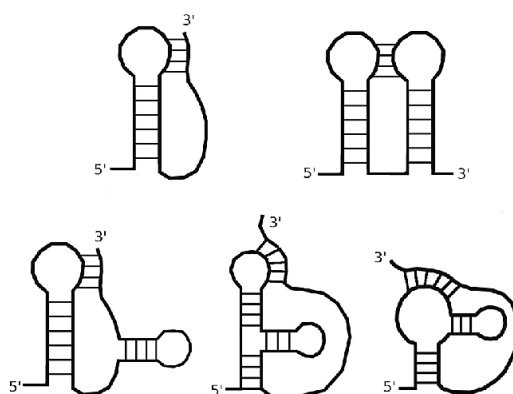


Figura 3. Interacciones tambaleantes o “Wobble” en moléculas de RNA. Entre G y U (tipo Hoogsteen), estas generan estructuras secundarias más complejas además de las de Watson y Crick.

Entonces, las predicciones de plegamiento estructural pueden enfrentar el problema de los pseudonudos en su solución espacial. Los algoritmos que no los consideran tienden a escalar polinomialmente y usan métodos como escalación subcúbica (Saha., 2017; Bringmann et al.,

2019). Otros investigadores usan los de escalación linear (Saha., 2017; Chowdhury et al., 2019). Los métodos de mínima energía libre sí abordan los seudonudos como un problema computacional completo (Lyngsø & Pedersen., 2000). Para una secuencia de un RNA que pretende ser simulada en su plegamiento “n”, es el número de tallos posibles y el tamaño del espacio combinatorio es 2^n , muchas de estas combinaciones no son válidas y uno de los desafíos es excluir tales regiones de las secuencias y enfocarse en las partes importantes del espacio de búsqueda. Un ejemplo de esto sería el problema del mRNA codificando 480,000 tallos posibles, esto generaría un valor matemático de $2^{486,000}$ que equivalen a $10^{146,440}$ posibles soluciones, es evidente que es imposible de resolver aun con supercomputadoras actuales (Lyngsø & Pedersen., 2000; Fox et al., 2022).

No obstante, la computación cuántica en un futuro resolverá rutinariamente todas las soluciones para estas estructuras en forma posible, así como muchos problemas relacionados a la biología molecular, bioquímica y ciencias biológicas. Esto mediante diseños de computadoras de acuerdo con alguno de estos modelos: “gate model” modelo de puerta y “quantum annealing” de anillamiento cuántico o algunos nuevos modelos (Cao et al., 2018; Cheng et al., 2020). Algunos sugieren que estos problemas de plegamiento de RNA se pueden solucionar óptimamente por anillamiento cuántico, pues estas se enfocarán principalmente a resolver problemas de minimización de un problema hamiltoniano que tenga como naturaleza muchas combinaciones o grandes combinaciones discretas como las llaman los físicos; esto se ha demostrado en caso del mundo real y casos industriales como elaboración de vacunas de mRNA por optimización de codones (Fox et al., 2022).

Un ejemplo de una matriz de visualización por programación dinámica y con aplicación en computación cuántica es el siguiente, en este modelo se puede mapear cada tallo posible formado como un qubit, esta matriz se ve en la **Figura 4**. Aquí se consideran además de las interacciones de Watson y Crick las de tipo Hoogsteen. Con algoritmos de programación dinámica, minimizando la energía libre y llegar a la estructura mostrada en la **Figura 5**.

miRNAs

Existen varios tipos de sncRNAs funcionando en las células eucariotas los cuales incluyen los miRNAs o microRNAs que son un tipo de RNA de entre 18 a 25 nt en su forma madura o de 80-100 nt como precursores (Scott & Ono., 2011; Condrat et al., 2020). Por su parte, los

siRNAs tienen un tamaño de 21 a 22 nt y los piRNAs de 26 a 31 nt; estos tipos de RNA tienen en común que no codifican para proteínas.

	G	G	A	A	G	C	A	A	A	C	A	U	C	C	C	U	G	U
G						☺				☺		☺	☺	☺	☺	☺		☺
G						☺				☺		☺	☺	☺	☺	☺		☺
A												☺	☺	☺	☺	☺		☺
A												☺	☺	☺	☺	☺		☺
G												☺	☺	☺	☺	☺		☺
C																	☺	☺
A												☺				☺		☺
A												☺				☺		☺
A												☺				☺		☺
C																	☺	☺
A																	☺	☺
U																	☺	☺
C																	☺	☺
C																	☺	☺
U																	☺	☺
G																	☺	☺
U																	☺	☺

Figura 4. Matriz de bases de pares potenciales. Los tallos potenciales están representados de rojo, avellana y azul.

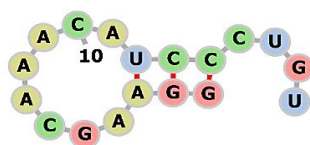


Figura 5. Solución de plegamiento probable de un RNA pequeño. Formando tallo y asa con apareamientos de: C-G, C-G y U-A. con el servidor RNA fold de la universidad de Viena, se pueden determinar regiones de interacción de moléculas de RNA entre si e incluso superficies de interacción con proteínas.

Los miRNAs son derivados del procesamiento de corte de precursores en forma de pasador o más comúnmente llamado “hairpin” por parte de la enzima Dicer, perteneciente a la familia de la RNAasa III; los miRNAs son moléculas conservadas evolutivamente (Vaucheret et al., 2004; Friedman et al., 2009). Para comprender y explotar el potencial clínico de exosomas provenientes de cualquier tipo de células se deben de caracterizar en forma precisa las funciones de las moléculas que poseen como los miRNAs, aun no existe suficiente información de los exosomas específicos ni se sabe si las células madre mesenquimales MSC

“Mesenchymal Stem Cells-Multipotent Stem Cells” de diferentes fuentes comparten una composición de RNA similar. En un estudio de caracterización de perfiles de miRNAs con un microarreglo en vesículas derivadas de células MSC tanto de células de medula ósea como de células hepáticas los autores de este estudio encontraron que algunos miRNAs se hallaban tanto en vesículas como en sus células de origen, en otros casos existían miRNAs específicos en las vesículas que no se hallaban en las células o lo contrario a veces algunos se encontraban solo en células de origen mas no en los exosomas (Collino et al., 2010). Debido a estas observaciones sugieren mecanismos que controlan el envío de los ciertos tipos específicos de miRNAs desde las MSC hacia al interior de las vesículas que generan. Sin embargo, sin una cuantificación precisa ya sea por técnicas de secuenciación masiva o RT-PCR cuantitativa que se combinen con experimentos funcionales, la relevancia biológica de estos hallazgos se mantiene con incógnitas aún (Collino et al., 2010). Todo esto sugiere una forma de explicar los mecanismos de control relacionados con una rápida secreción de los RNAs maduros que no da tiempo para su acumulación intracelular citoplasmática, lo que los conduciría a su degradación (Verweij et al., 2011). Así de esta forma se ha especulado solamente que algunos miRNAs específicos se producirían en las células solo para el propósito de comunicación entre células sin alcanzar niveles críticos en las células de origen para ejercer sus funciones en la represión de mRNAs blanco particulares a diferencia de las proteínas en cuanto a la señalización (Chairoungdua et al., 2010; Verweij et al., 2011). Existen varios tipos de pequeños de RNAs no codificantes conocidos como sncRNAs, los cuales funcionan en las células eucariotas e incluyen a los miRNAs originalmente identificados en 1994 (Ambros & Moss, 1994).

La biogénesis de los miRNAs comienza con un transcrito de pri-miRNA en el complejo microprocesador, formado por Drosha y la región 8 crítica del síndrome de Di George (DGCR8), luego se corta este pri-miRNA para formar un precursor llamado pre-miRNA, este se exporta al citoplasma en una manera dependiente y se procesa para producir un dúplex de miRNA maduro, al final cualquiera de las cadenas ya sea la 5p o 3p se une a alguna proteína de la familia Argonauta (AGO) formando un complejo inductor del silenciamiento (miRISC) (Vaucheret et al., 2004b). En las vías no-canónicas, se forman pequeños precursores de forma de pasador “small hairpin RNA (shRNA)” que son inicialmente cortados por el complejo microprocesador y exportados hacia el citoplasma vía Exportina 5/Ran GTP igualmente

procesados, pero específicamente por AGO2, pero en este caso sin procesamiento de la RNasa Dicer. Los pre-miRNA con 7-methylguanina (m7G)- son dependientes de Dicer para completar su maduración citoplásmica, pero difieren en su destino citoplasmático y son siempre dependientes de Dicer para completar su maduración (Vaucheret et al., 2004; Cai et al., 2009). Todas estas vías tienen en común que conducen a un complejo funcional miRISC. Los efectos de esto generalmente se relacionan a una inhibición traducional, muy comúnmente interfiriendo con el complejo el complejo de iniciación eucariótico eIF4F, posteriormente las proteínas de la familia GW182 que se unen a Argonata reclutan poliadenilasas de poly(A) PAN2/3 y CCR4-NOT esto remueve el m7G del mensajero. El proceso general se ilustra en la **Figura 6**. Es así el mRNA sufre degradación vía 5'–3' mediante la exoribonucleasa XRN1 lo que afecta la producción de proteínas específicas (Alarcón et al., 2015; Hayder et al., 2018).

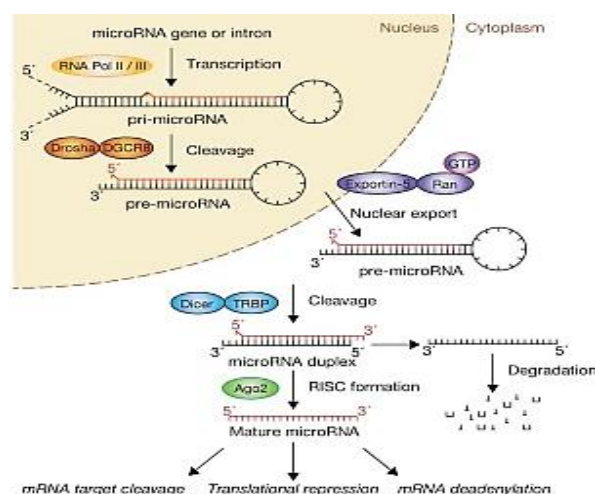


Figura 6. Biogénesis general de los miRNAs. En el núcleo los miRNAs al transcribirse sufren maduración para producir un pri-miRNA y después un pre-miRNA posteriormente son exportados al citoplasma para ser procesados por RNAsas y unirse a proteína Argonata una de las hebras del dúplex y así encontrar su secuencia blanco-complementaria. Esto conduce a 3 posibles efectos ruptura del mRNA, represión traducional y des-poliadenilación del mRNA. Tomada de: Many roads to maturity: miRNA biogenesis pathways and their regulation (Winter et al., 2009).

Algunos estudios estiman que un 1% del total del genoma en una especie dada está constituido por miRNAs (Syeda et al., 2020). El número de estas moléculas conocidas en *Homo sapiens* está aumentando y al menos la tercera parte de los genes humanos parecen conservar en las secuencias de sus mensajeros sitios de unión a miRNAs (Syeda et al., 2020).

La detección de miRNAs en forma específica es necesaria para estudiar y evaluar procesos fisiológicos mediante mecanismos de interferencia. También es importante para una mejor comprensión de patologías de gran importancia en medicina humana ya que la desregulación de los miRNAs oncogénicos (onco-miRNAs) es común en muchas enfermedades, particularmente en cáncer en donde ciertos miRNAs se sobreexpresan o subexpresan de forma notable (H. Liu et al., 2022).

La investigación que se lleva a cabo actualmente aborda numerosos aspectos de su biogénesis, aspectos de su localización, movilización, su función y disfunción. La forma de estudiar esto se da a múltiples niveles, desde el de moléculas individuales y la determinación de sus funciones y asociaciones como en los ncRNAs y el de estudiar células individuales y sus patrones de expresión diferencial células sencillas mediante resolución espacial y temporal (Ciesla et al., 2011; Liang et al., 2013). Los miRNAs son incorporados selectivamente en los exosomas y son sus elementos centrales, se ha comprobado mediante secuenciación masiva que existe una colección diversa de especies de ncRNA exosomal de la cual el más representativo y abundante tipo es el miRNA llegando hasta un 76% del total de las lecturas de secuencias que pueden ser mapeadas (Bellingham et al., 2012).

Los exosomas en diagnóstico tienen ventajas por ser biopsias líquidas liberadas como entidades estables y esto se basa en su estructura similar a las membranas celulares, tienen la capacidad de liberar su contenido en células específicas a través de interacciones de receptor-ligando (Costa-Silva et al., 2015). También la fusión correcta de membranas es importante en la endocitosis. Para la estimulación por señalización celular los exosomas interactúan con receptores específicos localizados en las membranas celulares blanco en tipos celulares específicos (Costa-Silva et al., 2015).

Para liberar sus RNAs o proteínas citoplásmicas los exosomas deben no solamente unirse sino introducir su contenido al interior de las células después de la endocitosis, un aspecto importante que determina la fusión celular del exosoma con su célula blanco es la composición relativa de lípidos, entre mayor contenido de balsas lipídicas se facilita su fusión (Mulcahy et al., 2014). También se ha encontrado que un ambiente extracelular con un pH ácido es determinante para incrementar la fusión de membranas, esto ocurre con tumores de estómago (Parolini et al., 2009b). Se asume que principalmente mediante mecanismos de endocitosis simple se incorporan los exosomas en sus células blanco, aunque en algunos

casos se ha detectado la influencia de proteínas de superficie en los procesos de captación. De esta forma se ha establecido claramente que los exosomas circulan en el plasma de individuos sanos y líneas de evidencia reciente revelan que el intercambio de miRNAs entre células puede estar acoplado mediante vesículas (Lotvall & Valadi., 2007; Valadi et al., 2007). Además, se ha demostrado en estudios que existen miRNAs específicos que se encuentran extracelularmente y que pueden cambiar en sus concentraciones en respuesta a condiciones fisiológicas (Skog et al., 2008; Noerholm et al., 2012; Huang et al., 2013).

La presencia de estabilidad relativa en los fluidos biológicos de RNA libre circulante o cfRNA (Circulating Free RNA), ha conducido a un mayor interés de su aplicación en forma de biopsias líquidas, no invasivas para muchas enfermedades, pero en particular en cáncer (Allegra et al., 2012; Solé et al., 2019). Aun así, existe poca información todavía sobre el transcriptoma circulante, de ahí la importancia de seguir mejorando los aspectos técnicos para su evaluación y en especial con técnicas como microarreglos de expresión o la secuenciación masiva de última generación (NGS), el principal problema de la secuenciación de RNA (RNAseq) en plasma es la pobre cantidad y calidad en las muestras del RNA usadas. Como consecuencia de esto los estudios se enfocan recientemente a la optimización de las técnicas con respecto a estos aspectos (Guo et al., 2017; Solé et al., 2019). La red regulatoria miRNA-mRNA refleja complejidad funcional, debido a sus combinaciones posibles, ya que existe multiplicidad en los mRNAs blanco para un determinado miRNA y en la integración de señales debido a que comúnmente varios miRNAs son necesarios para unirse y regular un tipo de mRNA (Lewis et al., 2003; Bentwich et al., 2005; Huang et al., 2013). Se registran 2,693 miRNAs maduros en la base de datos MiRBase 22.1 y de acuerdo con las predicciones estos tienen como blanco más de 5,300 genes. (Griffiths-Jones et al., 2008; Kozomara et al., 2019). Los miRNAs regulan principalmente en la región no codificante de los mRNAs; el extremo 3'UTR. Los miRNAs desempeñan funciones regulatorias importantes de muchos de los genes mediante el apareamiento al mRNA, generando así su degradación o inhibiendo su traducción (Lewis et al., 2003; Lewis et al., 2005). Los miRNAs representan aproximadamente un 4% de los genes del genoma humano; regulan al menos la tercera parte de los genes humanos a nivel de la traducción; cerca de la mitad de los genes de miRNAs están presentes en las regiones intergénicas.

Agregar bajo control de sus propios promotores o promotores compartidos, como en el caso de promotores poli cistronicos (Bentwich et al., 2005). El resto de los genes de miRNAs están localizados en genes codificadores de proteínas donde están bajo control regulatorio de los promotores de esos genes o promotores específicos de miRNAs (Rodriguez et al., 2004; Bentwich et al., 2005; Lewis et al., 2005). Su alta conservación resalta el gran significado de su función biológica en la regulación de la función celular, En células animales los miRNAs son reguladores endógenos de la expresión genética que funcionan principalmente a nivel post-transcripcional mediante la inhibición de la traducción de los RNAs mensajeros con o sin degradación del transcrito en cuestión. Esto se logra mediante su apareamiento por complementariedad imperfecta a múltiples sitios en la región 3' UTR de moléculas de mRNA blanco es importante mencionar que un solo tipo de miRNA puede regular la expresión de genes distintos. Un gene en particular puede ser regulado por varios miRNAs distintos por lo tanto se consideran como interruptores moleculares maestros que afectan la traducción en forma cuantitativa de cientos de mRNAs distintos simultáneamente (Bartel., 2009; Friedman et al., 2009).

Mediante técnicas computacionales complejas basadas en redes neuronales o modelos de biología de sistemas e incluso (IA) Inteligencia Artificial se ha logrado establecer las redes regulatorias potenciales para conjuntos de miRNAs particulares, esto es importante pues se establecen enormes cantidades de mRNAs regulados simultáneamente. Lo interesante es que solo un conjunto relativamente pequeño de miRNAs son capaces de regular redes complejas. Estas redes consideran información de las distintas bases de datos existentes, así como de información experimental de interferencia que es integrada en estos modelos complejos, a continuación, se describen brevemente algunos ejemplos:

Red 1: Total de miRNAs **19**: miRNA-30a-5p, miRNA-30b, miRNA-30c, miRNA-30d, miRNA-30e, miRNA-30e-5p, miRNA-106a, miRNA-20a, miRNA-519d, miRNA-17-5p, miRNA-93, miRNA-302b, miRNA-302c, miRNA-373, miRNA-519b, miRNA-519c, miRNA-181c, miRNA-19a, miRNA-9.

Enlaces de la red: **96**. mRNAs regulados: **1536**.

Red 2: Total de miRNAs **8**: let-7a, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f, let-7g, let-7i. Enlaces de la red **32**: mRNAs regulados: **361**. (Betel et al., 2008; Griffiths-Jones et al., 2008).

La red regulatoria miRNA-mRNA refleja en su funcionamiento complejidad debido a sus combinaciones posibles ya que existe multiplicidad en los mRNAs blancos para un determinado miRNA y en la integración de señales debido a que comúnmente varios miRNAs son necesarios para unirse y regular un determinado tipo de mRNA (Lewis et al., 2003; John et al., 2004). Ya se ha demostrado una fuerte correlación entre los niveles de determinados miRNAs en enfermedades como son el cáncer, neurodegeneración, enfermedades cardiovasculares y numerosas patologías más (Condrat et al., 2020). En este sentido, se desarrollan investigaciones concernientes a la identificación de marcadores de diagnóstico y pronóstico. Es bien estudiado el caso de los miRNAs transportados en exosomas cuya función es reprimir moléculas de mRNAs que se tienen como blanco en ciertas células y tejidos, lo cual se ha demostrado tanto in vitro como in vivo (Valadi et al., 2007; Skog et al., 2008; Kosaka et al., 2010; Pegtel et al., 2010; Kogure et al., 2011). Se ha observado una compartimentalización de los miRNAs en miRISC con respecto a sus mRNAs blancos incluyendo el retículo endoplásmico rugoso (Barman & Bhattacharyya., 2015), los cuerpos P “(P)-bodies” (Bose et al., 2017), gránulos de estrés (SG) (Detzer et al., 2011), la red de trans-Golgi (TGN), los endosomas tempranos-tardíos (Bose et al., 2017), los cuerpos multivesiculares (MVB), lisosomas (Gibbins et al., 2009) también las mitocondrias (Barrey et al., 2011) y el núcleo (Gagnon et al., 2014). Con respecto a la actividad de los miRNAs, esta es resultado de componentes moleculares que facilitan la regulación genética a nivel post-transcripcional y están enriquecidos en sitios donde se localizan los complejos miRISC-mRNA, el efecto de esto depende de las concentraciones relativas de mRNA y miRISC en sublocalizaciones celulares que promueven una eficiente regulación de la expresión genética (Gagnon et al., 2014). Los cuerpos P se identificaron recientemente como sitios en los que existe evidencia de actividad de supresión por parte de los miRNAs, son sitios muy localizados y carentes de ribosomas, están enriquecidos con enzimas de degradación de mRNA como las proteínas de eliminación de “cap”, el complejo CCR4-NOT, XRN1 y la familia de proteínas GW182 (Liu et al., 2005).

De forma interesante, se sabe que los miRNA, lncRNAs en EVs no son la forma única de exRNA que está protegido de la acción de enzimas como las RNAsas. Además, existen Y-RNAs, snoRNAs (small nucleolar RNAs), snRNAs (small nuclear RNAs), piRNAs (piwi

interacting RNAs) y vtRNAs (vault RNAs), por mencionar a otros tipos de ncRNAs transportados en los exosomas, ya que también las proteínas de unión a RNA como las de las familias argonauta y las proteínas LDL y HDL también confieren comúnmente resistencia a nucleasas (Nishi et al., 2015; Atwood et al., 2016).

La **Tabla 1** resume aspectos generales de la función de los RNAs y su descubrimiento. También se ha encontrado que existe un rol crítico de las proteínas de unión al RNA en aspectos como diferenciación de células madre pluripotenciales y reprogramación celular (Collino et al., 2010). Es notable el descubrimiento que los miRNAs pueden modular la matriz extracelular y jugar un papel crítico en la regulación de reprogramación de células somáticas.

Tabla 1. Tipos de ncRNAs existentes.

RNA	Descubierto	Funciones generales
RNA	1961	Variadas
mRNA	1961	Molécula intermediaria entre el DNA y la síntesis de proteínas.
tRNA	1961-1962	Cada uno asociado a un aminoácido específico, hay enzimas que unen tRNA con el aminoácido correcto, cada secuencia del anticodón del tRNA interacción específicamente con los codones del mRNA y producir proteínas
rRNA		Intervienen como componentes estructurales de ribosomas e interactúan con proteínas y otros tipos de RNAs
lncRNA		Actúan como reguladores de transcripción, esponjas de miRNANAs, catalíticamente modifican otras moléculas
miRNA	1993	Regulación de expresión génica, a nivel traducción, pero también tienen actividad en la transcripción y posiblemente en la señalización por su unión a receptores
siRNA	2000	Similar al miRNAs pueden afectar la estabilidad del mRNA
piRNA	2003	Deben de tener un papel mediador de reguladores por mecanismos de interferencia se sabe que regulan transposones y recientemente ya se les atribuye regulación de otros genes
snoRNA	2006	Modificación de tRNAs y rRNAs participación en corte y empalme de mRNA
snRNA	2007	Constituyendo la maquinaria del espliceosoma o como reguladores en los cuerpos de Cajal
vaultRNAs	1986	Se asocian con la membrana nuclear por lo que se relacionan a regular actividades de procesos de transporte e intercambio nucleocitoplasmáticos
Y-RNA	2000	Necesarios para la replicación y posiblemente otras funciones más debido a su tendencia a unión con diversas proteínas

Se determinó hace muy poco tiempo que la comunicación intercelular también existe mediante el transporte de biomoléculas en vesículas denominadas exosomas. Estos transportan una gran variedad de biomoléculas y se pueden consultar como ejemplo la

caracterización hecha en el presente trabajo (véase **Tablas: 5, 6 y 7**) (Lotvall & Valadi, 2007; Valadi et al., 2007). Este hecho permitió inferir que de alguna manera las células podían influenciar su ambiente cercano y lejano, mediante una transferencia de diversas moléculas, para reprogramar o regular la expresión genómica (a manera de un software) de las células blanco, ya sean cercanas o distales (Lotvall & Valadi, 2007). Esto puede ocurrir al activar, atenuar o suprimir la expresión de genes en forma muy selectiva, afectando así el comportamiento y la función celular en su conjunto, con consecuencias para el organismo ya sean positivas o negativas, dependiendo del contenido de los exosomas y el tipo de células blanco entre otras cosas (Ghidoni et al., 2008; Meldolesi, 2018). Las vesículas derivadas de membranas o PMV por sus siglas en inglés: “Plasma Membrane Vesicles” también son conocidas como macropartículas o micro vesículas; comúnmente, de forma menos usual se les conoce como ectosomas (Meldolesi, 2018). Estas vesículas son liberadas durante los procesos de crecimiento, proliferación, envejecimiento, apoptosis y activación celular (Morel et al., 2006; Robbins & Morelli, 2014). Los niveles basales de éstas son característicos de individuos sanos y un incremento en su liberación, debido a ciertos eventos, es una característica importante de alteración celular (Morel et al., 2006). Las PMV, dentro de las cuales se clasifican los exosomas, son liberados tanto de células sanas como en células cancerosas y pueden servir para la comunicación intercelular, mediante el transporte de proteínas, lípidos y RNAs diversos, de células secretoras de exosomas (Freyssinet, 2003; Ratajczak et al., 2006).

Este trabajo se desarrolló para la identificación de biomarcadores de ncRNAs en astrocitomas pediátricos de lo cual no existe antecedentes a nivel secretoma. No únicamente considerando a miRNAs que tienen uso más generalizado en cáncer en general. Las técnicas usadas se basan principalmente en la evaluación de los niveles de expresión diferencial de los distintos genes humanos en condiciones de enfermedad con respecto a un grupo control, a grandes rasgos los genes pueden: no sufrir cambios en sus niveles de expresión; sufrir un incremento en estos con respecto al control, lo que llamamos sobreexpresión o sufrir un decremento respecto al control, lo que llamamos subexpresión. A pesar de la eficacia de los microarreglos como el HTA usado en los experimentos presentados en este trabajo que evalúa no solo expresión diferencial del transcriptoma sino además transcritos alternativos, es importante desarrollar análisis más profundos en poblaciones de pacientes mayores y aplicar además

estrategias técnicas de validación, para demostrar la efectividad de cada biomarcador individualmente en pacientes (Romero et al., 2016). Si se llegan a la estandarización de técnicas de diagnóstico es posible utilizar los biomarcadores mediante RT-PCR o pruebas de microarreglos diseñadas exprofeso. Incluso se deben de incluir otros ncRNAs para una mayor precisión, ya que tienen el potencial de ser biomarcadores en general cuantificando sus niveles relativos de expresión. Esto es realidad para cáncer y otras enfermedades, como lo son los diferentes transcritos desregulados con características promisorias como biomarcadores. Por lo anterior, se mencionan algunos antecedentes de Y-RNAs, SnoRNAs y piRNAs.

Y-RNAs

Con respecto a la estructura, los Y-RNAs tiene un tamaño entre los 83 y 112 nt. y son ricos en pirimidinas y transcritos por la RNA pol III; debido a su complementariedad en sus extremos 5' y 3', estos mismos forman un “loop” termodinámicamente estable. Algunos estudios demuestran su capacidad para unirse a proteínas como Ro (Chen & Wolin., 2004) . Se identifican ya características conservadas de los Y-RNAs desde hace tiempo y se identificaron inicialmente 4 dominios estructurales y funcionales. El dominio “loop” es el menos conservado y modula la asociación con la cromatina, el tallo superior es esencial en la replicación del DNA, se sabe que el dominio de tallo inferior es el sitio de unión de Ro60 para exportación nuclear y la cola de poliuracilo se une a la proteína La (Teunissen., 2000).

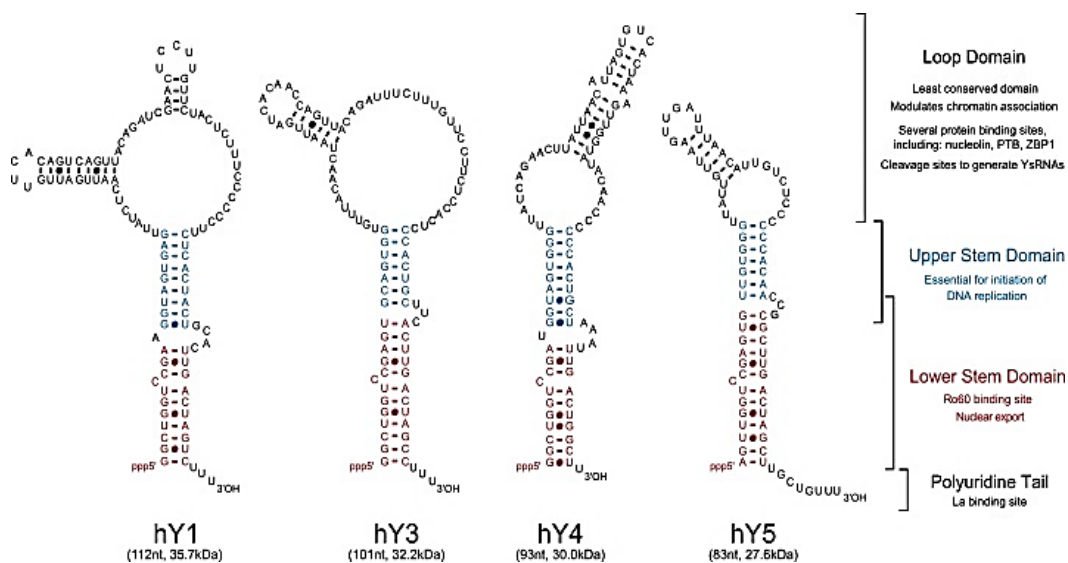


Figura 7. Dominios funcionales de los Y-RNAs. El dominio de asa o “Loop Domain” es el menos conservado y modula la asociación a cromatina. El dominio de tallo superior “Upper Stem” es esencial para la iniciación de la replicación. El dominio de tallo inferior “Lower Stem” es el sitio de unión de Ro60 participa en la exportación nuclear. La cola de poliuracilo “Polyuridine Tail” es el sitio de unión de la proteína La. Imagen de: (Teunissen., 2000).

El genoma humano codifica cuatro subtipos de Y-RNAs (hY1, hY3, hY4 y el hY5); en esto difiere de otras especies, por ejemplo, en roedores existen sólo dos tipos (mY1 y el mY3) (Perreault et al., 2005). La conservación evolutiva es una característica encontrada en Y-RNAs en vertebrados (Pruijn et al., 1993). Estructuralmente los tallos superior e inferior son altamente conservados en secuencias de nucleótidos, pero en el caso de las secuencias de asas internas hay una variación significativa entre los subtipos de Y-RNAs individuales. Entre las funciones descritas para los Y-RNAs está su participación en la replicación del DNA (Christov et al., 2006; Kowalski & Krude., 2015). Los dominios funcionales de estas moléculas se muestran en la **Figura 7**.

Todos los Y-RNAs contienen un tallo largo formado por apareamiento de bases entre los extremos 5' y 3' que contiene el sitio de unión a la proteína Ro60, estas moléculas difieren muy poco en sus estructuras primarias y secundarias (Van-Gelder et al., 1994; Teunissen., 2000). Actualmente los mecanismos por los cuales los diferentes Y-RNAs afectan a la replicación del DNA es un tema que aun merece ser resuelto, pero evidencia reciente de estudios de mutagénesis en Y-RNAs de vertebrados ha mostrado que el dominio de tallo superior “Upper stem domain” es suficiente para la función de los Y-RNAs en la iniciación de la replicación del DNA (Christov et al., 2008). Este dominio se encuentra en todos los vertebrados y explica su redundancia funcional en todos estos organismos. Los Y-RNAs de vertebrados también contienen un motivo altamente conservado GUG–CAC en su secuencia de nucleótidos que es esencial para la replicación del DNA (Gardiner et al., 2009; Tebaldi et al., 2018). Existe también un grupo de proteínas de interacción involucradas en las infecciones virales o en la inmunidad innata que interaccionan con los Y-RNAs humanos: Symplekina (**SYMPK**); factor de transcripción de la caja Y (**YBX1**); helicasa putativa (**MOV-10**); apolipoproteína B mRNA; enzima de edición (**APOBEC**) y la proteína inducida por interferón con repeticiones de tetrapéptido (**IFIT5**). No todas se encontraron interaccionando con los 4 subtipos de Y-RNAs humanos y es probable que existan funciones especializadas para los diferentes subtipos de Y-RNAs en relación con sus proteínas de

unión. Está bien documentada la alta abundancia de Y-RNAs en exosomas, esto parece sugerir que los Y-RNAs pueden desarrollar funciones de señalización cuando son transferidas a sus células blanco y además se ha demostrado que fragmentos de Y-RNAs se liberan en exosomas procedentes de células B, lo que induce efectos inflamatorios por medio de la liberación de la proteína quimio atrayente de monocitos 1 (**CCL2**); la proteína inflamatoria de macrófagos (**CCL4**) y de interleucina 6 (**IL6**) en monocitos, estimulando el ligando 1 de muerte programada (**PD-L1**) e inhibiendo la activación de células T (Riley., 2009). En otros estudios los Y-RNAs están sobreexpresados en tumores sólidos humanos con respecto a tejidos sanos, lo que es consistente con su rol funcional conocido en aspectos de la replicación del DNA y proliferación celular ya que podrían acelerar los ciclos de replicación de DNA y desregular el tiempo de vida de las células involucradas aumentando su tasa de división celular además se ha demostrado que la degradación de los Y-RNAs inhibe la proliferación celular (Christov et al., 2006; Christov et al., 2008). Los Y-RNAs pueden inducir la activación inmune con efectos potenciales de la unión de Y-RNAs y la subsecuente activación de los receptores tipo “Toll” del alemán “raro” (**TLR**). En los TLR se encuentran los dominios TIR que una vez dimerizados por su unión al ligando son detectados por proteínas de membrana adaptadoras como TIRAP por ejemplo en el TIRAP-inductor de IFN- β (TRIF)-y su molécula adaptadora (**TRAM**). **TIRAP** y **TRAM** pueden luego reclutar moléculas como la proteína mieloide de respuesta de diferenciación (**MyD88**) (Driedonks & Nolte-T’Hoen, 2019). Esto induce la formación de un enorme andamio oligomérico llamado Myddosoma y en este complejo supramolecular se encuentran enzimas cinasas y concentraciones incrementadas de moléculas señal las que promueven interacciones alostéricas e inician la transducción de señales dependiendo del complejo supramolecular que se forme pueden ser (Driedonks & Nolte-T’Hoen, 2019). las vías dependientes de MyD88 inducen la producción de citocinas inflamatorias, o las vías dependientes de TRIF inducen la cascada de producción de interferón I (IFN I) así como citocinas inflamatorias. Un ejemplo de inmunidad innata el reconocimiento de moléculas exógenas de algún patógeno, como bacterias, comienza con el reconocimiento de patrones moleculares asociados a microbios (**MAMPs**) y patrones moleculares asociados a peligro (**DAMPs**). Los cuales son reconocidos por diferentes receptores denominados en conjunto receptores de reconocimiento de patrones como lo son: receptores tipo Toll (**TLRs**), lectina de unión a

manosa (**MBL**), dominios de oligomerización de nucleótidos (**NOD**), receptores (**NLRs**), receptores de manosa y otros (Murphy & Weaver., 2018). Sus funciones efectoras de la activación de dichos receptores trae como consecuencia la activación de genes codificantes, y quizás no codificantes lo que genera distintas respuestas celulares (factores de crecimiento, moléculas de adhesión, citoquinas, quimiocinas, coestimulación, opsonización fagocitosis, proliferación y muerte celular), además su conexión con los sistemas de inmunidad mediada por células se ven afectados en ocasiones por lo que la función efectora de células NK y linfocitos citotóxicos se puede ver influida por este tipo de respuestas también, teniendo consecuencias en su actividad de eliminación de tumores sólidos y la identificación de expresión de proteínas anómalas en células transformadas lo que afecta la homeostasis del organismo entero. Para el caso de los Y-RNAs asociados a exosomas, se cree que éstos pueden mediar una amplia gama de efectos de modulación sobre el sistema inmune; se ha observado que diferentes subtipos de Y-RNAs difieren en su capacidad de unión a TLRs específicos diferentes (Greidinger et al., 2007). La respuesta inmune antitumoral depende de células presentadoras de antígenos como células dendríticas y monocitos que actúan en respuesta a patrones (Palucka & Banchereau, 2014; Pradere et al., 2014). La capacidad para modular a los linfocitos T y B, de las células dendríticas, se debe a que éstas expresan todos los tipos de TLRs y por lo tanto son un vínculo entre respuesta inmune innata y adaptativa, un ejemplo es que la producción de interferones es necesaria para la respuesta a tumores (Diamond et al., 2011). Se ha documentado que las células dendríticas activadas por ligandos de TLR7 pueden inducir respuestas antitumorales por lisis celular (Drobits et al., 2012). Se ha demostrado que fragmentos de Y-RNA-5 liberados de exosomas optimizan la creación de un mejor microambiente para tener proliferación e invadir las células circundantes (Chakraborty et al., 2015).

El control de calidad de los ncRNAs está relacionado al complejo de unión del Y-RNA con la proteína Ro (Labbé et al., 1999; Chen & Wolin., 2004). Hay evidencia que sugiere que los Y-RNAs están involucrados en regular la degradación de los RNAs defectuosos en su plegamiento a través de la interacción con Ro60 (Fabini et al., 2000; Hogg & Collins., 2007). Debido a que los Y-RNAs están presentes en los fluidos corporales como sangre y fluido seminal y por lo tanto pueden ser usados como biomarcadores de diagnóstico no invasivos es importante su estudio y cuantificación en diferentes patologías particularmente en cáncer

(Stein et al., 2005; Van-Balkom et al., 2015; Driedonks & Nolte., 2019). Para explicar la función de Y-RNAs en ribonucleoproteínas Ro, se ha sugerido que inhiben la función de Ro por oclusión estérica del sitio de unión en su superficie en el caso de un ncRNA mal procesado (Fabini et al., 2000; Fouraux et al., 2002).

Seudogenes de Y-RNAs

La existencia de pseudogenes de Y-RNAs fue reportada inicialmente en los genomas del ratón y humanos (Weiner et al., 1986). Incluso se ha propuesto que el gen funcional hY5 que codifica al RNA Y-RNA-5 se originó por un evento de retrotransposición del gen hY3 (Maraia et al., 1996). De acuerdo con análisis de alineamiento de secuencias se ha demostrado que existen alrededor de 1,000 pseudogenes de Y-RNA en el genoma humano y la mayoría muestran similitudes de al menos 90% de identidad para alguno de los 4 Y-RNAs. Algunos investigadores hipotetizan sobre su relativamente reciente aparición en el genoma humano mediante eventos de retrotransposición mediados por elementos L1 (Perreault et al., 2005). Los elementos móviles o transposones contribuyen enormemente en la evolución de genomas de mamíferos. En el caso de los humanos los retrotransposones denominados de la familia L1 representan una enorme fracción del genoma con alrededor del 17% del mismo (Ostertag & Kazazian., 2001; Kazazian., 2004). Se ha pensado que más del 99.8% de los L1 son inmóviles por lo que en humano se calcula que solo de 60 a 100 pueden ser realmente móviles (Goodier et al., 2001; Brohara et al., 2003). La enzima reversa transcriptasa de los L1 comúnmente trabaja en cis sin embargo se ha detectado su acción en trans, aunque en mucho menor medida movilizandose secuencias de Elementos nucleares dispersos cortos (SINE). Son secuencias cortas, generalmente de unos pocos cientos de bases, que aparecen repetidos miles de veces en el genoma humano (Wei et al., 2001). En el caso de humanos el elemento SINE más abundante corresponde a los elementos Alu de 300 bp. los cuales son tan abundantes en el genoma que representan el 11% aproximadamente y están representados por 1.1 millones de copias de este elemento SINE (Weiner., 2000). Este mecanismo de retrotransposición generalmente ocurre cuando un mRNA es retro transcrito y después reinsertado en nuevos sitios o locus genómicos mediante la maquinaria de integración de L1. La maquinaria de retrotransposición L1 además participa en la integración genómica de muchos pseudogenes procesados, así como retrogenes quiméricos o combinados (Esnault et al., 2000).

Genes quiméricos por retrotranscripción con L1 y que generan fusiones entre elementos Alu con ncRNAs son los formados entre Alu y algunos snRNAs como lo son los del grupo de U6 (Buzdin et al., 2003). Esto de acuerdo con evidencia de que los eventos de retrotransposición de los seudogenes de Y-RNAs ocurrieron por mecanismos en trans utilizando la maquinaria de L1 cuando ciertas mutaciones impidieron la unión de los Y-RNAs a las proteínas con las que interaccionan como Ro60 y quizás la proteína La. Se ha calculado que las épocas de integración y aparición de los seudogenes de Y-RNAs son simultaneas a la aparición y amplificación significativa en el número de copias de los elementos Alu en el genoma humano, es decir en el último millón de años. De la misma forma su localización se halla también en regiones ricas en genes con integración reciente en los mismos. Es posible que su presencia indique que son mediadores biológicos importantes en la adaptación y evolución genómica humana reciente (Jurka., 2004).

SnoRNAs

Son una clase de RNAs no codificantes pequeños (60–300 nucleótidos) están implicados en la modificación química del rRNA. Ellos funcionan como guías para la modificación postranscripcional del rRNA, pero en años recientes nuevas funciones en la regulación de otras vías celulares fueron encontradas (Scott & Ono., 2011). Existen dos clases principales de snoRNAs identificados de acuerdo con su secuencia estructura y función: los snoRNAs de caja C/D y los snoRNAs de caja H/ACA y Una tercera clase menos representada son los específicos de los cuerpos de Cajal (scRNAs) estos se asocian a los mismos, los cuales son subcompartimientos sin membrana muy pequeños en el núcleo, involucrados principalmente en modificación post transcripcional de RNA (Scott & Ono, 2011). Los snoRNA de caja C/D son de aproximadamente 60–200 nucleótidos, poseen dos cajas conservadas la caja C (motivo canónico RUGAUGA) y la caja D (con motivo canónico CUGA), su principal función es lleva a cabo la metilación de 2'-O-ribosa de residuos específicos en las moléculas de rRNA (Kaur et al., 2012; McMahon et al., 2015).

piRNAs (en cáncer)

Los RNAs asociados a Piwi (Piwi-RNAs o piRNAs por sus siglas en inglés) son el tipo de ncRNAs descubierto más recientemente y se identificaron al principio al buscar RNAs que

podrían estar interactuando con la proteína Piwi (Aravin et al., 2006). Varias moléculas de piRNAs se detectan anormalmente expresadas en células tumorales, indicando una posible función en la actividad de supresores tumorales o promotores tumorales.

Ciertos piRNAs se ha asociado con un fenotipo celular maligno y fase de la enfermedad. Investigaciones sugieren que los piRNAs no son tan complementarios al mRNA y establece la idea que participan principalmente en regulación epigenética como sucede en cáncer (Kim., 2006; Li et al., 2015). Respecto a esto estudios bioinformáticos realizados en este trabajo sugieren la noción contraria.

Por otro lado otros investigadores apuntan que los piRNAs pueden inhibir la función en moléculas blanco a través de redes postranscripcionales en forma similar a como lo logran los miRNAs y estas interacciones piRNAs-RNAs pueden incluir a los lncRNAs y pseudogenes (Peng et al., 2016; Liu et al., 2018). El caso de piR-36712 es conocido por ser un supresor tumoral y un agente terapéutico en cáncer de mama (BC) (Tan et al., 2019). un nivel incrementado de (piR-932/PIWIL2) reduce la expresión de latexina y promueve la transición epitelial-mesenquimal (EMT) en este cáncer (Zhang et al., 2013). En el caso de cáncer de pulmón (LC) el piR-651 es conocido por actuar como regulador de tumorigénesis en líneas celulares humanas 95-D de LC causando la inhibición de la apoptosis y causando alteraciones en la expresión de proteínas de apoptosis. El tratamiento de inhibidores para el piR-651 incrementa la apoptosis a través de caspasa 3 y la proteína BCL limitando así la progresión (Yao et al., 2016). El caso de piR-55490 se correlaciona con supervivencia de pacientes ya que suprime la proliferación de células de LC y puede ser usado como un blanco terapéutico (Peng et al., 2016).. El piR-651 se encuentra sobre expresado en carcinoma gástrico (GC), BC, LC, así como en líneas celulares de carcinoma hepático (HC) indicando que este puede funcionar como oncogén.

También piR-651 promueve la transición entre la fase G2/M en células GC promoviendo la proliferación celular (Cheng et al., 2011). Existe un piRNA conocido como piRHep1 sobre expresado en carcinoma hepatocelular (HCC) que promueve la proliferación hepatocelular e invasión, esto lo hace uniéndose a PIWIL2 para sobre activar la vía de señalización PI3K/AKT (Law et al., 2013). En el caso de glioblastoma el piR-30188 decrementa la expresión de PIWIL3 y se correlaciona negativamente con glioma de grado patológico. El piR-30188 suprime la proliferación tumoral celular, invasión, migración y se une a OIP5-

AS1 para promover la apoptosis (Liu et al., 2018). En cáncer de ovario endometroide el piR-52207 está sobre expresado y el piR-33733 mientras tanto se incrementa en cáncer de ovario (Singh et al., 2018).

3.3. Vesículas extracelulares (EVs) y exosomas.

El intercambio de información entre las células controla en gran medida al desarrollo en organismos complejos, células de mamíferos y otros organismos se comunican mediante interacciones celulares, bioquímicas y además físicas como el citoesqueleto (nanotubos y citonemas) (Tkach & Théry, 2016; Fabbri et al., 2019). Esto define microambientes particulares, por ejemplo: las células troncales son muy sensibles a las señales extracelulares que definen aspectos de diferenciación en éstas como en el desarrollo embrionario, los factores de crecimiento, los cuales pueden actuar en forma ya sea autocrina o paracrina y las fluctuaciones de sus concentraciones regulan el fenotipo celular y su función (Tkach & Théry, 2016). Un componente de comunicación biológica identificado en años recientes es el sistema de vesículas extracelulares (EV) y/o exosomas, son pequeños paquetes moleculares secretados por todas las células y estos envían señales diversas entre las mismas (Lotvall & Valadi, 2007; Kosaka et al., 2010). Los exosomas son EVs conformadas por membranas de lípidos liberadas por varios tipos celulares; son encontradas en el sobrenadante de una gran variedad de células en cultivo, así como en todos los fluidos corporales (Khalil et al., 2009; Mercer et al., 2009; Mercer & Mattick, 2013). La gemación de microvesículas y exosomas fue reportado desde hace más de 50 años, lo cual parece ser un mecanismo general para todas las células (Li et al., 2016).

Origen, estructura y función de los exosomas

Los exosomas se forman a partir de estructuras llamadas endosomas por gemación interna de la membrana plasmática. En esta etapa se forman las vesículas intraluminales (ILVs), las cuales varían de tamaño de los 30 a los 100 nanómetros (nm.) de diámetro (Valadi et al., 2007; Théry et al., 2009). El endosoma tardío es llamado cuerpo multivesicular (MVB) y las proteínas son empaquetadas directamente en su interior desde el retículo endoplásmico rugoso y el complejo de Golgi, al igual que los mRNAs, miRNAs, otros ncRNAs y los

fragmentos de DNA (Théry et al., 2006). Así los MVB pueden ya sea fusionarse con el lisosoma, para la degradación de su contenido, o con la membrana plasmática de la célula para liberar su contenido y con la membrana plasmática de la célula en sí misma, liberando así sus ILVs hacia el espacio extracelular en cuyo caso se denominan exosomas (Van-Niel et al., 2001). Pueden ser incorporados por células específicas, denominadas células blanco, las cuales pueden estar en el microambiente cercano, o bien ser transportadas mediante fluidos biológicos hacia sitios “lejanos” anatómicamente, en donde se hallan tipos celulares distintos (Lotvall & Valadi., 2007). Además de transportar proteínas características y lípidos, los exosomas llevan ácidos nucleicos, siendo diferentes tipos de RNAs no codificantes con función regulatoria los elementos más notables (Jarvinen et al., 2008). Los exosomas se proponen como un mecanismo conservado y permite el intercambio de información genética entre tipos celulares distintos. Así es bien conocido que los exosomas protegen a las biomoléculas de su degradación por enzimas (Wang et al., 2009; Aliotta et al., 2010). La transferencia de mRNAs adicionalmente puede disparar cambios epigenéticos en las células receptoras ya que la presencia de otro tipo de transcritos provenientes de otras células distintas en las células blanco trae como consecuencia la producción de proteínas distintas de las que se sintetizan en esa célula en ese momento, esto puede tener un efecto en aspectos como la transcripción diferencial, afectación de vías de señalización o supresión de la expresión de proteínas con función protectora o supresora, de esta forma la expresión genética se ve alterada espacial y temporalmente por la irrupción de información proveniente en vesículas desde células a veces remotas a nivel anatómico (Lotvall & Valadi, 2007). Esto implica la traducción del mRNA en proteínas y se ha demostrado que en células troncales de humano y ratones, estos exosomas contienen mRNAs de por lo menos 1,300 genes que pueden ser traducidos in vitro (Valadi et al., 2007). Las moléculas transportadas por los exosomas modifican el fenotipo celular, esto ocurre generalmente modificando la población de transcritos disponibles en las células blanco por diferentes mecanismos, en uno bien descrito los miRNAs tienen la capacidad de suprimir la expresión de genes importantes o “hub” como los de cascadas de señalización, factores de transcripción o de regulación metabólica, otro mecanismo es el de la aparición de transcritos distintos de mRNAs también transportadas que tienen efecto debido a su expresión de proteínas distintas a las que se encontraba expresado al célula blanco, estas proteínas muchas veces tienen funciones

reguladoras, incluyen miRNAs, estos son conocidos en el control de genes codificantes de muchas proteínas y lncRNAs moduladores del epigenoma (Valadi et al., 2007; Lässer et al., 2011). Otra de las funciones reportadas para los exosomas está relacionada con la exportación de productos de deshecho; moléculas menos necesitadas por las células, e incluso se reportan estudios sobre resistencia a drogas en tratamiento al cáncer mediada por exosomas. En un estudio se reportó que la acumulación de cisplatino en el compartimiento lisosomal de líneas celulares con cáncer de ovario es reducida, debido a su liberación por exosomas (Safaei et al., 2005). También, la liberación en exosomas de algunos fármacos es común, por ejemplo, el cisplatino es 2.6 veces mayor en cantidad que las células normales, esto sugiere que las drogas empleadas pueden ser encapsuladas por los exosomas y ser expulsadas al exterior celular (Safaei et al., 2005; Chen et al., 2006). Los exosomas pueden llevar moléculas pequeñas como fármacos u otras sustancias tanto *in vivo* como *in vitro*, a diferencia de los liposomas tradicionales y éstas pueden ser cargadas al interior de las células por transfección para obtener exosomas dirigidos *in vitro* se pueden cargar a los exosomas purificados por electroporación y transfección lipídica (György et al., 2015; Kourembanas, 2015). En los últimos años, en diversos estudios se ha visto como los exosomas son una fuente natural de vesículas, a nano escala, los cuales tienen el potencial para transferir RNAs exógenos incluyendo siRNAs (RNAs de interferencia) y miRNAs, hacia células o tejidos blanco-específicos, con el propósito de silenciar genes y suprimir el crecimiento tumoral (Alvarez-Erviti et al., 2011; Ohno et al., 2013). Se ha demostrado también que los exosomas pueden ser exitosamente transferidos a células blanco específicas con el propósito de terapia génica (Mizrak et al., 2013; Shtam et al., 2013).

Las proteínas principales distintivas de los exosomas pertenecen a la familia de las tetraspaninas: **CD9**, **CD63** y la **CD81**, además el complejo de selección exosomal requerido para transporte ESCRT. Existen proteínas características como **Alix**, **TSG101**, integrinas, proteínas de choque térmico y flotilinas (Camussi et al., 2010; Taylor & Gercel-Taylor, 2011). Aunque algunas proteínas son comunes a todos los exosomas como lo son CD63, los componentes de ESCRT y del citoesqueleto, otras dependen del tipo celular específico que produce y libera a los exosomas, como lo son **MHC** clase I y **MHC** clase II (Camussi et al., 2010; Taylor & Gercel-Taylor, 2011). Los exosomas son considerados de origen endocítico, mientras las microvesículas se producen por gemación de la membrana plasmática, otra

tercera clasificación incluye a los cuerpos apoptóticos que son liberados por células que pasan por muerte celular programada y señales de empaquetamiento celular de sus restos, existe controversia respecto al tamaño de los exosomas en cuanto a su clasificación ya que algunos autores señalan su tamaño entre 30 y 100 nm. otros investigadores incluso amplían este rango de 30 a 200 nm. por lo que aún no hay consenso (Kourembanas, 2015).

En los últimos años el rápido desarrollo en el campo de los exosomas ha atraído mucho la atención de investigadores y de profesionales del área de diagnóstico. Por ser un medio de comunicación intercelular recientemente descubierto (Lotvall & Valadi., 2007; Valadi et al., 2007). Entonces la transferencia de información por los exosomas desempeña una función muy importante en la génesis de tumores, con perspectivas interesantes para su aplicación en diagnóstico temprano y el tratamiento, así como la evaluación de pronósticos. Sin embargo, la investigación en exosomas está todavía en una etapa temprana y existen aún algunos aspectos que deben ser investigados a profundidad (Valadi et al., 2007; Wahlgren et al., 2016). Establecer con claridad el contenido total de cada tipo de exosomas es crítico para un entendimiento de su origen celular e información contenida, así como la producción segura y efectiva de los mismos. Todavía a la fecha no existen métodos versátiles y precisos para la caracterización de los exosomas ni tecnologías estandarizadas, para su aislamiento y caracterización, también es evidente que hay escasa información sobre los mecanismos de formación y los componentes que los constituyen bajo diferentes condiciones (Lässer et al., 2011; Wahlgren et al., 2016). Los exosomas pueden ser usados como sistemas de reparto basados en sus características únicas y son superiores a los transportadores artificiales en muchos aspectos no obstante esto las rutas de administración, dosis y costos, así como los principios de diseño para los exosomas con cargas artificiales para las terapias basadas en ellos requieren enorme mejoramiento y optimización (Wahlgren et al., 2016). Otro aspecto interesante es que la regulación de los mRNAs por exosomas enriquecidos con miRNAs o incluso lncRNAs y otros ncRNAs promotores de tumores no está bien comprendida. Más aun la cantidad de exosomas varía consistentemente de acuerdo con condiciones del microambiente, y particularmente cuando las células están sujetas a factores de estrés (Parolini et al., 2009; Hedlund et al., 2011). De esta forma el elevado pH asociado con el medio extracelular en tumores sólidos se correlaciona con factores de quimio resistencia y

agresividad, además es considerado como un mecanismo para incrementar la liberación y captación de exosomas (Simon et al., 1994; Mahoney et al., 2003; Nishisho et al., 2011).

DNA en exosomas

Existe un gran desarrollo de pruebas para la detección temprana de cáncer, a nivel terapéutico es mejor atacar los tumores cuando su tamaño es pequeño de allí la importancia de detección temprana, cuando son pequeños son menos complejos y no-metastáticos. Aquí es en donde el DNA de tumores circulantes (ctDNA) es importante pues se puede aislar de suero y compromete solo una fracción del DNA libre en las biopsias líquidas, estas demuestran correlaciones exitosas con la patología en tumores sólidos. Los niveles de ctDNA son mayores en pacientes con estadios avanzados de cáncer de mama, colon, pancreático y gastroesofágico entre otros (Ossandon et al., 2018). Específicamente se ha determinado que los fragmentos desde 90 a 150 bp. esta enriquecida en estas muestras (Mouliere et al., 2018). Estudios más recientes evaluaron diferencias en la fragmentación por detección directa en etapas tempranas de la enfermedad mostrando claras diferencias (Cristiano et al., 2019).

Exosomas y su contenido como biomarcadores en Astrocitomas (Ast)

Las características moleculares son diferentes en niños y adultos en el caso de los Ast debido a esto se realizan diferentes investigaciones para determinar las características moleculares de biomarcadores de los pacientes pediátricos con cáncer (Hernández et al., 2022). Un ejemplo de esto es un trabajo previo donde se encuentran muchos lncRNAs diferencialmente expresados, con usos potenciales de biomarcadores (Ruiz et al., 2017). También se demostró un poco después el uso potencial de los ncRNAs en particular los miRNAs como biomarcadores en astrocitomas pediátricos **p-Ast** (López et al., 2017). En el año 2021, la organización mundial de la salud reclasificó a los tumores relacionados al sistema nervioso central, como ejemplo el glioma angiocentrico, se definió con características de fusión genética, en un evento de este tipo se suele inactivar la expresión de un gen que en este caso es el gen **QKI** (Louis et al., 2021). La consecuencia es la inactivación de la función del supresor tumoral **QKI** “KH Domain Containing RNA Binding” y por lo tanto la activación de **MYB** Proto-Oncogene, Transcription Factor (Mulholland et al., 2006; Yang et al., 2010). Este protooncogén **MYB** afecta la proliferación celular y genera anomalías durante la

diferenciación. además, se detectaron alteraciones en otras enfermedades humanas (Ramsay & Gonda, 2008; Ramkissoon et al., 2013). Debido a que la obtención de biomarcadores circulantes es poco invasiva pues se puede obtener fácilmente a través de una muestra de suero sanguíneo. Un área de reciente desarrollo es la búsqueda de biomarcadores circulantes en enfermedades complejas de formas menos invasivas por la proclividad a complicaciones quirúrgicas. Estos biomarcadores pueden ser proteínas específicas o bien ncRNAs que pueden expresarse específicamente en ciertos tejidos en determinados estados patológicos. para el caso de astrocitomas existen pocos estudios con exosomas obtenido de pacientes con este tipo de tumores y se debe incluir la caracterización cualitativa y cuantitativas de estos transcritos con respecto a su desregulación respecto a controles. Los astrocitomas pilocíticos grado I según la OMS (PA I) y astrocitomas difusos según la OMS grado II (A II) exhiben las características morfológicas que permiten distinguir estos tumores en la mayoría de las instancias mientras que PA I exhibe baja celularidad y se caracteriza por ser un tumor alargado o células tumorales bipolares, acompañadas por fibras de Rosenthal, y un patrón vascular típico con vasos glomerulados y hialinizados, para los del tipo A II mayormente presente con células de astrocitos moderadamente densas en una estructura suelta comúnmente con un estroma de micro quistes, con vasos inconspicuos, la variación morfológica y el limitado material de las biopsias, las variantes raras de PA I como el astrocitoma difuso pilocítico del cerebelo asemejan la histología de A II y son muy difíciles de discernir solo morfológicamente (Hayostek et al., 1993). Otro obstáculo frecuente para el diagnóstico es un pequeño tamaño de muestra debido a la localización del tumor en áreas sensitivas o debido a técnicas como la biopsia estereotáctica, en estos casos marcadores específicos adicionales del tumor junto con sus características pueden ayudar mucho las mutaciones en el gen citosólico humano NADP⁺ deshidrogenasa dependiente de isocitrato (**IDH1**) se reportan muy frecuentes recientemente, aproximadamente un 70–80% en el A II, pero son muy raras en el PA I (Watanabe et al., 2009). Por otro lado, los nuevos descubrimientos establecen una ganancia de número de copias en la banda cromosómica 7q34 incluyendo el oncogén homólogo B1 viral de sarcoma v-raf (**BRAF**) como una lesión típica para PA I, vista aproximadamente en un 70 % pero este es mucho menos frecuente en A II (Pfister et al., 2008). Estudios recientes encuentran una ganancia en número de copias en 7q34 que debe de ser ocasionada por una duplicación en tándem que produce una fusión

de los genes *BRAF* y *KIAA1549* los cuales faltan de un dominio auto inhibitorio de tipo salvaje BRAF. Este evento resulta en la activación de la vía **ERK/MAPK** y promueve las transiciones G2/M del ciclo celular. las mutaciones espontaneas de *IDH1* en gliomas inicialmente fueron identificados en un análisis amplio de glioblastomas (Korshunov et al., 2009). Muy interesantemente solo pocas mutaciones fueron detectadas en glioblastomas primarios, mientras la mayoría de los secundarios llevan esta alteración, poniendo la atención en los tumores tipo A II, de astrocitomas anaplásicos y tumores oligodendroglomas. las mutaciones ocurridas en el codon 132 (Balss et al., 2008). Resultan en un cambio de aminoácido que conducen a la inactivación de isocitrato deshidrogenasa 1, esto a su vez activa el estrés oxidativo y la activación del factor inducible de hipoxia (*HIF1*) (Pfister et al., 2008; Korshunov et al., 2009). La frecuencia alta de las fusiones ***BRAF-KIAA1549*** y las mutaciones *IDH1* hacen estas anomalías genéticas son candidatos para marcadores moleculares con alto potencial de diagnóstico para distinguir el PA I del A II (Zhao et al., 2009).

3.4. Biomarcadores en el cáncer.

La identificación de biomarcadores es de suma importancia para poder brindar una mejor atención hospitalaria más rápida y menos riesgosa para los pacientes pediátricos con esta enfermedad, una ventaja para el caso de biomarcadores en la fracción del secretoma que sería el caso de aislamientos de exosomas del suero de estos pacientes es debida a la alta concentración de moléculas específicas que son transportadas en un ambiente protector que la preserva del daño que pudieran sufrir por enzimas hidrolasas tales como DNAsas, RNAsas e incluso proteasas, este ambiente protector al interior del exosoma protege su carga o las moléculas transportadas en su interior eficazmente (Keller et al., 2011; Wang et al., 2014).

Biomarcadores útiles en la clínica

Los RNAs Circulares (circRNAs) son moléculas de RNA no codificantes endógenas que son muy estables y conservadas evolutivamente (Jeck & Sharpless, 2014). Estas moléculas exhiben expresión tejido específica, esta depende del estado de desarrollo. los estudios bioinformáticos de secuencias demuestran que más del 90% de los circRNAs se originan de exones y tienen una función importante en la regulación post-transcripcional de la expresión

genética (Memczak et al., 2013). Este proceso es desarrollado de tal forma que la complementariedad de sus secuencias les sirve para interaccionar con moléculas de miRNAs y afectan la actividad reguladora de los mismos. Normalmente los genes codificantes de cinasas son sus precursores (Hansen et al., 2011). Los circRNAs están localizados predominantemente en el citoplasma, pero se ha encontrado que el suero humano contiene un gran número de moléculas intactas de circRNAs en forma muy estable (Hansen et al., 2013). Al igual que otros RNAs los circulares mantienen su actividad biológica en los exosomas y son transferidos exitosamente a las células blanco. Estas moléculas están relacionadas directamente en arterioesclerosis, desordenes del sistema nervioso y cáncer (Hansen et al., 2013). Investigación reciente en cáncer de colon y de estómago demostrado que las células tumorales liberan circRNAs que pueden usarse como biomarcadores específicos para estas enfermedades (Hansen et al., 2013). Sabemos que biomoléculas específicas están en circulación durante el desarrollo del cáncer, estas biomoléculas son secretadas por células y pueden ser ncRNAs, proteínas o ncRNAs, también pueden tener la capacidad de transformar sus células no-neoplásicas blanco (Sato & Weaver, 2018). Algo importante es que una vez identificadas pueden ser usadas como biomarcadores de cáncer, pero estas clasificaciones comúnmente se aplican en adultos (Haug et al., 2015; Kling et al., 2017). Mediante análisis computacionales y métodos experimentales, se ha encontrado que muchos ncRNAs regulan la expresión genómica a nivel transcripcional y traducional, entre otras funciones (Gandhi et al., 2018; Fabbri et al., 2019). Estos sistemas de regulación metabólica y genética, desarrollados simultáneamente al de proteínas, muestran una conservación funcional y en ocasiones de secuencias entre organismos del mismo linaje. Entonces se consideran los ncRNAs de importancia en la regulación de la función celular y en mecanismos de adaptación evolutiva (Mercer et al., 2009; Rashid et al., 2016). Los ncRNAs pueden ser clasificados generalmente como genes constitutivos “housekeeping” o de tipo regulatorio (Wei & Zhou, 2016). Los primeros incluyen a los tRNAs, rRNAs, RNAs pequeños nucleares (snRNAs), y nucleolares (snoRNAs). Mientras que los clasificados como regulatorios son los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) y los RNAs pequeños no codificantes (sncRNAs), clasificados con base en el tamaño de los transcritos; los primeros mayores a 200 pares de bases y los últimos menores que 200 (Wei & Zhou, 2016).

miRNAs usados como biomarcadores

Un número creciente de miRNAs circulantes se encuentran con tener el potencial de biomarcadores de pronósticos para varios tipos de pacientes con cáncer, especialmente son difíciles de detectar en la etapa temprana. Sin embargo la diferencia entre los criterios de investigación científica y de aplicación clínica son demasiado obvios. Por esta razón se deben de examinar cuidadosamente los miRNAs y estar seguros de que no solo este expresado diferencialmente, sino que también debe de definir la correlación entre la enfermedad y todos los pacientes. Los tamaños de muestra “n” limitados son un obstáculo inevitable en la aplicación práctica clínica, el nivel de los biomarcadores circulantes puede estar bajo la influencia de muchas características individuales de los pacientes: edad, genero, grupo étnico, estilo de vida, historia de enfermedades, tipo de hábitat y otras más. Aun, aunque no es muy afectado el diagnóstico y pronóstico por estos factores la proporción puede ser limitada, por eso es muy importante estudios de cohorte amplios en evaluaciones futuras de los biomarcadores. La detección de estos biomarcadores puede ser afectada por los métodos de medición, instrumentos, y capacitación técnica y experiencia del personal de laboratorio. La expansión del tamaño de muestra es por lo tanto un proceso crítico para asegurar a precisión del diagnóstico en cáncer mediante la detección cuantitativa absoluta. Los miRNAs diferencialmente expresados en circulación ya sean en forma de complejos de ribonucleoproteínas (RNP) o los empaquetados en exosomas podrían también estar teniendo otras funciones o ser consecuencia de los resultados de la enfermedad como metabolitos transitorios o bien participar en el desarrollo de tumores directa o indirectamente y entonces no pueden funcionar como biomarcadores por si solos.

Biomarcadores usados en pruebas comerciales

Debido a su capacidad en la diferenciación de subtipos de cáncer, compañías biotecnológicas desarrollan productos basados en niveles de expresión de miRNAs para diagnóstico, mediante solo 8 miRNAs, mi-LUNG (Rosetta Genomics Ltd.) identifica los diferentes subtipos de cáncer de pulmón con una elevada sensibilidad (94%) y especificidad (98%) (Gilad et al., 2012). Además de su utilidad diagnóstica, diversos indican que la detección de miRNAs en muestras tumorales puede presentar también utilidad pronóstica en varios tipos de cáncer, como es el caso de miRNA-224 y miRNA-200a en cáncer de colon (Pichler et al.,

2014) y la detección del miRNA-155 en linfomas (Pichler et al., 2014). El análisis de expresión de ncRNAs (especialmente miRNAs y lncRNAs) en muestras tumorales presenta relevancia para encontrar posibles biomarcadores de tipo tumoral. Los primeros trabajos de patrones de expresión de miRNAs como herramientas de clasificación en los tumores mostraron que permitían distinguir el origen del tumor y daban información sobre su grado de diferenciación, también clasificaron tejidos tumorales poco diferenciados (Cai et al., 2009; T. Song et al., 2010).

Paneles de diagnóstico

Los biomarcadores son un área de investigación que presenta un potencial clínico y logra proporcionar información suficiente sobre el estado de la enfermedad tumoral. Diferentes etapas y tipos de cáncer reflejan una firma única y pueden implementarse como biomarcadores específicos para establecer el tipo de tumor y tener un diagnóstico y pronóstico más precisos, mejor manejo y tratamiento del cáncer. Pueden ayudar en la detección de tumores desde etapas tempranas, para el diagnóstico precoz y detección de enfermedad mínima residual. Diferentes estudios demuestran que los biomarcadores tienen relevancia clínica, pero, sin embargo, para facilitar su uso generalizado en la clínica se requiere de una mayor estandarización y validación de muestras.

4. ARTÍCULO PUBLICADO

Circulating Y-RNAs: A Predicted Function Mainly in Controlling the Innate Immune System, Cell Signalling and DNA Replication in Pediatric Patients with Pilocytic and Diffuse Astrocytoma

Juan Manuel Rodríguez-Corona^{1,2}, Ruth Ruiz Esparza-Garrido¹, Jorge Víctor Horta Vega², Miguel Angel Velazquez Flores^{1*}

¹Department of Genetics, Mexican Institute of Social Security Mexico City, Mexico; ²Department of Genetics, National Technological Institute of Mexico, Cd Victoria, Mexico

ABSTRACT

Background: Y-RNAs are small noncoding RNAs firstly identified in patients suffering the Sjogren's syndrome and lupus erythematosus, having different predicted cellular functions. Y-RNAs are very abundant ncRNAs present in serum and only a few is known respect their molecular roles.

Objective: The aim of the study was to determine the circulating Y-RNAs expression from blood serum of paediatric patients with pilocytic or diffuse astrocytoma.

Materials and methods: Y-RNAs expression was determined by means of the Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 arrays. In addition, a bioinformatic approximation of the possible biological functions of Y-RNAs was determined with the Random Forest (RF) and Vector Support Machine (VSM) algorithms.

Results: Data showed a differential expression of RNY-3, RNY-4, and RNY-5 in paediatric patients with astrocytoma, relative to the control. Meanwhile, RNY-1 was shown to be upregulated in the diffuse condition *versus* the pilocytic. The bioinformatic analysis showed that RNY-4 and RNY-5 had the highest scores of interactions with Claudin, Toll-like receptors, and Hyaluronidase-1. In addition, the Y-RNAs loop domain by itself had the highest score of interaction with B cell receptor CD22 (RNY-3) and Toll-like receptor 7 and 3 (RNY-4). Conclusion: Our results showed, for the first time a differential expression of circulating Y-RNAs in paediatric astrocytoma, allowing to distinguish paediatric subjects without cancer from patients with paediatric diffuse or pilocytic astrocytoma and their potential involvement in regulating diverse biological processes, such as immune activation-suppression, cell signalling, selective transcription, and cell proliferation through activation of DNA replication.

Keywords: Toll-like receptors; Exosome; Regulation; Pediatric

INTRODUCTION

The RNA-Protein interactions have a critical participation in the cell function regulation [1,2]. It is estimated nearly 6% from the human proteome could bind to RNA. Evidence is available of RNA- proteins network interactions regulating cell signalling and genomic expression [2,3]. Around 98% of DNA does not code for proteins [4]. Approximately 99% from the total RNA, in a mammal cell, belongs to non-coding RNA (ncRNA) [5]. The ncRNAs are classified according to their length as small non-coding RNA (sncRNAs) with less than 200 nucleotides (nt) and long non-coding RNA (lncRNAs) with 200 or more nucleotides on length. A type of sncRNA are Y-RNAs, which were discovered by forming ribonucleoprotein (RNPs) complexes with the Ro60 (Ro60, Y-RNA Binding Protein) and La (Sjogren syndrome type B antigen (SS-B)) proteins, and autoantigens in patients suffering the Sjogren's syndrome and lupus erythematosus [6]. Y-RNAs, so called due to their identification in the cell cytoplasm (Y for cytoplasmic), are a family of RNAs transcribed by the RNA polymerase III, defined by their structure and affinity by the Ro60 protein [7]. The four genes are located as a tandem set at the chromosomal locus 7q36 [7]. But each Y-RNA has its own promoter and is independently transcribed [8]. Structurally, according to Kowalski and Krude [9], human Y-RNAs have four domains the 5' and 3' ends of the Y-RNAs hybridize forming a lower and upper double chain, an intermediate loop, and a polyuracil tail. The conserved binding sites of the Ro60 and La proteins are in the lower double chain and in the polyuracil tail, respectively. The middle loop is the most variable region and there is evidence that it binds to various proteins, including nucleolin [10]. Y-RNAs are highly conserved molecules and their translocation from the nucleus to the cytoplasm requires their binding to the Ro60 protein and to other snRNAs [11-13]. Y-RNAs can be secreted inside Extracellular Vehicles (EVs) derived from blood or stem cells, immune system cells, or tumor cells [14-17]. The first analyses concerning Y-RNA quantification in human cancers were performed with solid tumours from carcinomas and adenocarcinomas of the lung, kidney, bladder, prostate, colon, and cervix. As a rule, all four Y-RNAs were shown to be overexpressed in this type of cancers [18]. However, the RNY-5 expression does not generally correlate with that of the other, which could be explained by the fact that its

location (cell nucleus) is different from that of the others (cell cytoplasm) [19]. According to this, recent research has reported the downregulation of all human Y-RNAs in breast cancer, but RNY- 1, RNY-3, and RNY-4 showed a high expression correlation, whereas that of RNY-5 was less correlated [20]. Cancer-derived Extracellular Vesicles (Evs) in myelogenous leukaemia have a relatively high amount of RNY-5, which is the most abundant RNA after rRNA (ribosomal RNAs) and tRNA (transfer RNAs) [21]. In addition, evidence suggests a role for Extracellular Vesicles (EVs) as regulators for brain tumour progression [22]. Astrocytoma (Ast) are a heterogeneous group of the central nervous system tumours that differ in their morphologic characteristics and localization. Until 2016, paediatric and adult astrocytoma were classified into four main groups based on specific criteria established by the World Health Organization (WHO). These groups included, pilocytic Astrocytomas (pAst; grade I), diffuse Astrocytomas (dAst; grade II), and anaplastic Astrocytomas (AAst; grade III), as well as Glioblastoma Multiforme (GBM; grade IV) [23]. pAst and dAst are the most frequent tumours in children and aAst and GBM are relatively rare tumours [24]. Pediatric Ast (p-Ast) are the leading cause of childhood solid tumour deaths and although p-Ast and adult Ast (a-Ast) share signalling pathways that are altered, the molecular components are distinct [25-27]. Based on this, P-Ast and a-Ast are different clinical entities with specific genetic alterations. In 2016, the WHO proposed a new Central Nervous System (CNS) tumour classification based on molecular and epigenetic markers, as well as in the clinical behaviour of adult patients; however, more studies are needed to provide more molecular tools to this new classification with the aim of having a better Ast classification, impacting the diagnosis, prognosis, patient's survival, and drug therapy. In the present work, the circulating Y-RNAs expression was determined by means of the Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 Arrays from blood serum samples from paediatric patients with Ast. Bioinformatical analysis showed their interaction with different proteins, suggesting their involvement mainly in the control of immune system, cell signalling, and DNA replication.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Blood serum samples from paediatric patients with Ast (PAst, n=10, four boys and six girls; DAst, n=13, five boys and eight girls) were collected from 2017 to 2020. All children included in this study were patients from the Children's Hospital Dr. Silvestre Frenk Freund, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security (IMSS). The patient's age range was 0-15 years with no history of relatives with cancer. All children's relatives or tutors signed an informed consent.

Ethics

The project had the approval of the Children's Hospital Dr. Silvestre Frenk Freund, National Medical Center XXI Century, Mexican Institute of Social Security, Ethics in Security Research (R-2014-3603- 27), which is in accordance with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical standards.

Exosome and RNA isolation

Exosomes were isolated with the total isolation exosome kit (from serum) (ThermoScientific) and the presence and integrity of exosomes was visualized by electron microscopy. For RNA isolation, exosomes were incubated for 15 h (4°C) with TRIZOL® (this was to optimally resuspend exosomes) and later with 40 µL chloroform for 15 minutes at 4°C. The aqueous phase (RNA) was transferred to a new tube and 500 µL isopropanol were added for RNA precipitation. Finally, RNA was washed three times with 75% ethanol and resuspended in 5 µL RNase-free water. RNA quantification was performed by spectrophotometry (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific).

GeneChip® human transcriptome array 2.0

Three conditions (Control (n=50), pilocytic (n=10), and diffuse (n=15)) were used for the analysis of differential expression of the exosome- derived transcriptomes. The Human Transcriptome Array (HTA) 2.0 (ThermoScientific) determined the differential expression among arrays of distinct experimental conditions. The expression analysis was done by groups (Pulls) and not individually, therefore, differences in the transcript expression for each sample could not be detected. With this array, it was possible to evaluate >285,000 full-length

covered transcripts, >245,000 coding transcripts, >40,000 non-coding transcripts, and >339,000 probe sets covering exon-exon junctions. Median expression levels ($p < 0.001$) were significant. Data were uploaded to GEO (Gene Expression Omnibus; number: GSE216815).

Bioinformatic analyses

To perform bioinformatic analyses, the web server interface (free access), belonging to the Iowa State University, was used (RNA-Protein Interaction Prediction Server Protein-RNA Interaction Database (PRIDB) RPI-Seq Version Dobbs Lab) [28,29]. Sequences of the four human Y-RNAs were downloaded from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) nucleotide databases. Protein sequences of cell receptors from diverse protein families were obtained by using key words and *Homo sapiens* (txid9606), being in total 1319 sequences. Filtered applied: from zero to twelve hundred amino acids in length. Protein sequences of toll-like cell receptors were downloaded from the NCBI protein database by using key words: (Toll, Cell, Receptors, and Human) and *Homo sapiens* (txid9606), being in total one hundred and nineteen not filtered sequence. The removal of the terminal segments in the 5' and 3' terminals, to generate transcripts only with the loop domain from the four human Y-RNAs, was performed. Protein sequences of the Wnt cell receptors were downloaded by using key words and *Homo sapiens* (txid9606), being in total thirty-seven sequences. In the same way, protein sequences related to the Origin of Replication Complex (ORC) were retrieved using key words and *Homo sapiens* (txid9606), being in total one thousand, two hundred eighty-six. Filtered applied from zero to one thousand two hundred amino acids in length. All the sequences were checked manually to avoid redundant annotations or duplicated sequences and formatted and ready to be entered into the web server: <http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq>. In this work, data obtained with the Random Forest (RF) algorithm were mainly discussed, since its predictions are the most validated at the experimental level. Only in the interactions of Y-RNAs with the proteins related to the Origin of Replication Complex (ORC), the scores obtained with Random Forest (RF) and SVM were shown. This was with the purpose of comparing the results obtained with both classifiers. Although values greater than 0.5 were taken as significant, those closest to 1 have the highest probability of occurring *in vivo*. Essentially, RPIseq exploits the aminoacidic composition of proteins sequences and the ribonucleotides composition from the RNA

sequences to predict the probability of *in vivo* interactions of a pair (RNA-Protein). This web server RPIseq implements the RPIseq method developed by Muppirala [28,29]. This algorithm takes a data pair of sequence belonging to RNA and protein as an input, and computes probabilities of interaction through the Random Forest (RF) and SVM trained classifiers using the datasets from the RPI2241. This interface could accept many proteins against a specific RNA molecule or vice versa users could introduce a maximum of 100 sequences.

String protein network Cytoscape is an open-source software platform for visualizing molecular interaction networks and biological pathways and integrate these networks with annotations, gene expression profiles, and other state data. Although Cytoscape was originally designed for biological research, now it is a general platform for complex network analysis and visualization [30]. The String Networks were constructed with Cytoscape 3.8.2 for windows, using String Protein Query database.

Enrichment analyses We used PANTHER GO-slim", which uses a selected set of terms from the Gene OntologyTM for classifications by molecular function, biological process, and cellular component. The PANTHER Protein Class ontology was adapted from the PANTHER/X molecular function ontology and includes commonly used classes of protein functions, many of which are not covered by Gene Ontology (GO) molecular function. Download the classes and relationship information [31].

RESULTS

GeneChip HTA 2.0 array the comparison between the Pilocytic and Control conditions showed subtle changes in the expression of RNY-3 (upregulated in PAs) and RNY-4 and -5 (both downregulated) as shown in Figure 1A and Table 1. By contrast, RNY-1, -3, and -5 were highly upregulated in the diffuse condition compared to the Pilocytic and Control conditions as shown in Figures 1B and 1C and Table 1.

Predicted human Y-RNAs interactions with proteins.

To gain insight in Y-RNAs knowledge, the interaction of Y-RNAs with cell receptors was bioinformatically studied in most cases, the Random Forest (RF) algorithm showed the highest scores of interactions for RNY-4 and RNY-5, followed by RNY-1 and RNY-3 (Table 2). RNY-4 and RNY-5 showed most interaction with Claudin domain- containing protein, G-protein coupled receptor 37, cation channel subfamily M, Hyaluronidase-1, and Sorting nexin-4, among others. Meanwhile RNY-1 with G-protein coupled receptor 37 and Linker for activation of T-cells for example. RNY-3 has the potential to bind with Lysosome membrane protein 2 and Fibroblast growth factor 23.

Cell receptors

Results generated by the Random Forest (RF) algorithm showed high scores (7, 8.5, or 9) for the Y-RNAs and generalized cell receptors interactions. The most significant interactions corresponded to RNY-4 and RNY-5, followed by RNY-1 and RNY-3 as shown in Figures 2A- 2C. RNY-4 downregulation in the pilocytic and diffuse conditions compared to the control might result in aberrant Toll-like Receptors (TLRs) activation or OCR control. This might be affecting cell division and response to stimulus, such as communication of immune related cells with the local environment as shown in Figures 2D-2F and Figures 3A-3C). Meanwhile, the overexpression of RNY-1 and RNY-3, in the diffuse and control conditions relative to the pilocytic one, might be affecting innate and acquired immune related process as well as cell signalling mechanisms (Figures 2A and 3A).

Table 1: YRNA relative levels detected in exosomal samples of pediatric astrocytoma and controls.

YRNA	Diffuse	Pilocytic	Fold change
RNY-1	15.95	9.37	95.69
RNY-5	10.18	5.5	25.63
RNY-3	18.7	14.19	22.68
RNY-4	8.76	10.68	-3.77
YRNA	Diffuse	Control	Fold change
RNY-3	18.74	11.58	143.58
RNY-1	16.15	9.53	98.05
RNY-5	9.81	8.09	3.29
RNY-4	7.67	12.7	-32.63
YRNA	Pilocytic	Control	Fold change
RNY-3	14.43	11.58	7.21
RNY-5	5.22	8.09	-7.3
RNY-4	10.19	12.7	-5.68

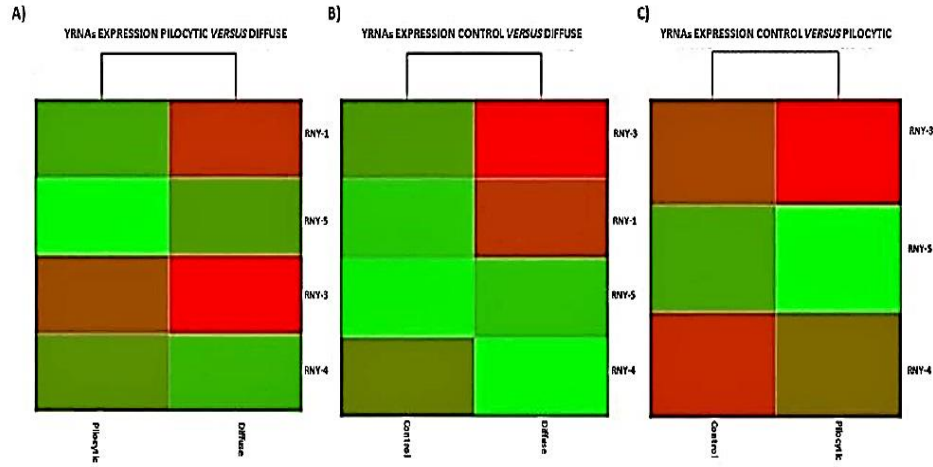


Figure 1: Heatmaps of differentially expressed YRNAs in exosomal samples (A): Pilocytic versus diffuse; (B) Control versus diffuse; (C) Control versus pilocytic.

Table 2: Top 10 interactions of human YRNAs.

Protein	YRNAs Subtypes					
	NP_ or XP_	1	3	4	5	A
Higher average score for each human YRNAs with different families of receptor proteins						
Transient receptor potential cation channel subfamily M	1353082	0.7	0.75	0.85	0.85	0.7875
G-protein coupled receptor 37-like 1	4758.3	0.75	0.65	0.85	0.9	0.7875
Claudin domain-containing protein 1 isoform a	1035271	0.75	0.7	0.95	0.7	0.775
Lysosome membrane protein 2 isoform 1	5497.1	0.7	0.85	0.85	0.7	0.775
Hyaluronidase-1 isoform 3	695015.1	0.6	0.7	0.85	0.95	0.775
Sorting nexin-4	3785.1	0.75	0.6	0.85	0.85	0.7625
Linker for activation of T-cells family member 1 isoform a	55202.1	0.75	0.6	0.85	0.85	0.7625
Fibroblast growth factor 23	65689.1	0.65	0.8	0.85	0.75	0.7625
Claudin domain-containing protein 1 isoform d	1035290	0.65	0.7	0.9	0.8	0.7625
Tumor necrosis factor receptor superfamily member 19	61117.2	0.75	0.7	0.85	0.75	0.7625
Higher average score for each of the human YRNAs with Toll-like proteins						
B-cell receptor CD22 isoform 1	1762.2	0.7	0.65	0.9	0.75	0.75
Protein unc-93 homolog B1	112192.2	0.65	0.7	0.75	0.85	0.7375
Toll-like receptor 8 isoform 2	619542.1	0.6	0.8	0.9	0.65	0.7375
Toll-like receptor 7	57646.1	0.55	0.65	0.9	0.8	0.725
Toll-like receptor 10 isoform a	1017388	0.55	0.65	0.8	0.9	0.725
Toll-like receptor 8 isoform 1	57694.2	0.65	0.7	0.9	0.65	0.725
Toll-like receptor 10 isoform a	112218.2	0.55	0.65	0.8	0.9	0.725
Toll-like receptor 5	3259.2	0.55	0.6	0.95	0.8	0.725
MHC class I-related gene protein isoform 1	1522.1	0.65	0.7	0.85	0.65	0.7125
Interleukin-1 receptor type 1 isoform 4	1307913	0.75	0.55	0.85	0.7	0.7125
Higher average score for each of the human YRNAs Loop domains with Toll-like proteins						
B-cell receptor CD22 isoform 1	1762.2	0.7	0.9	0.8	0.75	0.7875

B-cell receptor CD22 isoform 3	1172029	0.7	0.85	0.8	0.7	0.7625
Toll-like receptor 7	57646.1	0.6	0.75	0.85	0.8	0.75
Tolllike receptor 3	3256.1	0.65	0.7	0.85	0.7	0.725
Interleukin-1 receptor type 1 isoform 1	868.1	0.6	0.8	0.8	0.65	0.7125
B-cell receptor CD22 isoform 4	1172030	0.6	0.8	0.75	0.7	0.7125
Interleukin-1 receptor type 1 isoform 4	1307913	0.7	0.7	0.7	0.7	0.7
Protein unc93 homolog B1	112192.2	0.65	0.7	0.7	0.75	0.7
Toll-like receptor 10 isoform a	1017388	0.6	0.75	0.7	0.7	0.6875
Single Ig IL-1-related receptor	-	0.55	0.75	0.7	0.75	0.6875
Higher average score for each of the human YRNAs against wnt cell receptors						
Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1 isoform 1	1026892	0.6	0.5	0.65	0.6	0.5875
Glycogen synthase kinase-3 beta isoform 2	1139628	0.55	0.55	0.6	0.4	0.525
Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1 isoform 3	1177653	0.55	0.55	0.7	0.5	0.575
Metastasis-associated protein MTA1 isoform MTA1s	1190187	0.6	0.6	0.75	0.55	0.625
CCN family member 4 isoform 3	1191798	0.4	0.5	0.65	0.6	0.5375
CCN family member 4 isoform 4	1191799	0.4	0.45	0.6	0.55	0.5
Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1 isoform 4	1241881	0.6	0.55	0.65	0.55	0.5875
Protein Wnt-8a isoform 1 precursor	1287867	0.5	0.55	0.8	0.75	0.65
Protein Wnt-8a isoform 2 precursor	1287868	0.45	0.55	0.7	0.7	0.6
Alpha-tubulin N-acetyltransferase 1 isoform 5	1305691	0.6	0.55	0.65	0.55	0.5875

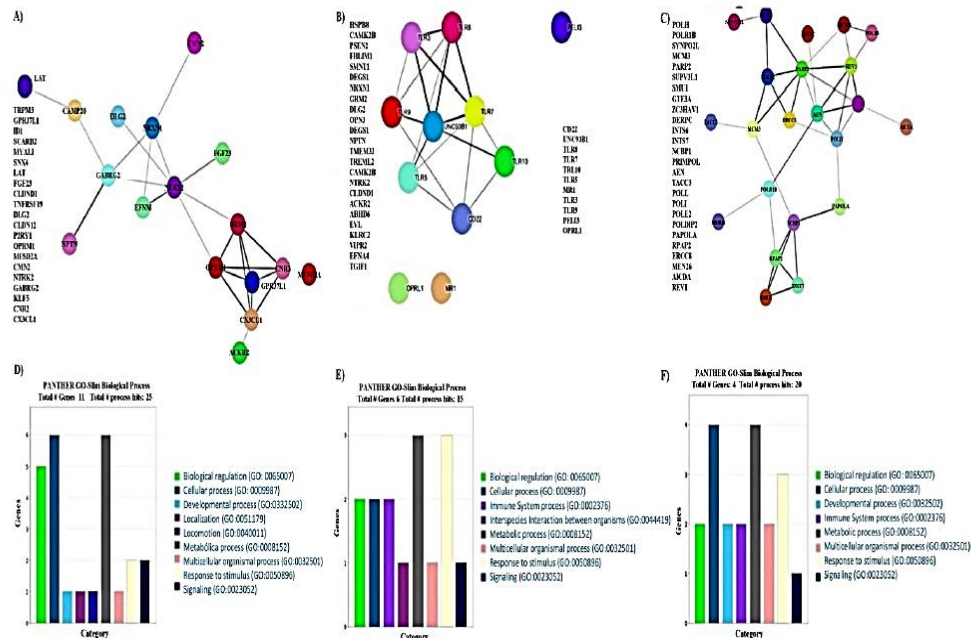


Figure 2: String protein networks (A): Y-RNAs interactions with different families of receptor proteins; (B): Y-RNAs-Toll-like receptor interactions; (C): RNY4 interactions with ORC proteins; (D-F) The biological processes that could be affected by changes in the expression of Y-RNAs and their interaction with various cellular receptors were determined with PANTHER database. **Note:** (■): Biological regulation (GO:0065007); (■): Cellular response (GO:009987); (■): Developmental process (GO:0032502); (■): Localization (GO:0051179); (■): Locomotion (GO:0040011); (■): Metabolic process (GO:008152); (■): Multicellular organismal process (GO:0032501); (■): Response to stimulus (GO:0050896); (■): Signaling (GO:0023052).

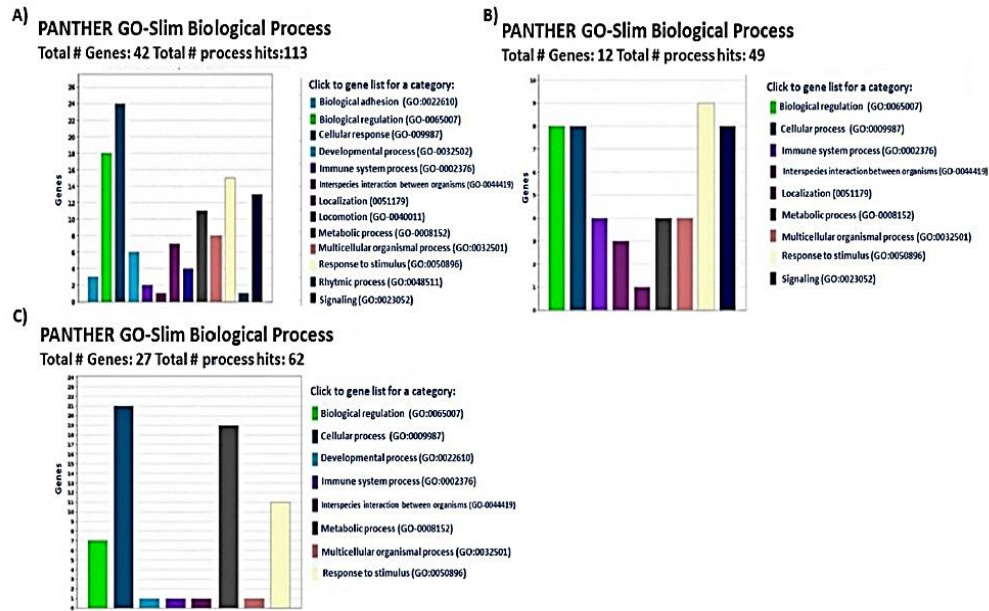


Figure 3: PANTHER analysis. (A): Biological processes related to the Y-RNAs target proteins, by using the top 11 protein coding genes; (B): Biological processes related to the Toll-like receptor proteins, identified as potential strong YRNAs interactors, by using the top 6 protein coding genes averages versus diverse cell receptor proteins; (C): Biological process related to the ORC (target proteins) detected as potential strong interactors of Y-RNAs, using the higher scores with respect to the RNY-4 molecule. **Note:** (■): Biological adhesion (GO:0022610); (■): Biological regulation (GO:0065007); (■): Cellular response (GO:009987); (■): Developmental process (GO:0032502); (■): Immune system process (GO:0002376); (■): Interspecies interaction between organisms (GO:0044419); (■): Localization (GO:0051179); (■): Locomotion (GO:0040011); (■): Metabolic process (GO:0008152); (■): Multicellular organismal process (GO:0032501); (■): Response to stimulus (GO:0050896); (■): Rhythmic process (GO:0048511); (■): Signaling (GO:0023052).

Y-RNAs interactions with ORC-associated proteins

Predictions showed some of the highest scores for Y-RNAs interactions with ORC-associated proteins, particularly for RNY-4 and RNY-5 as shown in Table 3. This reinforces previous evidence indicating the presence of Y-RNAs in Origin of Replication Complex (ORC) [32]. Interactions with the highest scores involved diverse proteins related to Deoxyribonucleic Acid (DNA) replication, i.e., DNA polymerases, transcription factors, helicases, and others. According to the Random Forest (RF) classifier, RNY-4 seems to be particularly important since it showed a lot of predicted interactions with this type of proteins. These interactions might have a biological impact on DNA replication and cell proliferation (Table 3).

Toll-like receptors

Due to experimental evidence indicating the interaction of many Y-RNAs with the Toll-like Receptor 3 (TLR3) and Toll-like Receptor 7 (TLR7) receptors [28]. Y-RNAs-Toll-like

receptors interactions were predicted. Like the above results, the RNY-4 and RNY-5 had the most significant score values of interaction (according to random forest), with a 0.9 score for the RNY-4 and RNY-5 interaction with CD22 (CD22 molecule) and TLR7 and TLR8. The RNY-4 interaction with TLR5 showed an interaction score of 0.95 and that of the RNY-5 with TLR10 and the unc-93 protein were 0.9 and 0.85, respectively. When we considered the average score for the four Y-RNAs, the highest score was with CD22, followed by unc-93, and TLRs 7 and 8. Interestingly, RNY-4 had the most significant score of interaction with TLRs. Y-RNAs interactions with TLRs might be related to innate immune system regulation and consequent feedback by cytokines and/or chemokines secretion by target cells or tissues.

Wnt receptors

To the best of our knowledge, Y-RNAs interactions with Wnt receptors have not been previously reported; therefore, these interactions were tested. Y-RNAs-Wnt receptors interactions showed very low score values, suggesting weak probabilities of interaction of these molecules *in vivo*.

Y-RNAs loop domain

Recent evidence shows the *in vivo* RNase 1 processing of Y-RNAs, producing different fragments of different size of these RNAs [29]. Based on this, the interaction of the loop domain of the Y-RNAs with TLRs was tested. Data showed high scores of interactions, which were very similar to that obtained when the whole Y-RNAs (with their four domains) were, analysed (Table 2).

Y-RNAs interactions with the ORC

On average, all four Y-RNAs are significantly overexpressed in solid tumors by 4-fold and 13-fold compared to non-neoplastic tissues. The RNY-1 and RNY-4 expressions were demonstrated. The downregulation of either RNY-1 or RNY-3, or both by siRNAs, leads to a significant reduction of the replicating cells in the S phase, indicating their participation in the Origin of Replication Complex (ORC) formation. In agreement to this, our data showed a strong interaction of RNY-4 with Minichromosome Maintenance Complex Component 3 (MCM3), which is involved in the initiation of the eukaryotic genome replication. This

protein, together with other MCM proteins, conform the pre-Replication Complex (pre-RC) and may be involved in the replication fork formation and in the recruitment of other DNA replication of related proteins [39]. In pediatric patients with Ast, the circulating RNY-4 expression was considerably diminished suggesting a loss of its regulatory function in comparison to controls; however, it is important to know if the concentration of free or packed RNY- 4 in other Extracellular Vesicles (Evs) also decreases. By contrast, the RNY-5 expression was upregulated, but its interaction scores were not so significant. The identification of the target cells of the exosomes Pediatric patients with Ast is crucial, since this will make it possible to know if RNY-4 is integrated to the Origin of Replication Complex (ORC) of these cells or have different functions.

Y-RNAs loop domain

An interesting result was the fact that the Y-RNAs loop domain by itself interacted with TLRs, supporting the notion that processed Y-RNA fragments could be functional [40]. This domain is the least conserved in Y-RNAs and, according to this, it is speculated that the loop domain gives a specific function to each Y-RNA among species. In fact, this domain could be participating in specific cellular functions [41,42]. Either as activator or modulator of their function and has been experimentally used for several protein binding sites for the Y-RNAs loop domain for proteins such as Nucleolin (NCL), Polypyrimidine- tract Binding Protein 1 (PTBP1) and Z-DNA-Binding Protein 1 (ZBP1) [9].

Protein interactome and PANTHER and string analyses

To gain insight into the biological impact of Y-RNAs interactions with cell receptors, the protein interactome as shown in Figure 2A and the biological processes were analysed with string and PANTHER. The main biological processes in which these proteins are participating were cellular and metabolic processes, and biological regulation as shown in Figure 3A. Meanwhile, TLRs interactome mainly showed the interaction between TLRs and to a lesser extent with other proteins of with which Y-RNAs interact as shown in Figure 3B. According to PANTHER, TLRs interactome are involved in the control of metabolic process and response to stimulus as shown in Figure 3B. Origin of Replication Complex (ORC)

proteins interactome showed a complex network of interactions mainly involved in biological regulation, cellular process, and developmental process as shown in Figure 3C.

DISCUSSION

Circulating Y-RNAs showed relative high expression changes among the studied groups, and they were predicted to be involved in controlling specific signalling pathways. Their role as biomarkers for p-Ast has to be established with further studies. This type of RNAs is involved in diverse biological processes, such as cell communication, immune activation and DNA replication [33]. Evidence has demonstrated individual interactions of Y-RNAs with specific proteins as TLRs. However, to our knowledge, Y-RNAs interactions with different protein families have not been tested. Therefore, the present study showed a predictive approach to identify Y-RNAs interactions with different types of proteins. Interactions with TLRs were predicted to validate our bioinformatics model. Data indicate strong interactions of Y-RNAs with protein families not previously described. The enigma regarding the relative abundance of Y-RNAs and their fragments in serum, as well as their function as circulating molecules it is still unknown. In healthy individuals, circulating Y-RNAs have been described as both free circulating molecules and inside Extracellular Vesicles (EVs), and their overexpression was observed in cancer [34,35]. The predictions of interaction probabilities presented here support the notion that Y-RNAs could be effectively multitasking molecules, regulating key biological processes by controlling metabolism pathways and by affecting cellular processes in cancer or other pathologies. Thus, as an aftermath of molecular interactions with cell receptors or other type of proteins this might result in the immune signalling regulation by activating cellular processes as apoptosis, abnormal cell proliferation, cell cycle alterations, and others. Our predictions showed the interaction of Y-RNAs with diverse cell receptors, which could change cell responses to environment. The fact that specific subtypes of Y-RNAs showed higher interaction scores with specific proteins could indicate specific functions for each of these ncRNAs. Therefore, this type of studies allows us to predict specific interactions from the whole Y-RNAs molecules or from their fragments with cell receptors, which in turn might trigger signalling cascades depending on the cell receptor repertoire and the relative abundance of the distinct Y-RNAs subtypes in a tissue. The highest score values were observed for RNY-4 and RNY-5 by interacting with different types of

proteins. It is of interest to note the high scores for RNY-4 and RNY-5 interactions with TLR10 and TLR5. TLR10, unlike other TLRs, do not activate the immune system and instead they suppress inflammatory signalling [36]. Importantly, TLR10 ligand has not been identified yet and these Y-RNAs could be natural ligands for this receptor. Meanwhile, TLR5 is an immune sensor and a receptor recognizing flagellated bacteria, and it is involved in the control of inflammatory responses and adaptive immunity [37,38]. In innate immunity TLRs induce cell activation leading to cytokine release. Particularly, the activation of TLR3, TLR7, TLR8, and TLR9 induce the expression of inflammatory-cytokines and type I interferons to counteract viral infections. TLRs are ancient elements of the immune system and, similarly to Y-RNAs, they are evolutionarily conserved. Since Human embryonic kidney 293 (HEK 293) cells express TLR-3, TLR-7, or TLR-8, these cells were used to determine the TLR-inducing activities of Y-RNAs. This study showed that human and murine RNY-3 induces the activity of TLR-3, but not that of TLR7, indicating Y-RNAs specificity for TLRs. For the first time, it was demonstrated a differential activation of TLRs by distinct Y-RNA subtypes. According to this study, the authors conclude that Y-RNAs are selective for specific TLRs.

CONCLUSION

This study generated new questions without answers: What are the target tissues of these RNAs? What are their functions? Does the function of circulating Y-RNAs depend on whether they travel freely through the bloodstream or go inside Extracellular Vesicles (EVs)? Y-RNAs might be involved in many cellular functions, depending on many factors, such as the developmental stage of the organism, the cell type in which each Y-RNA is expressed, the combination of Y-RNAs expressed in the same cell type, and the proteins and other RNAs that are co-expressed with them, among others. Our data showed that Y-RNAs could be interacting with many types of proteins to regulate specific cell responses, but experimental verification is still necessary. Despite the above, Y-RNAs shown to be potential biomarkers for LgAst diagnosis and prognosis.

ACKNOWLEDGEMENT JMRC was supported by the Consejo Nacional de Ciencias y

Tecnología (CONACyT) with a doctoral grant scholarship: CVU: 101863 Support: 472835. The authors thank Research Square the Pre- print. We thank Sintagma Translations for the English proofreading and editing.

Research Article Correspondence to: Miguel Angel Velazquez-Flores, Department of Genetics, Mexican Institute of Social Security Mexico City, Mexico, E-mail: Dr. Velazquez. imss@gmail.com

Received: 01-May-2023, Manuscript No. CPOA-23-23818;

Editor assigned: 03-May-2023, Pre QC No. CPOA-23-23818 (PQ);

Reviewed: 17-May-2023, QC No. CPOA-23-23818;

Revised: 24-May-2023, Manuscript No. CPOA-23-23818 (R);

Published: 02-Jun-2023, DOI: 10.35248/2572-0775.23.8.239

Citation: Rodríguez-Corona JM, Esparza-Garrido RR, Horta Vega JV, Velazquez Flores MA (2023) Circulating Y-RNAs: A Predicted Function Mainly in Controlling the Innate Immune System, Cell Signaling, and DNA Replication in Pediatric Patients with Pilocytic and Diffuse Astrocytoma. Clin Pediatr, Vol.8 Iss.3 No:1000239

5. JUSTIFICACIÓN

Son pocos los estudios de caracterización del contenido de diferentes tipos de RNAs, codificantes y no codificantes, así como proteínas en exosomas, considerando su posible aplicación en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades como el cáncer, en particular en astrocitomas. Existe un enorme interés en estudiar esta habilidad de las microvesículas o exosomas respecto a comunicación intercelular, que puede conducir a reprogramar el ambiente celular influenciando positiva o negativamente el balance homeostático en una gran variedad de respuestas biológicas en diferentes tejidos. Esta contribución tan significativa en la actividad de transformación tumoral y procesos paracrinós, y por eso la importancia de revelar las funciones exactas de estos mecanismos para posteriormente establecer relaciones con otras vías como aquellas asociadas a factores de crecimiento y citosinas en la respuesta inmune.

El uso de estas vesículas derivadas de secretomas representan una alternativa promisoría para su uso en terapias de regeneración tisular y terapia anticáncer, además pueden ser relevantes en la disminución de rechazo en trasplantes, finalmente es esencial descubrir el efecto del contenido genético de estos exosomas para determinar los blancos de regulación en células receptoras y determinar así las redes de regulación que pueden estar involucradas en múltiples procesos como crecimiento, muerte y proliferación celular y la forma en que estos son afectados.

6. HIPÓTESIS

El análisis del contenido de RNAs no codificantes, de exosomas extraídos del suero de pacientes pediátricos con astrocitoma pilocítico o difuso, revelará diferencias cualitativas y cuantitativas entre ambos subtipos de cáncer y con relación al grupo control. Estas diferencias y su posible interacción con proteínas específicas colocarían a algunos de estos ribonucleótidos en la lista como biomarcadores potenciales para este tipo de padecimiento.

7. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la expresión diferencial del transcriptoma global de pacientes pediátricos con astrocitoma pilocítico o difuso, a partir de exosomas aislados del suero sanguíneo.

7.1. Objetivos específicos

- Aislar exosomas del suero de pacientes pediátricos con Ast pilocítico o difuso.
- Evaluar la expresión diferencial de RNAs codificantes y de los ncRNAs, mediante los microarreglos de expresión HTA_2.0 (ThermoScientific).
- Determinar posibles biomarcadores de diagnóstico para los grupos Ast-difuso y Ast-pilocítico.
- Proponer mecanismos moleculares a nivel funcional a partir de los ncRNAs diferencialmente expresados.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1. Muestras.

Las muestras de suero de pacientes pediátricos con astrocitoma se colectaron en el periodo del 2017 al 2019 (**Tabla 2**). Todos los niños incluidos en este estudio fueron atendidos en el Hospital de Pediatría “Silvestre Frenk Freund”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social. Los pacientes incluidos en el presente estudio estuvieron en un rango de edad de 0-15 años y no tuvieron antecedentes directos de familiares con cáncer. Los tutores o apoderados legales de los pacientes firmaron un consentimiento informado para estos análisis.

Tabla 2. Muestras usadas para aislamiento de exosomas en el presente estudio.

Condición Experimental	Clave	Género
Controles n= 50	1-50	
Pilocítico n= 10	1	Niño
	2	Niño
	3	Niña
	4	Niña
	5	Niña
	6	
	7	
	8	
	9	
	10	
Difuso n=5	11	Niño
	12	Niña
	13	Niño
	14	Niña
	15	Niña
	16	Niña

El Proyecto tuvo la aprobación del Hospital de pediatría Dr. Silvestre Frenk Freund, de Centro médico Nacional Siglo XXI, del IMSS de acuerdo con la ética de seguridad en investigación científica (R-2014-3603- 27), de acuerdo a la declaración de 1964 en Helsinki en, así como de sus enmiendas posteriores.

8.2. Microarreglos de expresión HTA 2.0.

(Human Transcriptome Array 2.0) GeneChip®

Tres condiciones (el grupo control (n=50); el grupo pilocítico (n=10); y el grupo difuso (n=15) fueron usados para los análisis de expresión diferencial con el microarreglo HTA 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA). Con capacidad de detectar la expresión simultanea de 67528 genes. Tipo de microarreglo: HTA-2_0. Tipo de análisis: Expresión (Gene + Exón). Versión de análisis: versión 2. Método de sumarización: Gene + Exon - SST-RMA. Pos vs Neg AUC Umbral: 0.7. Versión del genoma: hg19 (Homo sapiens).

Es importante mencionar que en los análisis de expresión se realizó de muestras de una condición experimental determinada y no de forma. Con este microarreglo, es posible evaluar 285,000 transcritos completos incluyendo 245,000 codificantes, 40,000 no codificantes y 339,000 series de prueba que cobren las uniones exón-exón. Los niveles de expresión fueron significativos con una $p < 0.001$; para mejorar la significancia estadística, se determinó un valor umbral de 6-veces de cambio.

8.3. Aislamiento de exosomas y purificación de RNA.

Los exosomas fueron aislados con el kit de aislamiento total de exosomas (de suero) (Thermo Scientific), al agregar 20 µl del “Total Isolation kit” para cada 100 µl de suero sanguíneo. Entonces, las muestras se incubaron a 4°C por 30 minutos y después se centrifugaron durante 10 min a 10,000xg (4°C). Los sobrenadantes fueron descartados y el pellet recuperado correspondiente a los exosomas, estos se resuspendieron en 200 µl de TRIZOL® para el aislamiento de RNA o en 500 µl de PBS (Phosphate Buffered Saline) para microscopia electrónica.

Para la purificación de RNA se incubaron los exosomas por 15 horas con TRIZOL® a 4°C (esto fue para resuspender los exosomas óptimamente) y después se transfirieron a un tubo con 40 µl de cloroformo por 15 minutos a 4°C y la fase acuosa (RNA) se transfirió a un nuevo tubo, y 500 µl de isopropanol se agregaron para precipitar el RNA. para mejorar el extracto obtenido de RNA, las muestras se almacenaron a -80°C durante 24 horas y centrifugadas a 15,000xg por 60 min (4°C).

El RNA exosomal se lavó 3 veces con 75% de etanol y resuspendido en 5 µl de agua libre de RNAsas. La cuantificación de calidad y pureza de RNA se llevó a cabo por

espectrofotometría (Nanodrop 1,000, Thermo Fisher Scientific) y en geles de agarosa. Se verificó la integridad de los exosomas con microscopia electrónica en el Instituto de Fisiología Celular (IFC) de la UNAM para valorar también la morfología y (Lötvall et al., 2014).

8.4. Metodología bioinformática.

Identificación de funciones de miRNAs

Se evaluaron los posibles mRNAs blancos para los miRNAs sobre regulados y sub regulados en la condición difusos respecto a la pilocíticos. Para predecir RNAs blancos y procesos biológicos afectados se usó un lenguaje de programación de acceso libre y gratuito mediante scripts en “R” (lenguaje para computo estadístico y graficas), mediante la suite miRNAatap. Se utilizaron los 5 algoritmos de predicción más usados comúnmente: DIANA; Miranda; PicTar; TargetScan; y miRDB (Krek et al., 2005; Wang., 2008; Paraskevopoulou et al., 2013; Agarwal et al., 2015).

El algoritmo microT v3.0 usa una secuencia de 38 nt de largo que es movido a lo largo del extremo 3'UTR. La energía mínima de enlace del miRNA, que admite apareamientos imperfectos (mismatches), es determinada después de cada ajuste o desplazamiento del marco y se compara con respecto a la energía de una secuencia 100% complementaria y enlazada a la región 3'UTR. DIANA-microT busca sitios con una protuberancia central canónica y requiere una complementariedad de 7, 8 o 9 nt. de largo en la región 5' del miRNA. Puede considerar apareamientos de 6 nt en la región semilla o de bamboleo y usa un alineamiento conservativo y no conservativo para incluir posibles mutaciones. Existe señal de fondo, basándose en la proporción del total de blancos predichos para un miRNA específico en una región 3'UTR determinada; esto con respecto al número de blancos predichos por un miRNA artificial con una secuencia aleatoria-En dicha región 3'UTR. Este análisis Nos proporciona un porcentaje de probabilidad de existencia de cada resultado.

DIANA - microT v3.0 TarBase 6.0 es un recurso informático para la predicción de blancos y perfiles de expresión (Paraskevopoulou et al., 2013). Las predicciones se basan en el algoritmo miRanda, este incorpora conocimiento biológico actualizado sobre reglas de apareamiento mediante un compendio actualizado de miRNANAs de mamíferos

(Paraskevopoulou et al., 2013). Los perfiles de expresión de miRNANAs se derivan de un Proyecto de secuenciación de diferentes tejidos de mamíferos y líneas celulares de condición normal y de enfermedades.

El algoritmo PicTar es usado para la identificación de blancos potenciales de miRNANAs. Este sitio web es de libre acceso y proporciona detalles como alineamientos 3' UTR con sitios predichos y enlaces a bases de datos públicas (Krek et al., 2005). Existen predicciones en PicTar para diferentes genomas: *Homo sapiens* (hg17), *Mus musculus* (mm7), *Drosophila melanogaster* (dm2) y *Caenorhabditis elegans* (ce2); se pueden obtener visualizaciones mediante el visor genómico. “PicTar es un proyecto del centro de genómica funcional de Rajewsky en New York y del instituto Max Delbruck Centrum en Berlin (Krek et al., 2005). TargetScan es útil para predecir los blancos potenciales utilizando las 200 mejores predicciones en cada caso de acuerdo con su puntuación (Agarwal et al., 2015).

Una vez encontrados los blancos probables o mRNAs se buscará correlacionar estos resultados con los genes encontrados como regulados negativamente. Primeramente, la búsqueda es restringida a los sitios que tienen complementariedad total en la región semilla del miRNA, que es definida como una secuencia de 6 nt. de largo (2-7), la cual es extendida hasta fragmentos de 21 a 23 nucleótidos que representan interacciones verdaderas. Los resultados son clasificados en 3 grupos dependiendo de su tamaño de apareamiento perfecto y la presencia de adenina en la primera posición del mRNA blanco, el cual parece estar conservado evolutivamente que actúa como sitio de anclaje de RISC. Para establecer la puntuación, se compararán varios parámetros con respecto a valores de referencia establecidos y validados experimentalmente como son el tipo de apareamiento en la región semilla, el contenido de AU 30 nt. río arriba “up stream” y río abajo “down stream” de la región predicha y la distancia al extremo más lejano de la UTR del mRNA. La conservación de las regiones semilla entre los 3'UTRs ortólogos y sus miRNAs, es de importancia fundamental en la puntuación (score) final (Agarwal et al., 2015).

La miRDB es una base de datos online para la predicción de blancos de miRNAs con anotaciones funcionales. Todos los blancos en miRDB son predicciones con la herramienta MirTarget, la cual se desarrolló analizando miles de interacciones miRNA-mRNA blanco a partir de experimentos de secuenciación masiva. Se lograron identificar las características comunes asociadas a la unión de miRNAs con la regulación negativa de sus moléculas

blanco, lo que ayuda a la predicción con métodos de aprendizaje de máquina. La miRDB posee predicciones para 5 especies: humano, ratón, rata, perro y pollo. Los usuarios pueden proporcionar sus propias secuencias para una búsqueda de datos personalizada, usando el algoritmo de predicción actualizado. En una actualización reciente, miRDB presenta los perfiles de expresión de cientos de líneas celulares y el usuario puede personalizar su búsqueda (Wang., 2008).

Predicción de función molecular y procesos biológicos con mapas interactivos

Los análisis para cada condición se realizaron con el propósito de establecer su participación en la regulación de vías de señalización o metabólicas, usando el diccionario de vías para el caso de los miRNAs (miRNA Pathway Diccionario Database (miRPathDB)), de libre acceso en el servidor: <http://mpd.bioinf.uni-sb.de>.

Identificación de funciones de lncRNAs

En la simulación de estructuras de ncRNAs se usó el servidor RNAfold, el cual predice las estructuras de mínima energía libre y las probabilidades de apareamiento de bases de secuencias sencillas de DNA o RNA, y es disponible en el sitio de Vienna RNA Web Services. Este servidor proporciona programas, servicios web y bases de datos relacionados al trabajo de estructuras secundarias de RNAs (Gruber et al., 2008).

Identificación de funciones de Y-RNAs

Para desarrollar estos análisis bioinformáticos se aprovechó la ventaja de una potente interfaz de servidor perteneciente a la “Iowa State University”, denominado: Protein-RNA Interaction Database RPI-Seq Version. Dobbs Lab.

Los análisis se desarrollaron en el servidor: <http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/batch-rna.html>. Debido a la mayor concordancia de RF definir qué es RF, con respecto a los datos validados experimentalmente, se discuten principalmente los resultados obtenidos mediante este el algoritmo de clasificación. Solo en el caso de las proteínas asociadas a orígenes de replicación, se muestran los resultados de ambos clasificadores: RF “Random Forest” y SVM “Support Vector Machine”. De acuerdo con los resultados obtenidos, se considera que los

valores superiores a 0.5 pueden ser significativos, con una mayor probabilidad de ocurrencia “in vivo” al aproximarse a 1.

Las secuencias de RNA y de proteínas se descargaron de la base de datos de nucleótidos del NCBI y del servidor, usando como palabras clave:

(CELL RECEPTOR BRAIN AND HUMAN) AND "Homo sapiens" [txid9606] y se aplicó el filtro: 0 TO 1200 A.A. length. Se obtuvieron = **1,319** secuencias.

Las secuencias de las proteínas de receptores celulares tipo Toll se descargaron das del servidor del NCBI usando como palabras clave:

(TOLL CELL RECEPTORS) AND "Homo sapiens" [txid9606] Sin filtro aplicado.

Obteniendo = **119** secuencias.

Las secuencias de receptores wnt se descargaron usando las palabras clave (WNT RECEPTORS) AND "Homo sapiens" [txid9606]. Obteniendo = **37** secuencias.

Las secuencias de proteínas asociadas a los orígenes de replicación humanos usando como palabras clave:

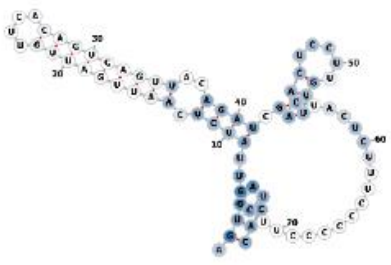
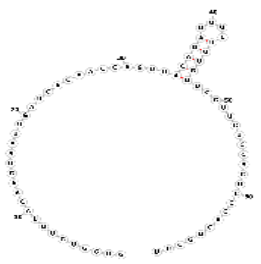
(DNA POLYMERASE) AND "Homo sapiens "[txid9606] y el filtro aplicado fue: from 0 TO 1200 A.A. length. Obteniendo = **1,286**.

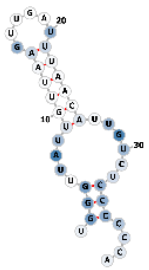
Las secuencias fueron revisadas para evitar anotación redundante o secuencias duplicadas y posteriormente formateadas para su uso a través del servidor usado.

Se confirma la precisión de las estrategias basadas en secuencias de clasificadores RPISeq, esto para las simulaciones de interacción de los 4 Y-RNAs humanos, mediante el servidor “RNA-Protein Interaction Prediction” (Muppirala., 2013). La eliminación de los segmentos terminales en 5’ y 3’ para generar solo los dominios asa o “loop” a partir de los Y-RNAs, esto con la intención de simular “in silico” la interacción del dominio loop con respecto a diferentes tipos de proteínas humanas de acuerdo con lo que se muestra en la **Tabla 3**.

Tabla 3. Procesamiento de secuencias de Y-RNAs para obtener dominios asa “loop” usados en simulaciones.

Y-RNA1	
Secuencia completa 113 nt. GGCTGGTCCGAAGGTAGTGAGTTATCTCAATTGATTGTTACAGTCAGTTACAGATCGA ACTCCTTGTTCTACTCTTTCCCCCTTCTCACTACTGCACTTGACTAGTCTTTT	
Secuencia removida del extremo 5’	GGCTGGTCCGAAGGT
Secuencia removida en el extremo 3’	TACTGCACTTGACTAGTCTTTT
Secuencia del dominio “loop” usada en la simulación	

AGTGAGTTATCTCAATTGATTGTTACAGTCAGTTACAGATCGAACTCCTTGTTCTACTC TTTCCCCCTTCTCAC	
	
Y-RNA 3	
Secuencia completa 102 nt. 5 GGCTGGTCCGAGTGCA GTGGTGTTTACAAC TAATTGATCACAACCAGTTACAGATTTCTTTGTTCCCTTCTCCACTC CCACTGCTT CACTTGACTAGCCTTTT 3	
Secuencia removida del extremo 5' GGCTGGTCCGAGTGCA	
Secuencia removida en el extremo 3' CTCCCACTGCTTCACTTGACTAGCCTTTT	
Secuencia del dominio “loop” usada en la simulación GTGGTGTTTACAAC TAATTGATCACAACCAGTTACAGATTTCTTTGTTCCCTTCTCCACTC CCACTGCTT	
	
Y-RNA 4	
Secuencia completa Y-RNA 96 nt. GGCTGGTCCGATGGTAGTGGGTTATCAGAACTTATTAACATTAGTGTCCTAAAGTTGG TATACAACCCCCCACTGCTAAATTTGACTGGCTTTTT	
Secuencia removida del extremo 5' GGCTGGTCCGATG	
Secuencia removida en el extremo 3' CTAAATTTGACTGGCTTTTT	
Secuencia del dominio “loop” usada en la simulación GTAGTGGGTTATCAGAACTTATTAACATTAGTGTCCTAAAGTTGGTATACAACCCCCC ACTG	
	
Y-RNA 5	

Secuencia	completa	84	nt.
AGTTGGTCCGAGTGTGTTGGGGTTATTGTTAAGTTGATTTAACATTGTCTCCCCCACAA CCGCGCTTGACTAGCTTGCTGTTTT			
Secuencia removida del extremo 5´		AGTTGGTCCGAGTGTG	
Secuencia removida en el extremo 3´		CAACCGCGCTTGACTAGCTTGCTGTTTT	
Secuencia	del	dominio	“loop”
usada en la simulación			
TGGGTTATTGTTAAGTTGATTTAACATTGTCTCCCCCA			
			

Interacciones de piRNAs basadas en termodinámica de ndG mediante LncTar.

Para obtener secuencias de transcritos de oncogenes humanos a través del servidor del NCBI; con la base de datos “nucleotide”, se usó como palabras clave: (oncogene human) AND "Homo sapiens "[porgn: txid9606], con un filtro de: 500 hasta 5,000 bp. de longitud de las secuencias. Se obtuvieron 5,988 secuencias. y del servidor, usando como palabras clave: (CELL RECEPTOR BRAIN AND HUMAN) AND "Homo sapiens" [txid9606] y se aplicó el filtro: 0 TO 1200 A.A. length. Se obtuvieron = **1319** secuencias.

Las secuencias de las proteínas de receptores celulares tipo Toll se descargaron das del servidor del NCBI usando como palabras clave:

(TOLL CELL RECEPTORS) AND "Homo sapiens" [txid9606] Sin filtro aplicado.

Obteniendo = **119** secuencias.

Las secuencias de receptores wnt se descargaron usando las palabras clave (WNT RECEPTORS) AND "Homo sapiens" [txid9606].

Obteniendo = **37** secuencias.

Las secuencias de proteínas asociadas a los orígenes de replicación humanos usando como palabras clave:

(DNA POLYMERASE) AND "Homo sapiens "[txid9606] y el filtro aplicado fue: from 0 TO 1200 A.A. length.

Obteniendo = **1286**.

Las secuencias fueron revisadas para evitar anotación redundante o secuencias duplicadas y posteriormente formateadas para su uso.

Para calcular las interacciones piRNAs-mRNAs, se utilizó el script LncTar, que es una modificación del algoritmo PerlPrimer (Marshall, 2004), este es un código abierto en lenguaje perl para el diseño de oligonucleótidos para PCR, particularmente para PCR tiempo real. Este código Integra la temperatura y los algoritmos de predicción primer-primer para la predicción de interacciones lncRNA-RNA Interaction Prediction (Marshall., 2004).

Además, se integra un programa para calcular estructuras secundarias biomoleculares de las moléculas de RNA a través del cálculo de la mínima energía libre (Marshall, 2004).

Calcula la energía libre aproximada de cada apareamiento con los datos recientes que indican la estabilidad de la complementariedad (Li et al., 2014). Recientemente, se ha hecho uso de cálculos de termodinámica que originalmente se emplearon en doble hélices para calcular el apareamiento entre RNAs. En el modelo del vecino cercano “Nearest-Neighbor”, el cambio de la entalpía se considera junto con el cambio de la entropía, para calcular la energía de libre del apareamiento (Sugimoto et al., 1996). La estabilidad, dependiente de la secuencia de los RNAs, es determinada por los dobles de Nearest-Neighbor; por ejemplo, los 10 únicos dobles internos adoptados en un dúplex de RNA son:

AT/AT, TA/TA, AA/TT, AC/GT, CA/TG, TC/GA, CT/AG, CG/CG, GC/GC y GG/CC

Puede ser calculada a partir de la entalpía y de la entropía con la fórmula matemática desarrollada por el físico y químico norteamericano Josiah Willard Gibbs (SantaLucia., 1998).

ΔG =Energía libre

ΔH =incremento de entalpía

T=Temperatura absoluta

ΔS =incremento de entropía

$\Delta G_T = \Delta H - T\Delta S$

Algoritmo RPISeq para interacciones Y-RNA-Proteína

Existen 2 formas tradicionales de evaluar las Interacciones de RNA-Proteína (**RPI**), una de ellas se basa en resolver los problemas relacionados al **problema de predicción de interfaces**, el cual necesita una enorme cantidad de información de bases de datos, de información estructural, la cual es obtenida mediante cristalografía o con técnicas de resonancia magnética nuclear, como lo es la base de datos de proteínas o (**RSCB PDB**) “Protein Data Bank”. Por su parte, la estrategia del **problema de predicción del patrón** cuenta con relativamente poca información disponible, aun en bases de datos concernientes a RPI comprobadas experimentalmente, respecto a ella tenemos el caso del algoritmo RPISeq que consiste en una familia de clasificadores para la predicción de interacciones RNA-Proteína (Muppirala et al., 2011; Muppirala, 2013). Para calcular esto se necesitan las secuencias del RNA y de la proteína a evaluar, únicamente para la alimentación del modelo. Sólo se considera la información de sus secuencias. En forma de representaciones de alfabeto reducido para clasificar los aminoácidos involucrados para las secuencias de proteínas y el RNA.

El alfabeto reducido identifica a los aminoácidos de acuerdo con sus características fisicoquímicas, agrupando los de características similares en una letra determinada. Basándose en lo propuesto por Shen., 2007, quien usó una representación de características de triada conjunta “Conjoint Triad Feature” (**CTF**), esto es básicamente utilizar distribuciones de frecuencias normalizadas de trímeros, que se extraen de un alfabeto de reducido de 7 letras para representar a los 20 diferentes aminoácidos posibles de la secuencia de la proteína (Shen et al., 2007; Muppirala, 2013)..

Este alfabeto se basa en sus momentos de dipolo y el volumen de sus cadenas laterales, agrupando a los aa. de acuerdo con el código de identificación de los aminoácidos:

{A, G, V}, {I, L, F, P}, {Y, M, T, S}, {H, N, Q, W}, {R, K}, {D, E}, {C}

La secuencia de RNA es representada entonces como un vector normalizado, de una composición 4-mer, y la proteína de una composición 3-mer. De esta forma, para cada par de interacciones RNA-Proteínas se obtiene un vector de 599 características, de las cuales 343 provienen de la información de la proteína. Para cada secuencia proteica se tienen las siguientes características combinatorias:

$$(7 \times 7 \times 7) = 343$$

Para cada secuencia de RNA, al ser solo 4 nucleótidos posibles en el polímero de RNA que conforman trímeros o 3-mer, se tienen entonces las siguientes características combinatorias:

$$(4 \times 4 \times 4 \times 4) = 256$$

Dos variantes fueron desarrolladas para RPISeq por Muppirala y sus colaboradores (año):

RPISeq-SVM: Usa un clasificador de Maquinas de Vectores de Soporte: “Support Vector Machine” RPISeq-RF: Usa un clasificador de un Bosque Aleatorio “Random Forest”.

Para evaluar su eficacia, se alimentaron en 2 bases de datos, generados a su vez de la base de datos de interfaces: “Protein-RNA Interface Database” (**PRIDB**). Para una de ellas, RPI2241, la precisión predictiva fue de 89.6% (RF) y 87.1% (SVM). Los valores de F fueron mayores al 87% para ambos clasificadores. Para la RPI369, la eficacia fue considerablemente menor para ambos clasificadores, con una precisión predictiva de 76.2% (RF) y 72.8% (SVM). Los valores de F fueron mayores al 0.7 para ambos clasificadores. Como la base de datos RPI2241 tiene mucha información de datos estructurales y de interacciones ribosomales, y contiene más información de interfaces que se ha demostrado que esta es la mejor para las predicciones; en RPI369 estos datos se excluyen.

La medida de F o “F-Measure” es un indicador compuesto que intenta balancear la precisión y exhaustividad con valores de 0 hasta 1. Los valores cercanos a 1 indican resultados más probables. El área bajo la curva de la “Receiver Operating Characteristic” (**ROC**) también fue calculada por estos investigadores, estableciendo un rango de 0 a 1; el valor de 1 es un clasificador perfecto y 0.5 sería un clasificador aleatorio. La eficacia de RPISeq, usando respectivamente RF y SVM, calculada por la curva (ROC), fue de 0.96 y 0.92, respectivamente, demostrando así ser muy precisos (Muppirala., 2013). La importancia de conocer la dinámica de las RPI, a nivel postranscripcional, es importante para su integración en redes de regulación de diferentes procesos biológicos y se basa enormemente en la disponibilidad de información experimental que pueda alimentar estos clasificadores, usando algoritmos de aprendizaje de máquinas e inteligencia artificial (Mittal et al., 2009; Hafner et al., 2010; Yang et al., 2015).

En adición a sus funciones en la regulación de la expresión genética, a nivel transcripcional y post transcripcional, las RPI regulan muchos procesos biológicos como es la replicación de DNA, la transcripción en sí misma, la resistencia a patógenos y la replicación de virus, entre muchos otros (Hogan et al., 2008; Li & Nagy., 2011). Otra prueba importante, relacionada

con la eficacia del algoritmo RPISeq, es que se construyeron modelos de redes de interacción muy semejantes a las determinadas a partir de factores de transcripción (Nacher & Araki., 2010). Incluso, se generó una base de datos NPInter de interacciones de bio macromoléculas con proteínas. A partir de la información generada por RPISeq, también se construyeron redes de interacción RPI para muchos organismos modelos. En conclusión, el clasificador SVM es un vector de 599 dimensional que evalúa pares de características RNA-Proteína. Sus resultados muestran una etiqueta binaria, indicando si existe o no interacción entre el par de secuencias alimentadas. Mientras tanto, RF es un ensamble de muchos arboles de clasificación, cada árbol es entrenado sobre una serie de ejemplos que son muestreados en forma aleatoria en cada serie de entrenamiento. En cada nodo, la mejor desviación es escogida de una serie de variables seleccionada aleatoriamente, a partir un conjunto de características de entrada. Una vez realizada una alimentación de RF, con la información de las secuencias del par, se seleccionan los mejores valores de todos los clasificadores como la predicción de RF. Los autores de RPISeq mencionan haber usado un ensamble de 20 árboles y series de valores de $m = \log_2$ (número de características) + 1 y de 10 características para cada nodo (Schonlau & Zou., 2020). Para determinar la precisión de los clasificadores, los autores usaron las ecuaciones propuestas por Baldi y sus colaboradores en el año 2000, (Baldi et al., 2000). Calculando los estadísticos correspondientes; es una métrica empleada en la medida del rendimiento de los sistemas de búsqueda y recuperación de información y reconocimiento de patrones . Estas ecuaciones se muestran a continuación: (Baldi et al., 2000).

$$\text{Precisión} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FP}}$$

$$\text{Exhaustividad} = \frac{\text{TP}}{\text{TP} + \text{FN}}$$

$$\text{Exactitud} = \frac{\text{TP} + \text{TN}}{\text{TP} + \text{TN} + \text{FP} + \text{FN}}$$

$$\text{Medida de F} = \frac{2 \times \text{Precisión} \times \text{Exhaustividad}}{\text{Precisión} + \text{Exhaustividad}}$$

$$\text{Precisión} \times \text{Exhaustividad}$$

TP = Verdaderos Positivos

FP = Falsos Positivos

TN = Verdaderos Negativos

FN = Falsos Negativos

Se confirma la precisión de las estrategias basadas en secuencias de clasificadores RPISeq, esto para las simulaciones de interacción de los 4 Y-RNAs humanos, mediante el servidor “RNA-Protein Interaction Prediction” (Muppirala., 2013). La eliminación de los segmentos terminales en 5’ y 3’ para generar solo los dominios asa o “loop” a partir de los Y-RNAs, se eliminaron parte de las secuencias hacia los extremos 3 y 5 con la intención de simular “*in silico*” la interacción del dominio de asa con respecto a diferentes tipos de proteínas humanas. de acuerdo con lo que se muestra en la (**Tabla 3**).

Predicción de vías afectadas por miRNAs mediante miRPathDB

Este servidor valida los blancos principales y sus vías de acuerdo con bases de datos KEGG. “Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes” con sede en Kyoto, Japón así como “Reactome” y “WikiPathways”. ayudan al usuario a comprender funciones de alto nivel de sistemas biológicos a diferentes niveles, como son el celular, el organismo e incluso el ecosistema. Funcionamiento parte de un nivel de información molecular a larga escala, como son los datos obtenidos por secuenciación o microarreglos que es nuestro caso.

9. RESULTADOS

9.1. Microscopía electrónica.

La integridad física de los exosomas se corroboró como primer paso de acuerdo con sus características de tamaño y forma mediante técnicas de microscopía electrónica. La **Figura 8** muestra los exosomas aislados con sus medidas cercanas a 30 o 40 nanómetros.

Presencia de exosomas por microscopía electrónica

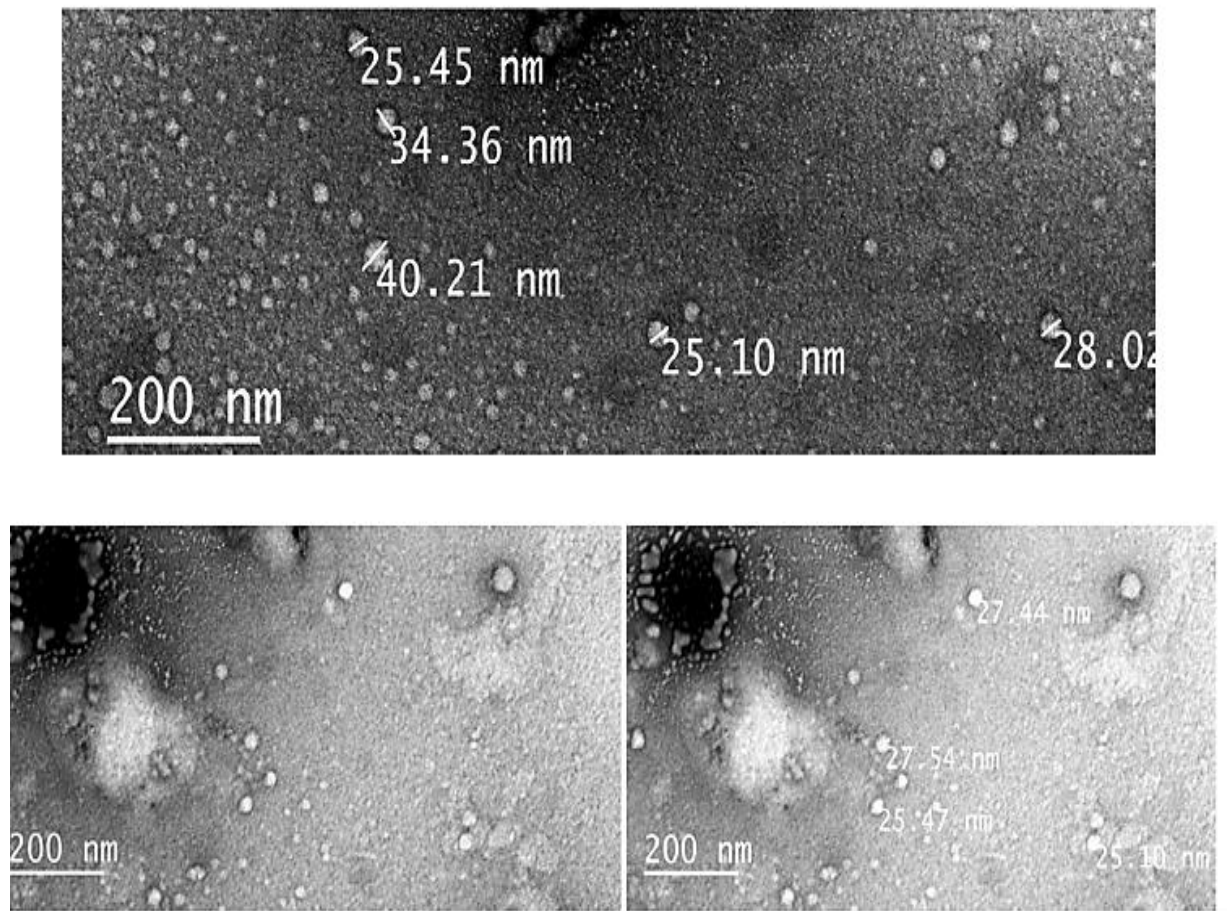


Figura 8. Exosomas aislados de suero de pacientes con Astrocitomas pediátricos (pilocítico o difuso). Se identificaron por microscopía electrónica en el IFC, UNAM. Imagen Superior: exosomas individuales provenientes de pacientes enfermos y sus dimensiones. Imágenes inferiores mostrando otros exosomas.

9.2. Expresión diferencial del transcriptoma de exosomas circulantes.

ncRNAs

El análisis de los resultados mostró que cerca de la mitad de los ncRNAs circulantes presentan una expresión diferencial en los grupos pilocítico y difuso versus el grupo control (**Tabla 4**). En el caso de la comparación entre muestras control vs p-Ast pilocítico, los ncRNAs sobreexpresados representaron el 35.2% y los subexpresados el 64.8%. En cuanto a transcritos codificantes mRNAs se detectó que 1,867 subexpresados mientras que 4,273 sobreexpresados (**Tabla 4**).

Para la comparación de muestras control vs p-Ast difuso, los resultados mostraron que los ncRNAs sobreexpresados representaron el 21.6 % y los subexpresados el 78.4% sobreexpresados en el grupo difuso respecto al grupo control. En cuanto a transcritos codificantes mRNAs se detectó que 2,281 estaban subexpresados mientras que 9,342 sobreexpresados (**Tabla 4**).

La comparación de los grupos p-Ast difuso versus p-Ast pilocítico mostró que hay 3,893 transcritos de ncRNAs sobreexpresados y 1,118 subexpresados (**Tabla 4**).

El 77.7% y 22.3% de los ncRNAs están sobre y subexpresados, respectivamente, en este caso solo el 21.95% están siendo detectados desregulados de los 22,829 transcritos de ncRNA que evalúa el microarreglo. HTA_2.0 (**Tabla 4**).

mRNAs

Si además se integra la información de los transcritos de mRNAs los cuales en un 80.54% se encuentran sobreexpresados en esta condición es interesante este nivel de sobreexpresión para transcritos que codifican proteínas.

En la **Figura 9** se muestra la expresión diferencial para los ncRNAs en las diferentes condiciones, se observa una sobreexpresión marcada en transcritos de la condición difusa respecto a control, igualmente en la comparación de grupo difuso respecto a pilocítico existen muchos transcritos sobreexpresados.

Tabla 4. Expresión diferencial transcriptómica total en exosomas de suero de pacientes con Ast respecto a la condición control y entre los distintos tipos de tumor.

Exosomas en muestras de Control vs p-Ast pilocítico				
GRUPO	TOTAL	FILTRO	SUBEXPRESADOS	SOBREEXPRESADOS
CODIFICANTES	44,699	6,140	1,867	4,273
NO CODIFICANTES	22,829	2,998	1,058	1,940
TOTAL	67,528	9,138 (13.53%)	2,925 (30.01%)	6,213 (67.99%)
Exosomas en muestras de Control vs p-Ast difuso				
GRUPO	TOTAL	FILTRO	SUBEXPRESADOS	SOBREEXPRESADOS
CODIFICANTES	44,699	11,623	2,281	9,342
NO CODIFICANTES	22,829	6,205	1,342	4,863
TOTAL	67,528	17,828 (26.4%)	3,623 (20.32%)	14,205 (79.68%)
Exosomas en muestras de p-Ast difuso vs p-Ast pilocítico				
GRUPO	TOTAL	FILTRO	SUBEXPRESADOS	SOBREEXPRESADOS
CODIFICANTES	44,699	8,978	7,231	1,747
NO CODIFICANTES	22,829	5,011	3,893	1,118
TOTAL	67,528	13,989 (20.72%)	11,124 (79.52%)	2,865 (20.48%)

El criterio rigorista para proponer a algunos transcritos como biomarcadores, mencionados en las **Tablas 5, 6, y 7** fue de un fold-change de seis como mínimo en el microarreglo filtrando los valores de expresión diferencial más altos, lo cual fue corroborado al observar las señales fuera de la nube de dispersión de los datos. Asimismo, se observa que la mayoría de los tipos de ncRNAs se detectaron con desregulación, con los miRNAs experimentando mayores cambios tanto de sobreexpresión como de subexpresión.

Para la **Tabla 5** de control vs pilocítico destacan sobreexpresados en el control los miRNAs y los lncRNAs y subexpresados en control solo los lncRNAs. Respecto a los datos de control vs difuso en la **Tabla 6** tenemos una significativa proporción de transcritos de miRNAs y lncRNAs sobreexpresados en la condición difusa y destacan algunos miRNAs como lo más sobreexpresados en el control con respecto a los otros ncRNAs cuya expresión es mínima y en menor proporción los snRNAs, piRNAs y snoRNAs.

Para la expresión diferencial donde se comparan los 2 tipos de tumores difuso vs pilocítico, los datos se muestran en la **Tabla 7**. Destaca la sobreexpresión de lncRNAs en difusos, así como de miRNAs, aunque otros transcritos de ncRNAs se encuentran desregulados positivamente en forma considerable. Mientras que subexpresados están los piRNAs y miRNAs principalmente.

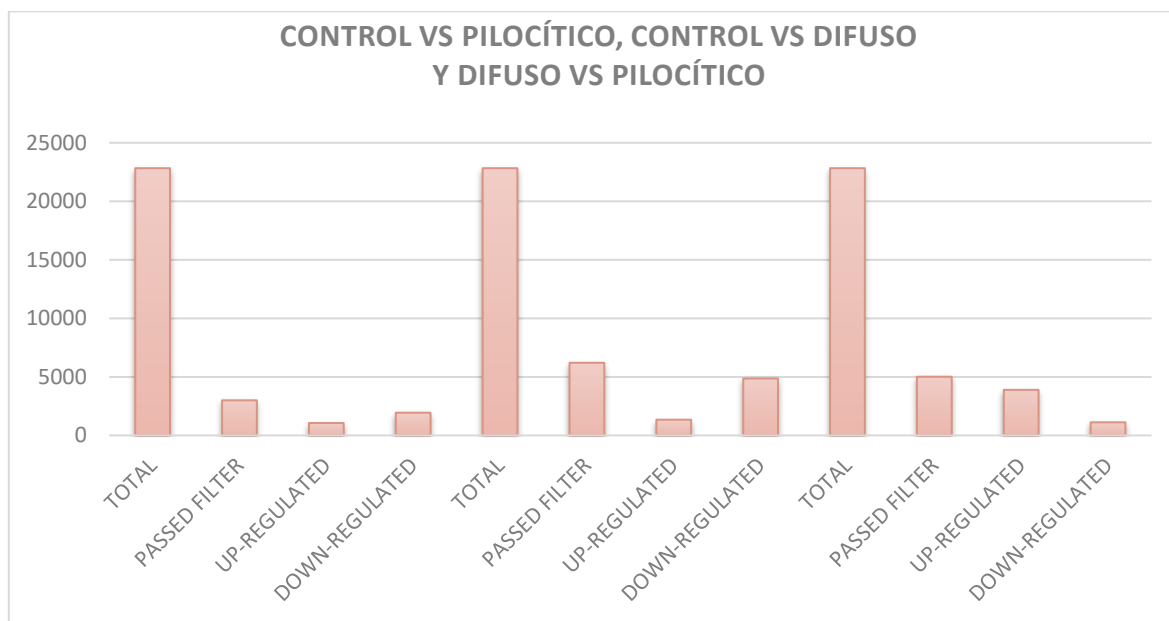


Figura 9. Expresión diferencial secretómica de ncRNAs obtenida por microarreglos HTA 2.0. Izquierda: control vs p-Ast pilocítico. Centro: control vs p-Ast difuso. Derecha: p-Ast difuso vs p- Ast pilocítico.

Tabla 5. Identificación de los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (control vs pilocítico) por tipo de RNAs, candidatos a biomarcadores en secretoma de Ast.

Tipo de RNA	Total	(Total 182) Sobreexpresados en control vs p-Ast pilocítico
lncRNAs	18	LOC730378, LINC01001, LOC107987206, LOC105378179 y LOC107985634
miRNAs	22	hsa-miRNA-4454, hsa-miRNA-3689b, hsa-miRNA-3689a, hsa-miRNA-3689c y hsa-miRNA-3689f
piRNAs	13	piRNA-32573, piRNA-41929, piRNA-32576, piRNA-48084 y piRNA-42936
snoRNAs	8	Snord-115-36, Snord-115-29, Snord-115-43, Snord-115-11 y Snord-115-12
ncRNAs	61	-
mRNAs	60	MUC 4, DNM1P 46, USP17 L6P, DUX 4 y REXO 1L2P
Tipo de RNA	Total	(Total 54) Subexpresados en control vs p-Ast pilocítico
lncRNAs	1	LOC105375026
miRNAs	19	hsa-miRNA-4281, hsa-miRNA-4479, hsa-miRNA-642b, hsa-miRNA-320a y hsa-miRNA-4466
Y-RNAs	2	Y-RNA5 y Y-RNA4
snoRNAs	2	Snora-11E y Snord-115-37
ncRNAs	24	-
mRNAs	6	IGHD3-16, IGH3-10, OR2G3, HLA-DQB1 y C11orf 87

Tabla 6. Identificación de los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (control vs difuso) por tipo de RNAs, candidatos a biomarcadores en secretoma de Ast.

Tipo de RNA	Total	(Total 154) Sobreexpresados en control vs p-Ast difuso
lncRNAs	5	LOC105375026, LOC101928618, LOC100289511, LL0XNC01-250H12 y LOC100506107
miRNAs	53	hsa-miRNA-642b, hsa-miRNA-4281, hsa-miRNA-4769, hsa-miRNA-151a y hsa-miRNA-4479
vaultRNAs	2	vaultRNA1-3 y vaultRNA1-2
snoRNAs	3	Snora-11E, Snord-104 y Snord-117
ncRNAs	63	
mRNAs	28	C4B, IGHD3-10, DLAT, ZCCHC 18 y OR5111
Tipo de RNA	Total	(Total 1063) Subexpresados en control vs p-Ast difuso
snRNAs-seudogenes	46	RNU7-P, RNU6-32P, RNU6-15P, RNU6-1 y RNU6-2
lncRNAs	100	LNC1689, LOC101060187, LOC100288069, LOC100421169 y LOC11226786
miRNAs	101	hsa-miRNA-548i3, hsa-miRNA-1290, hsa-miRNA-548h2, hsa-miRNA-548m y hsa-miRNA-1256
piRNAs	36	piRNA-39345, piRNA-49706, piRNA-42872, piRNA-33741 y piRNA-32573
snoRNAs	35	Snord-115-22, Snord-115-11, Snord-115-10, Snord-115-5 y Snord-115-34
Y-RNAs-seudogenes	3	Y-RNA3, Y-RNA1 y Y-RNA4 P15
ncRNAs	322	
mRNAs	420	DNM1P46, GOLGA2, USP17L6P, USP17L29 y MUC4

Tabla 7. Identificación de los cinco transcritos con mayor expresión diferencial (difuso vs pilocítico) por tipo de RNAs, candidatos a biomarcadores en secretoma de Ast.

Tipo de RNA	Total	(Total 522) Sobreexpresados en p-Ast difuso vs p-Ast pilocítico
snRNAs-seudogenes	114	RNU6-15P, RNU7-62P, RNU6-1, RNU7-48P y RNU6-2
lncRNAs	50	LOC102724034, LOC101060022, LOC107987394, LOC100996724 y LOC729218
miRNAs	35	hsa-miRNA-548i-3, hsa-miRNA-548w, hsa-miRNA-548a-2, hsa-miRNA-543 y hsa-miRNA-548i-1
piRNAs	32	piRNA-38063, piRNA-33700, piRNA-50231, piRNA-38854 y piRNA-42872
tRNAs	32	Asn-GTT-5-1, Asn-GTT-9-1, Glu-TTC-10-1, Asn-GTT-1-1 y Asn-GTT-6-1
snoRNAs	23	Snord-118-l12, Snord-118-l13, Snord-13f, Snord-115-22 y Snora-11l
Y-RNAs-seudogenes	7	Y-RNA1, Y-RNA3, pseudogene Y-RNA-3, Y-RNA1 pseudogene 11, Y-RNA1 y Y-RNA5
ncRNAs	293	
mRNAs	229	GOLGA 80, receptor olfativo 2J2, GAPDH var 6, C12orf 57 var 6 y SEPT7 P2
Tipo de RNA	Total	(Total 62) Subexpresados en p-Ast difuso vs p-Ast pilocítico
piRNAs	21	piRNA-34584, piRNA-45809, piRNA-48447, piRNA-47240 y piRNA-39384
miRNAs	10	hsa-miRNA-642b, hsa-miRNA-365a, hsa-miRNA-4443, hsa-miRNA-4779 y hsa-miRNA-3690
snRNAs-seudogenes	10	RNU6-583P, RNU6-303P, RNU6-100P, RNU6-542P y RNU6-972P
snoRNAs	7	Snora-72l5, Snora-72, Snora-74l4, Snora-13c y Snora-22b
ncRNAs	48	
mRNAs	14	ALG 9, SCL LOCUS, LRRC 37A2, HBA 1; HBA 2 y DMD

9.3. Expresión diferencial y filtración de datos.

Debido a que pequeñas variaciones en niveles de expresión ocasionalmente son producto de errores técnicos o experimentales muy leves con el equipo, y las señales claramente distinguibles como individuales se aproximan al seis fold al observar la nube de dispersión, se decidió filtrar los valores significativos de acuerdo con este umbral y así asegurar señales de cambio de expresión genuinas y de paso simplificar el análisis y búsqueda de biomarcadores al igual que transcritos desregulados en general.

Basados en este análisis, se propone seguir investigando las huellas específicas de ncRNAs, que mostraron un cambio en su expresión drástico al comparar las condiciones estudiadas los que son mencionados en las **Tablas 5, 6, y 7**. Los valores de expresión diferencial para todos los transcritos tomando un seis fold como umbral de filtración se pueden consultar en el **Apéndice 1**. Asimismo, más información sobre las distribuciones de frecuencias de los valores de expresión de los transcritos se puede consultar en el **Apéndice 2**. También, en el **Apéndice 3** se muestran los mapas de calor “heatmaps” de los principales transcritos sobreexpresados en las condiciones p-Ast difuso y p-Ast pilocítico.

Para identificar huellas moleculares en cada condiciones o patrones de expresión transcriptómica en cada condición (Ast-difuso y Ast-pilocítico), mucho trabajo fue hecho en la selección de los transcritos con alta desregulación, ya sea para los transcritos codificantes o no codificantes. Para desarrollar aun un análisis más selectivo se aplicaron filtros de expresión diferencial adicionales a los de “2-fold” que desarrolla por defecto la consola TAC, en sus análisis de expresión diferencial.

Esto se logró seleccionando los puntos individuales de las señales del microarreglo que se alejaban significativamente de la nube de dispersión. Restableciendo así este umbral para distinguir señales con clara y consistente desregulación ya sea positiva o negativa (sobreexpresión o subexpresión) diferencial de transcritos. Respecto a la abundancia relativa de transcritos en las gráficas mostradas se representa la expresión diferencial en la comparación Ast-difuso y Ast-pilocítico, lo cual se puede consultar en las gráficas de la **Figura 10**.

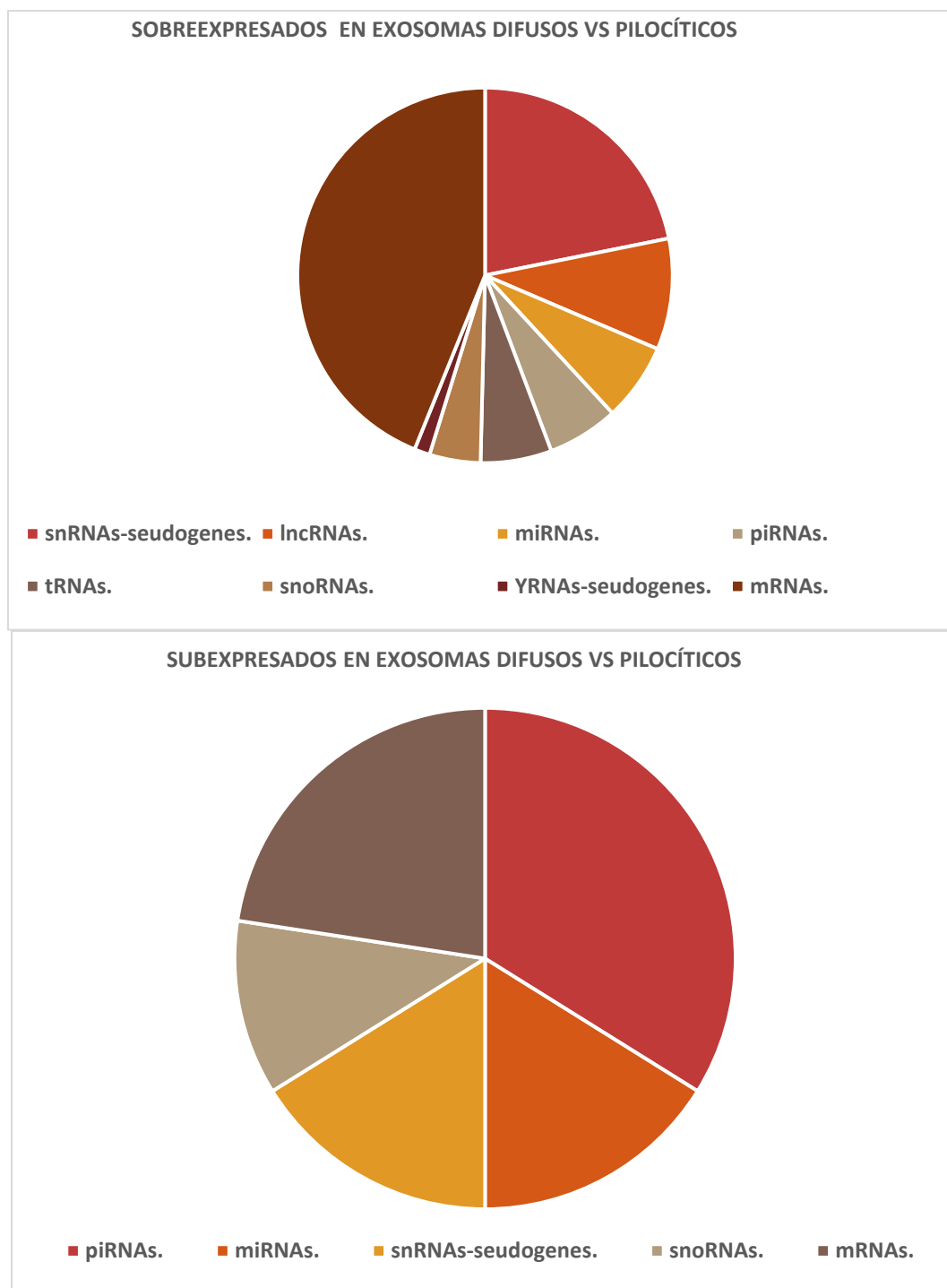


Figura 10. Expresión diferencial en exosomas de p-Ast difusos vs p-Ast pilocíticos.
En la gráfica superior los transcritos sobreexpresados, un 56.13% pertenecen a ncRNAs y 43.86% a mRNAs. La grafica inferior corresponde a subexpresados con un 77.41% de ncRNAs y 22.58% correspondientes a transcritos de RNAs.

9.4. Biomarcadores moleculares de astrocitomas.

miRNAs

Los biomarcadores moleculares candidatos se toman de transcritos con una diferencia de expresión alta en relación con el grupo control. En las **Figuras 11, 12 y 13** observamos los diagramas de Venn, los cuales muestran los miRNAs sobreexpresados en los grupos difusos y pilocíticos con respecto al control.

En la **Figura 11** se observa que hay un grupo de transcritos que se sobreexpresan en ambas condiciones (intersección) y también hay miRNAs sobreexpresados en cada condición. Esta información es importante porque puede usarse como biomarcadores para distinguir entre estas condiciones patológicas usando exosomas contenidos en el suero de pacientes únicamente. En la **Figura 12** se visualizan los miRNAs que se encuentran subexpresados en el grupo difuso y pilocítico respecto al control. También se encontraron lncRNAs claramente sobreexpresados en los diferentes Ast respecto al control, los cuales se representan en el diagrama de la **Figura 13**.

Existen además biomarcadores potenciales expresados como transcritos desregulados de otros ncRNAs como lo son piRNAs, snoRNAs, snRNAs, algunos seudogenes como los de Y-RNAs y los mismos Y-RNAs, los cuales se comentan en la discusión más adelante.

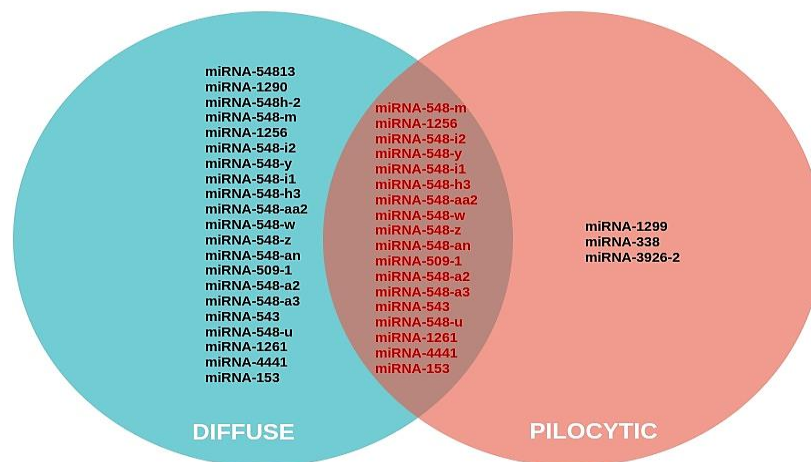


Figura 11. Diagrama de Venn, miRNAs sobreexpresados en p-Ast. Comparación de muestras de difusos (DIFFUSE) y pilocíticos (PILOCYTIC) con respecto al grupo control. Se detectaron: 21 miRNAs para la condición de exosomas difusos, 3 miRNAs para los pilocíticos y 18 en área de intersección.

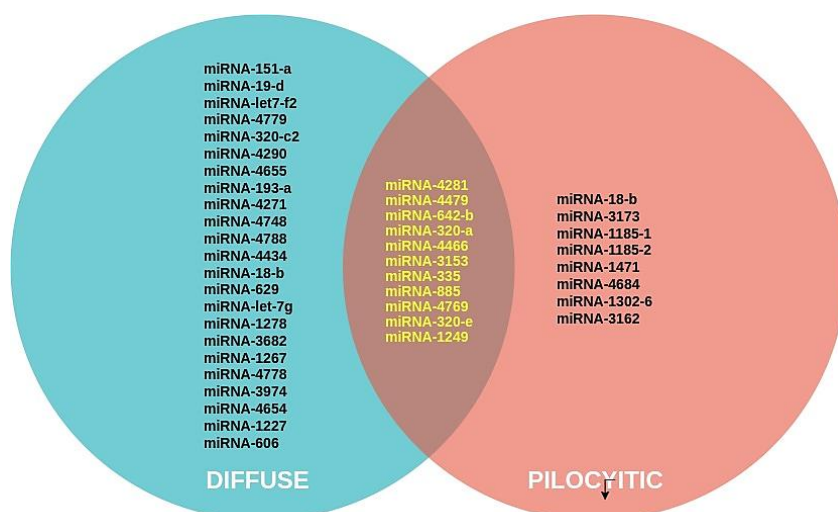


Figura 12. Diagrama de Venn de miRNAs subexpresados en p-Ast. Comparación de muestras de exosomas difusos (DIFFUSE) y pilocíticos (PILOCYTIC) respecto al control. Se detectaron: 23 miRNAs para la condición de exosomas difusos, 8 miRNAs para los pilocíticos y 11 en área de intersección.

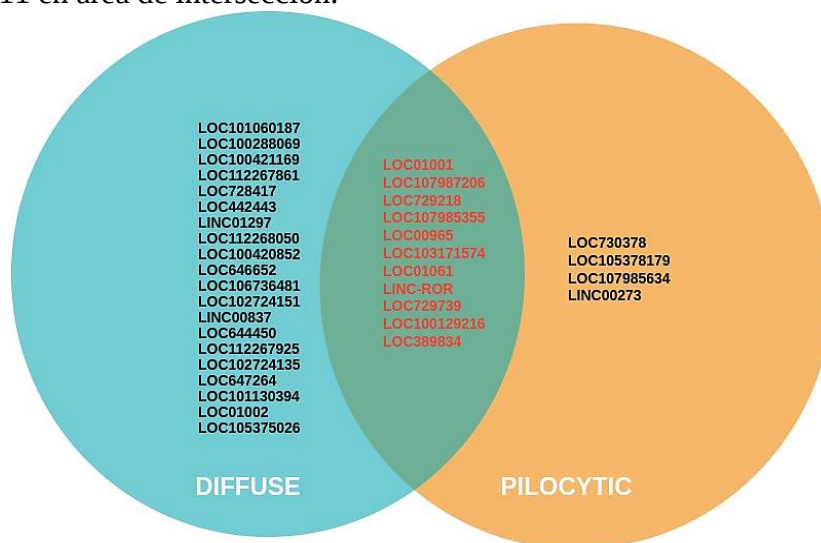


Figura 13. Diagrama de Venn de lncRNAs sobreexpresados en p-Ast. Comparación de muestras de exosomas difusos (DIFFUSE) y pilocíticos (PILOCYTIC) respecto al control. Se detectaron: 20 lncRNAs para la condición de exosomas difusos, 4 lncRNAs para los pilocíticos y 11 en área de intersección, un ejemplo es LINC-ROR.

9.5. Análisis con miRNA_{Atap}.

Se trabajó con técnicas de bioinformática para calcular el posible impacto en procesos celulares por la desregulación de los miRNAs, considerando sus mecanismos de interacción con la región 3 UTR del mRNA blanco con el uso de miRNA_{Atap}, una herramienta en lenguaje R. Se analizaron los miRNAs con sobreexpresión en cada condición para determinar qué aspectos metabólicos pueden verse afectados, considerando su interacción con sus transcritos blancos. Los 10 principales transcritos con sobreexpresión fueron usados considerando los grupos difusos o pilocíticos, respectivamente (Tablas 8 y 9).

Tabla 8. Análisis de miRNAs sobreexpresados en el grupo difuso respecto al grupo pilocítico (miRNA_{Atap}).

miRNA	Procesos biológicos afectados
hsa-miRNA-548i-3	Metabolismo de nucleótidos de purinas, metabolismo de nucleótidos de purinas, metabolismo ribonucleótidos de purinas, metabolismo de ribonucleótidos, metabolismo de fosfatos de ribosa, procesos metabolismo de nucleósidos de trifosfato de purinas y de ribonucleótidos de purinas, metabolismo de ribonucleótidos, metabolismo de ribosa fosfato, metabolismo de nucleósidos de purinas,
hsa-miRNA-548w	Metabolismo de ribonucleótidos de purinas, metabolismo de ribonucleótidos, metabolismo de fosfatos de ribosa, metabolismo de nucleósidos de monofosfato y el metabolismo de rbo nucleósidos monofosfato.
hsa-miRNA-548a-2	Metabolismo de ribonucleótidos de purinas, metabolismo de ribonucleótidos, metabolismo de ribosa fosfato, metabolismo de nucleósidos de monofosfato de purina, metabolismo de ribosa fosfato y metabolismo de rbo nucleósidos monofosfato.
hsa-miRNA-543	Procesos biosintéticos de péptidos, metabolismo celular de amidas, homeostasis en el número de células, regulación de sistemas de procesos y formación de sinapsis.
hsa-miRNA-548i-1	Metabolismo de nucleótidos de purinas, metabolismo de ribonucleótidos de purinas, metabolismo de ribonucleótidos, metabolismo de ribosa fosfato, metabolismo de nucleósidos de trifosfato de purinas y metabolismo de rbo nucleósidos trifosfato.
hsa-miRNA-548m	Activación de linfocitos, activación de células T, proteólisis, respuesta celular a estímulos de citoquinas, y metabolismo de glicerol fosfolípidos
hsa-miRNA-548h-2	Metabolismo nucleósidos monofosfato de purinas, metabolismo de rbo nucleósidos monofosfato, metabolismo de ribonucleótidos monofosfato de purinas, metabolismo de nucleótidos de purinas, y metabolismo de ribonucleótidos de purinas.
hsa-miRNA-1256	Metabolismo de DNA, organización del esqueleto de microtúbulos, procesos basados en microtúbulos, formación del complejo contenedor de proteínas celulares y regulación negativa de la transcripción.
hsa-miRNA-548a-3	Procesos metabólicos de ATP, metabolismo de rbo nucleósidos trifosfato, metabolismo de rbo nucleósidos trifosfato de purinas, metabolismo de regulación de nucleótidos y respuesta celular por estímulos de daño al DNA
hsa-miRNA-1290	Reproducción. Procesos reproductivos, organización de estructura extracelular, procesos de desarrollo involucrados en la reproducción y regulación positiva de adhesión celular.

Tabla 9. Análisis de miRNAs subexpresados en el grupo difuso respecto al grupo pilocítico (miRNA_{atap}).

miRNA	Procesos biológicos afectados
hsa-miRNA-642b	Respuesta de defensa, respuesta ambiente de radiación, respuesta inmune innata y regulación negativa de la respuesta a estímulos.
hsa-miRNA-365	Regulación negativa de la función molecular, localización celular de proteínas, localización celular de macromoléculas, regulación negativa de la expresión de genes y procesos catabólicos celulares.
hsa-miRNA-4443	Desarrollo de estructuras reproductivas, desarrollo del sistema reproductivo, desarrollo del cerebelo, desarrollo de glándulas y regulación positiva de la transducción de señales.
hsa-miRNA-4779	Polimerización de proteínas, polimerización de filamentos de actina, organización de filamentos de actina, regulación de proteólisis y polimerización o despolimerización de actina.
hsa-miRNA-3690	Procesos celulares catabólicos, procesos catabólicos, reproducción, procesos reproductivos y procesos metabólicos celulares.
hsa-miRNA-320b2	Adhesión celular homofílica vía membrana plasmática, adhesión célula- célula vía membrana plasmática, deubiquinación de proteínas, modificación de proteínas por proteína pequeña y procesamiento de RNA.
hsa-miRNA-451b	Desarrollo de axones, regulación positiva del metabolismo celular, regulación positiva de procesos metabólicos, regulación negativa de procesos catabólicos y axón génesis.
hsa-miRNA-606	Morfogénesis embrionaria, Desarrollo embrionario de cordados, regulación de vías señalización apoptóticas, organización de fibras supramoleculares y organización de citoesqueleto.
hsa-miRNA-151a	Transducción de señales, regulación biológica, respuesta celular a estímulos y regulación comunicación celulares.

9.6. Análisis con miRPathDB.

Se usó la base de datos mRPathDB con “Biological Process” para determinar los procesos biológicos que podrían estar afectados por la sobreexpresión de los miRNAs en el grupo pilocítico respecto al control (**Figura 14**). Asimismo, se calculó para los 5 miRNAs sobreexpresados en exosomas difusos respecto a los pilocíticos (**Figura 15**). Para algunos miRNAs sobreexpresados en la condición difusa se encontró evidencia experimental de su actividad reguladora sobre ciertos transcritos correspondientes a otras patologías (**Tabla 10**). Contrariamente en la condición pilocítica no se encontró evidencia de tipo experimental.

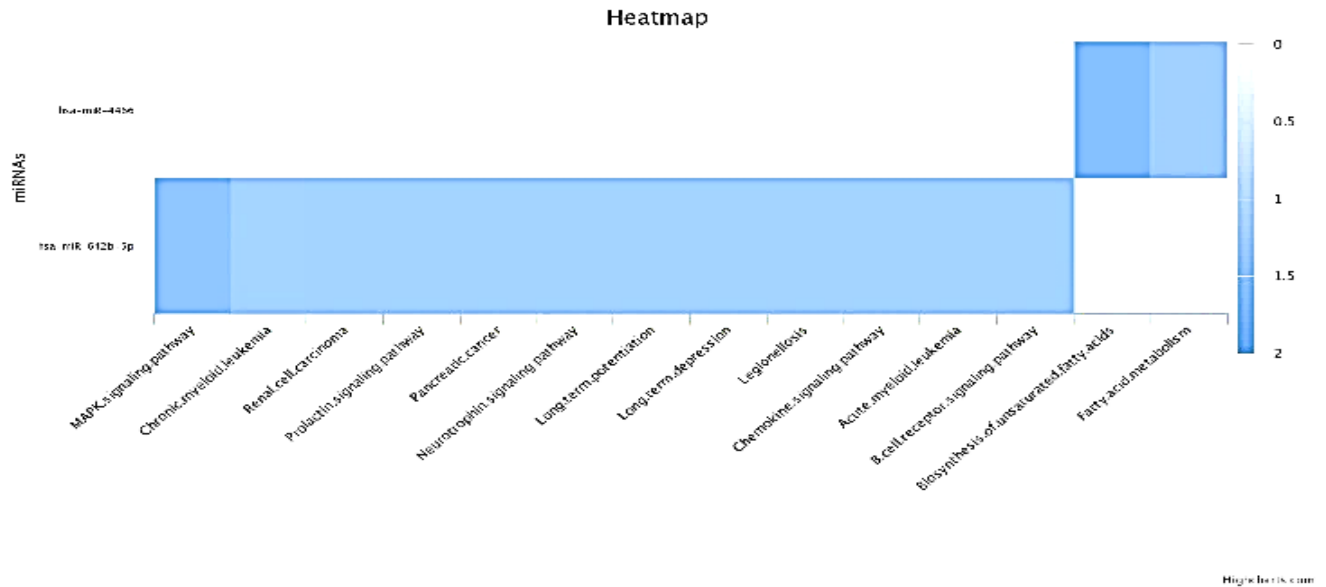


Figura 14. Procesos biológicos para los miRNAs sobreexpresados en pilocíticos respecto a difusos. Básicamente se ven afectados procesos como lo señalización de cinasas de ciclo celular, metabolismo de lípidos y aspectos relacionados a tumorigénesis diversa (miRPathDB).

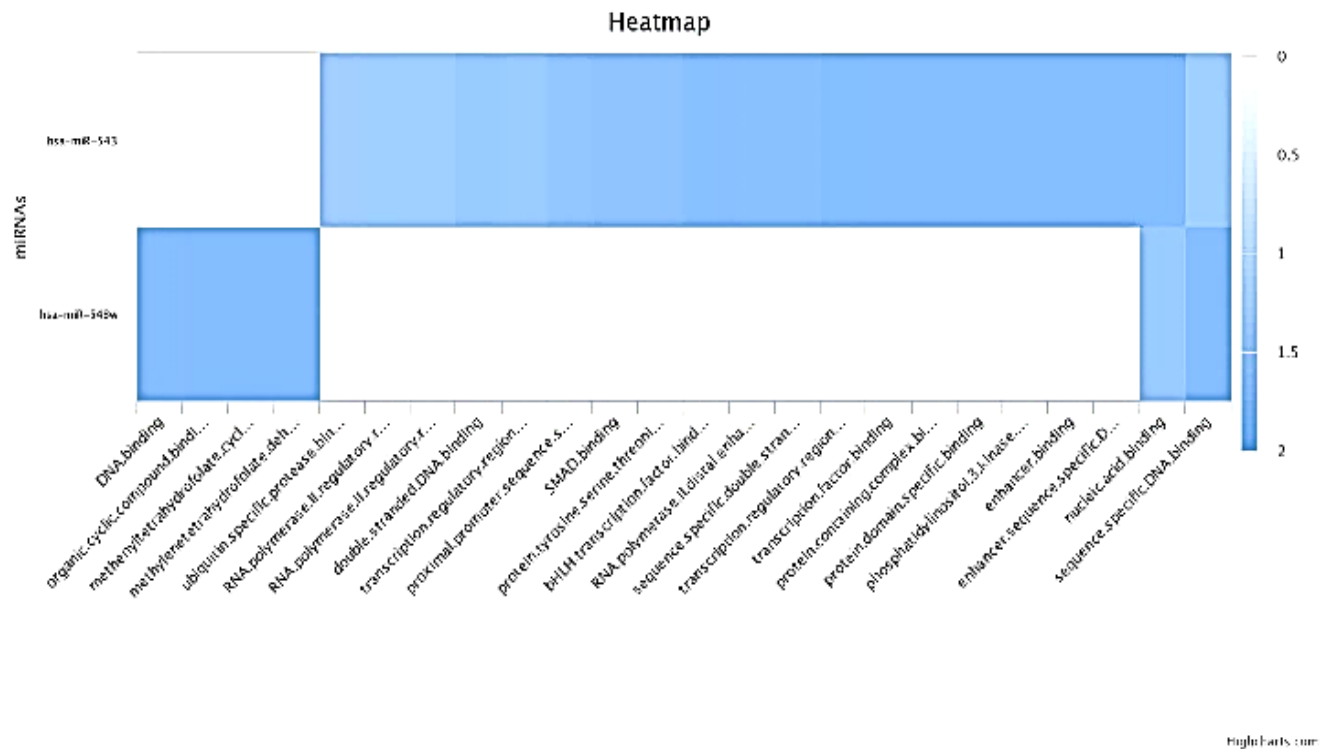


Figura 15. Procesos biológicos para los miRNAs sobreexpresados en difusos respecto a pilocíticos. Se pueden ver afectaciones relacionadas a aspectos relacionados con la transcripción por RNA polimerasas II, proteínas de unión al DNA y proteínas regulatorias de la transcripción en forma general (miRPathDB).

Tabla 10. Los miRNAs sobreexpresados en exosomas difusos y genes blanco-validados experimentalmente.

miRNA	Hits	Valor-P	Genes afectados
hsa-let-7a-5p	5	0.015	EGFR, HRAS, KRAS, NRAS, PIK3R1
hsa-let-7a-5p	4	6.83E-04	EGFR, HRAS, KRAS, NRAS
hsa-let-7b-5p	2	0.034	HRAS, NRAS
hsa-let-7c-3p	9	0.037	CBL, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, RPS27A, SHC1
hsa-miRNA-545-3p	11	0.019	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, SHC1, UBB
hsa-miRNA-548aa	12	0.024	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, UBA52, UBB
hsa-miRNA-548ai	10	0.033	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, SHC1, UBB
hsa-miRNA-548ap-3p	12	0.012	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, UBA52, UBB
hsa-miRNA-548d-3p	11	0.032	CBL, EGF, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, UBA52, UBB
hsa-miRNA-548h-3p	12	0.007	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, UBA52, UBB
hsa-miRNA-548t-3p	12	0.024	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, UBA52, UBB
hsa-miRNA-548z	12	0.007	CBL, EGF, EGFR, GAB1, KRAS, NRAS, PIK3CA, PIK3R1, PLCG1, RPS27A, UBA52, UBB
hsa-miRNA-365a-3p	3	0.012	KRAS, SHC1, UBB
hsa-miRNA-365a-3p	2	0.003	KRAS, SHC1

9.7. Simulaciones de interacción de piRNAs sobreexpresados.

Muchos transcritos de piRNAs se detectaron sobreexpresados, entre los más sobresalientes se encuentran 32 transcritos sobreexpresados en el grupo difuso (**Tabla 11**). También se encontraron 22 piRNAs sobreexpresados en el grupo pilocítico (**Tabla 12**).

Para poder predecir probabilidades de interacción RNA-RNA entre los piRNAs desregulados y el medio circundante de sus sitios probables de liberación (células transformadas) se seleccionaron secuencias de mRNAs con actividad biológica relacionada. Se realizó un análisis de predicción “*in silico*” de interacciones de estos piRNAs con transcritos de mRNAs expresados en tejido cerebral correspondientes a factores de transcripción, receptores celulares de señalización, oncogenes, supresores tumorales y proteínas de metilación del DNA para determinar su posible función como RNAs interferentes sobre estos transcritos. En la **Tabla 13** se muestran resultados de mayor estabilidad termodinámica, como energía libre normalizada (ndG). Simulando Interacciones de piRNAs sobreexpresados en exosomas de Ast difusos. En la **Tabla 14** se observa lo mismo para los correspondientes al grupo pilocítico.

Las **Tablas 13 y 14** proporcionan información significativa respecto a las posibilidades de interacción de las secuencias de piRNAs sobreexpresados en las condiciones de exosomas de suero de orígenes difusos y pilocíticos, respectivamente. Para estos análisis de interacción se escogieron secuencias diversas de receptores celulares, oncogenes y supresores tumorales con la intención de evaluar el papel de los piRNAs como RNAs interferentes debido a la información reciente a ese respecto que se ha generado en laboratorios de varios lugares dedicados a investigación de ncRNAs.

Tabla 11. Nivel de expresión y secuencias de piRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change).

piRNAs sobreexpresados en exosomas de origen difuso respecto a pilocíticos		
Fold-change	piRNA	Secuencia nucleotídica
65.16	piR-38063	TACATCATGGACCAAAGGACAGACAGGCTGT
58.22	piR-33700	CTCATTTGGACCAGATGATTGCGTTTTACAA
56.33	piR-50231	TGCAAAGGGAGATGAACAAGCCAAGGTTGCC
50.29	piR-38854	TAGAAGGTGAAAACCAAGGACCTAGGAAA
42.92	piR-42872	TCCAGTGGTGATCTAGGATAAAAGCCTGAGA
39.94	piR-36456	GTCAAAGGTGACATTCAAGTTTCTGGTTTGG
36.36	piR-46038	TCTGCCTGAACTACACTGAGAATGCATGATG
30.58	piR-34892	GAGTTGCTGAATGACAGACCTTGGGTTAC
30.52	piR-57093	TGGTCCACACAGGTTTCCTACCACATGTT
23.66	piR-61110	TTGATGGTAATTGAAAGAGCTTTTTGGGTGAC
15.03	piR-50052	TGATGTTCCACTTGTTTCTTCTGTTGCTCC
12.71	piR-59501	TGTTGTGGTATACGTTGTCTTTTCAAGGGGT
12.63	piR-58741	TGTGCACTAGCTGTCATTGGATAAGTCAT
11.76	piR-44932	TCGAGGACTGGTTAGCATTTTGGTAGCACC
11.6	piR-35820	GGACTTGTGTGAAGATGGATCAGGTGTGA
10.9	piR-45292	TCTAACTGCAGCACTGTAAGTGAAGGTTTC
10.77	piR-61900	TTTCGGAACGTAATGGTAGATCAGCTAT

Tabla 12. Nivel de expresión y secuencias de piRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change)

piRNAs sobreexpresados en exosomas de origen pilocítico respecto a difuso		
Fold-change	piRNA	Secuencia nucleotídica
72.39	piR-34584	GAGACCCTGGAATGGACTCGCGGACAGCAGT
31.17	piR-45809	TCTGAAGGTGATCTGGAATCCTAAGGGTGT
20.29	piR-48447	TGAGAGATTTCTCTATTCTTGCCTCCCCGC
18.88	piR-47240	TGAAGTCTACACGAATGGAAATATATATTC
14.99	piR-39384	TAGCTACTCCCCGCTTCATAAGTGTGCGCT
14.22	piR-38558	TACTATCAACTGCCCCAGAGGATGACTCAGT
10.9	piR-34513	GACTTGACAGATGGTGTGATCTTCAGAGG
10.84	piR-34367	GACCAAGGAGTTCATCTTCTCAGAGCTGCT
10.01	piR-56285	TGGGCTGTAACCATTAAGACTGAAGATTGA

Tabla 13. Interacciones con transcritos vs piRNAs sobreexpresados de exosomas de Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change) y con el parámetro de energía libres normalizada (ndG).

Abundancia	piRNA	ndG	GEN	Transcrito blanco
65.16	piR-38063	-6.58	RDH16	Retinol dehydrogenase16 variante 2
46.67	piR-50231	-5.58	UQCRH	Ubiquinol citocromo c reductasa proteína
39.94	piR-36456	-5.13	MYC	Protooncogén bhlh factor de transcripción factor
39.94	piR-36456	-5.08	ACCDC2	Contenedor principal Coiled-coild28
46.67	piR-50231	-4.78	53 C1	Cromosoma 1 marco de lectura abierto
46.67	piR-50231	-4.78	SPI1	Protooncogén Spi-1variante e 1
6.46	piR-47488	-4.7	NUDT22	Nudi hidrolasa 22 variante e 2
11.76	piR-44932	-4.64	C2AKR1	Aldo-ketoreductasefamily1 variante 3
7.47	piR-56899	-4.57	PLAAT4	Phospholipaseaandacyltransferase4
65.16	piR-38063	-4.53	RAB33B	Oncogenerab33b
9.57	piR-39908	-4.51	1CXCL1	Ligando a motivo quimiocina C-X-C variante
6.89	piR-44560	-4.50	DIRAS3	Dirasfamilygtpase3
65.16	piR-38063	-4.46	2AKT2	AKT serina/treonina cinasa variante 4
65.16	piR-38063	-4.46	RAB36	RAB36 RAS oncogén familia variante X5
6.89	piR-44560	-4.40	WBP1	Wwdomainbindingproteína1
9.57	piR-39908	-4.37	CITED1	Trans activador dominio rico en carboxilo Glu/Asp variante 1
65.16	piR-38063	-4.35	RPL19	Ribosomal proteína l 19 variante 1
42.92	piR-42872	-4.34	EPHB3	Ephreceptorb3
9.57	piR-39908	-4.33	DPM3	Doliquil fosfato manosyl transferasa variante regulatoria 1
39.94	piR-36456	-4.31	ARHGAP	Rhogtpaseactivatingproteína12 variante 3

65.16	piR-38063	-4.29	RET	Protooncogén RET variante 1
39.94	piR-36456	-4.29	IRIGI	Sensor de RNA RIG-IRIGI variante 1
65.16	piR-38063	-4.28	SESN1	Sestrin1 variante 3
39.94	piR-36456	-4.24	ST6GAL1	ST6 beta-galactosidealpha-26-sialyltransferase1 variante 4
9.57	piR-39908	-4.19	SETSIP	Proteína SET
6.61	piR-59106	-4.18	CINO80C	INO80 subunidad compleja variante 1
65.16	piR-38063	-4.16	EAPP	E2F fosfo proteína asociada a E2F variante 2
9.57	piR-39908	-4.14	ABCL	BCL11transcriptionfactor11A variante 34
36.36	piR-46038	-4.08	THOC5	THO subunidad compleja 5 variante 3
65.16	piR-38063	-4.07	CRHOC	Familia con homología a ras variante 1
58.22	piR-33700	-4.07	TRIB2	Tribble pseudo cinasa 2 variante 1
12.71	piR-42872	-4.06	ANAPC15	Promotora de anafase subunidad compleja15 variante 1
12.71	piR-59501	-4.06	CUBE2C	Ubiquitinconjugatingenzyme2 variante 1
42.92	piR-59501	-4.06	A3AKR7	Aldo-ketoreductasefamily7a3
12.71	piR-59501	-4.06	E2CUBE2	Enzima de conjugación con ubiquitina variante 3
8.16	piR-44580	-4.04	19RPL19	Proteína lisosomal variante 1
42.92	piR-42872	-4.01	ZYG11A	Zyg-11familyacellcycleregulator variante 1
6.89	piR-44560	-4.00	MANF	Factor neurotrófico derivado de astrocitos
6.89	piR-44560	-3.99	3ID3	Inhibidor de unión al DNA
10.9	piR-45292	-3.97	TBX1	T-boxtranscriptionfactor1 variante A
23.66	piR-61110	-3.97	CD99	molécula X grupo sanguíneo variante 1
39.94	piR-36456	-3.94	SERINC3	Serineincorporator3 variante 1
6.61	piR-59106	-3.94	3CDCA3	Variante asociada a división celular variante 2
58.22	piR-35820	-3.93	RAB40B	RAB40BRASoncogenefamily variante X5
42.92	piR-44580	-3.93	TP73	Proteína tumoral p73 variante 5
8.16	piR-44580	-3.93	GSTA4	Glutation S-transferasa alpha4
23.66	piR-61110	-3.92	FRMD3	Fermdomaincontaining3 variante 4
23.66	piR-61110	-3.90	RPL23A	Ribosomalproteína23a
36.36	piR-44932	-3.9	DEK	Proto- oncogén DEK variante X2
12.71	piR-42009	-3.89	2PDCD2	Muerte celular programada variante 3
6.16	piR-42009	-3.89	PDCD2	Muerte celular programada 2 variante 7
12.71	piR-59501	-3.89	SUSD3	Contenedor de sushido principal 3 variante 1
39.94	piR-36456	-3.88	PCNA	Antígeno de proliferación celular variante 1

Tabla 14. Interacciones de transcritos vs piRNAs sobreexpresados de (exosomas de Ast pilocíticos). Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa (Fold-change) y con el parámetro de energía libres normalizada (ndG).

Abundancia	piRNA	ndG	Gen	Transcrito blanco
20.29	piR-48447	-6.60	MYC	Protooncogén bhlh transcripción factor variante 2
20.29	piR-48447	-6.47	AXIN2	Axina 2 variante 1
20.29	piR-48447	-6.26	WIP12	Repetición WD de dominio fosfo inositol interacción 2 variante 1
20.29	piR-48447	-5.90	TYK2	Tiroxina cinasa 2 variante 1
20.29	piR-48447	-5.90	TYK2	Tiroxina cinasa 2 variante 1
20.29	piR-48447	-5.72	STK25	Serina/treonina cinasa 25 variante 5
20.29	piR-48447	-5.49	SYNPO2	Synaptopodina 2 variante 3
20.29	piR-48447	-5.26	SOX12	SRY-box transcripción factor 12
20.29	piR-48447	-5.26	EREG	Epiregulina
20.29	piR-48447	-5.26	TPD52	Proteína tumoral D52 variante 5
20.29	piR-48447	-5.26	MECOM	MDS1 and EVI1 complejo locus variante 15
20.29	piR-48447	-5.26	RALBP1	Rala de unión proteína 1
20.29	piR-48447	-5.26	SOX12	SRY-box transcripción factor 12
20.29	piR-48447	-5.26	EREG	Epiregulina
8.6	piR-38818	-5.13	CTNND2	Catenina delta 2 variante 6,
10.9	piR-34513	-4.9	ERBB2	Erb-b2 receptor tiroxina cinasa 2 variante 8
10.9	piR-34513	-4.9	ERBB2	Erb-b2 receptor tiroxina cinasa 2 variante 22
7.68	piR-55821	-4.84	IST1	Factor asociado con ESCRT-III variante 1
20.29	piR-48447	-4.79	PDGFC	Factor C de crecimiento de plaquetas variante 1
6.37	piR-42786	-4.77	LMO4	LIM dominio 4 variante 1,
20.29	piR-48447	-4.77	LMO4	FYVE rhogef y PH dominio contenedor
14.99	piR-39384	-4.74	WWP2	Dominio contenedor WW E3 ubiquitina proteína ligase 2 variante 1
8.6	piR-38818	-4.65	CTNND2	Catenina delta 2 variante 3
6.37	piR-42786	-4.58	NBR1	Autofagia cargo receptor variante 3
6.37	piR-42786	-4.47	ATMIN	ATM interactor variante 1
7.93	piR-52319	-4.47	DLG3	Proteína de andamiaje MAGUK 3 variante 3
20.29	piR-48447	-4.46	CSPP1	Proteína asociada a centrosoma y huso 1 variante 1
20.29	piR-48447	-4.46	MRAS	Oncogén RAS de musculo variante X2
14.99	piR-39384	-4.4	DDHD2	Dominio contenedor 2 variante 1
7.59	piR-38228	-4.38	ECT2	Transformador de células epiteliales 2 variante 7
14.99	piR-39384	-4.31	LRIG1	Repeticiones ricas en leucina de tipo inmunoglobulina dominio 1 variante 4
7.59	piR-38228	-4.30	KRIT1	Repetición contenedora de anquirina variante 7
7.34	piR-33480	-4.24	ANLN	Unión proteína anilina actina variante 2
6.37	piR-34418	-4.23	MECOM	MDS1 and EVI1 complejo locus variante 14
7.68	piR-42786	-4.20	PIK3R3	Phosphoinositide-3-cinasa regulatoria subunidad 3 variante 6
7.68	piR-55821	-4.20	ARHGEF7	Factor de intercambio de guanina Rho factor 7 variante 27

7.59	piR-38228	-4.13	ST18	C2H2C-type zinc finger transcripción factor variante 56
8.6	piR-56285	-4.12	PLEKHA7	Dominio contenedor de homología con pleckstrina A7 variante 3,
14.99	piR-56285	-4.12	SEPTIN3	Septina 3 variante B,
14.99	piR-38818	-4.09	GLDN	Gliomedina variante 2
20.29	piR-39384	-4.08	SPECC1	Antígeno espermático homología calponina y dominios coiled-coil 1 variante 3 dominios 1
20.29	piR-48447	-4.08	DENND2B	Dominio contenedor de DENN 2B variante 4
10.01	piR-48447	-4.05	TRIB2	Pseudo cinasa tribbles 2 TRIB2 variante 1
10.01	piR-34513	-4.02	FLT4	Receptor relacionado fms de tiroxina cinasa 4 variante 2
10.01	piR-56285	-4.02	RIGI	RNA sensor RIG-I variante 1
10.01	piR-34513	-4.02	IRS4	Insulina receptor sustrato 4 variante 1
7.59	piR-38228	-4.00	DAB2	DAB proteína adaptadora 2 variante 2
7.59	piR-38228	-3.99	ECT2	Transformador de células epiteliales 2 variante 4
10.01	piR-39384	-3.96	RTN4	Reticulon 4 variante 1
10.01	piR-56285	-3.94	ERBB2	Erb-b2 receptor tiroxina cinasa 2 variante 3,
7.45	piR-32384	-3.94	RBL2	Correpresor iónico RB 2 variante 1,
7.45	piR-32384	-3.93	CSNK1G3	Caseína cinasa 1 gamma 3 variante 8
20.29	piR-48447	-3.90	SPECC1	Antígeno espermático homología calponina y dominios coiled-coil 1 variante 3
7.85	piR-30463	-3.90	ZYG11A	Regulador de ciclo celular zyg-11 variante 1
7.85	piR-30463	-3.89	RAB23	Oncogén miembro de la familia RAS variante X1
7.85	piR-30463	-3.84	ARHGEF7	Factor de intercambio de guanina Rho 7 variante 6
10.84	piR-56285	-3.78	22 IFT22	Transporte intraflagelar 22 variante 2
10.84	piR-34367	-3.77	RAB11A	Oncogén miembro de la familia RAS variante 2
10.84	piR-34367	-3.74	BOC	Adhesión celular asociada a oncogén variante 6

10. DISCUSIÓN

Mediante el arreglo de expresión Human Transcriptome Array (HTA) matrices 2.0. se logró determinar con relativa precisión el contenido cualitativo y cuantitativo de la expresión diferencial de las muestras de secretomas provenientes de suero de pacientes pediátricos con astrocitoma del tipo pilocítico y difuso. La comparación entre los dos tipos tumorales y con respecto a sueros control evidenció una enorme diversidad de transcritos que cambian sus niveles relativos de expresión, destacando notablemente los miRNAs, snoRNAs, snRNAs Y-RNAs e incluso los piRNAs. Adicionalmente una gran variedad de mRNAs muestran desregulación. Esto en conjunto confirma la hipótesis de que en estos pacientes existe un contenido diferencial de transcritos a nivel de exosomas debido a la liberación de estos por células tumorales, los cuales representan una circulación importante de transcritos con el potencial de localizar células cercanas o distales al sitio de liberación, o sea de los centros tumorales. Se comprueba que existe una expresión diferencial secretómica significativa en representantes de prácticamente todos los tipos de transcritos de ncRNAs provenientes de los pacientes con Ast. El análisis bioinformático de un tipo de ncRNAs poco estudiado, los Y-RNAs, utilizando los algoritmos Random Forest y Vector Support Machine, reveló una potencial interacción en con proteínas como claudina, receptores Toll, hialuronidasa-1y además con múltiples proteínas relacionadas con los orígenes de replicación.

Expresión diferencial de los ncRNAs en enfermedades

Recientemente se ha encontrado que la de desregulación de RNAs no codificantes en cáncer es notablemente particular para cada tipo RNA desregulado y patología en particular, para cada tipo de RNA no codificante existe una desregulación notable. En diferentes estudios en todo el mundo se demuestra que transcritos específicos están desregulados en forma característica, por ejemplo, piRNAs, miRNAs y lncRNAs (Gibb et al., 2011; Ning et al., 2016; Syeda et al., 2020). En general existen RNAs no codificantes de tipos de cáncer específicos, también se sabe que por ese motivo tienen potencial como biomarcadores tumorales. Sin embargo, muchos de estos ncRNAs están desregulados no solo en una sino a veces en diferentes enfermedades ya que regulan vías de señalización claves relacionadas con la transformación tumoral. Incluso a veces pueden estar sobreexpresados en ciertas patologías, pero subexpresados en otras. Por lo que, aunque su desregulación ya sea positiva

o negativa es característica para una enfermedad su uso debe de complementarse con otro tipo de biomarcadores para tener un panorama más exacto del diagnóstico (Allegra et al., 2012; Condrat et al., 2020; Kourembanas, 2015). Aunque la desregulación de un miRNA por ejemplo es particularmente específica para una cierta patología en forma individual de tal manera que lo preferible es combinar diferentes tipos de biomarcadores para tener un diagnóstico más preciso. El problema técnico con los RNA no codificantes es su susceptibilidad a la degradación y su escasa estabilidad química, se deben de manejar técnicas de aislamiento muy cuidadosas para caracterizarlos incluso en ocasiones los erróneas pequeños como los piRNAs y los miRNAs deben de ser detectados por técnicas muy sofisticadas como la secuenciación masiva esto limita mucho la investigación sobre RNAs no codificantes en cáncer y por lo tanto su aplicación práctica como herramientas de diagnóstico molecular (Cai et al., 2009; D. N. Iyer et al., 2020).

Los ncRNAs: mejores biomarcadores circulantes que los mRNAs o las proteínas

Algunos autores sugieren que los ncRNAs son más específicos como biomarcadores en muchos tipos de cáncer ya que su expresión se relaciona más directamente con la manifestación y los signos de la enfermedad. El uso de proteínas tiene como inconveniente que en ocasiones los niveles elevados de las mismas no están relacionados con los síntomas de la enfermedad necesariamente, y se piensa que la sobreexpresión de estas es más debida a cuestiones de polimorfismos que determinan diferencias en sus niveles de expresión incluso entre individuos sanos (Ning et al., 2016). En el caso de sistema nervioso central se conoce una expresión diferencial muy marcada en los transcritos de diferentes ncRNAs e incluso su abundancia es mayor por lo que hay que considerar su búsqueda mediante uso de expresión diferencial para determinar su desregulación en enfermedad, deesa forma es posible la determinación de conjuntos de biomarcadores particulares (Velázquez-Flores et al., 2021) .

Potencialidad de ncRNAs como biomarcadores

En cuanto a si tienen potencial de ser biomarcadores en general se asume por grupos de investigación de todo el mundo que al haber sido detectados diferencialmente expresados los mismos ncRNAs en enfermedades específicas, incluso entre países con distinta composición étnica tienen el potencial para ser biomarcadores si son cuantificados en forma correcta tanto

cualitativamente (conjunto de biomarcadores seleccionados así como cuantitativamente es decir la expresión relativa de cada uno de ellos). En algunos lugares del mundo, su aplicación empieza a ser un hecho y en otros es inminente debido a la evidencia en un enorme número de individuos estudiados (Krishnan et al., 2017).

Efecto biológico de la secreción de ncRNAs

Se presentan así algunas interrogantes sobre las actividades funcionales de los ncRNAs encontrados en los exosomas de suero analizados. Se desarrollo una búsqueda extensiva en literatura científica mediante minería de datos, con respecto a los transcritos desregulados y su participación conocida en procesos patológicos particularmente en cáncer. Esto es importante desde el punto de vista funcional pues permite hipotetizar por qué unos tumores pueden ser más agresivos que otros si en efecto una proporción significativa de sus exosomas transportan eficientemente estos ncRNAs hacia sus células blanco. Qué información hay acerca de las biomoléculas y sus tejidos/órganos blancos. Se sabe que si la asimilación es relativamente rápida por células receptoras la probabilidad que influyan en células y tejidos próximos puede ser mayor debido a la concentración en las células proximales a las células liberadoras de exosomas.

Un aspecto importante es que estas moléculas no ejercen necesariamente las mismas funciones en todas las células o tejidos blanco. Aunque algunos ncRNAs pueden afectar vías de señalización universales presentes en casi todas las células somáticas. En ocasiones la expresión de los blancos de estos ncRNAs es particular de tejidos específicos e incluso existen blancos múltiples por ejemplo transcritos distintos para los miRNAs oncogénicos u oncomiRs, por lo que la predicción del efecto biológico dependerá de determinar los transcritos blancos exactos y además otros factores como los gradientes de concentración de los exosomas y su biomoléculas dependiendo de la captación de los mismos en cada región anatómica, al sitio de emisión (localización tumoral) y cooperatividad con otras moléculas de interferencia serian variables que influirían en los efectos biológicos en distintos tejidos (H. Liu et al., 2022).

Para el caso de los ncRNAs que interaccionaran con proteínas ejemplo los lncRNAs o los Y-RNAs esto dependería del repertorio molecular de receptores celulares, abundancia relativa de los mismos, sus isoformas incluso y los receptores citoplásmicos y/o nucleares con los

que interaccionan estos RNAs sobre la superficie celular dependiendo el tipo celular específico (Kadakkuzha et al., 2015).

¿Puede haber transformación celular a distancia?

En cuanto a si es posible que los exosomas liberados por células transformadas tendrían el potencial de transformar células lejanas, hipotéticamente es posible. Esto en un escenario donde las moléculas de células transformadas o tumorales se transporten establemente y tengan actividad supresora del efecto protector de ciertos genes como los supresores tumorales, por dar un ejemplo, de esto hay evidencia experimental y predictiva ya que son expresados constitutivamente en prácticamente cualquier célula ya sean proximales o distales al sitio de liberación de los exosomas de las células transformadas originales (tumor primario). Aunque como se mencionó anteriormente parecería más probable la afectación de células cercanas, pero no se excluye la posibilidad de diseminación a otros órganos y/o tejidos.

No solo la afectación de la expresión de estos genes supresores puede resultar con efectos transformadores, sino que distintos tipos de genes esenciales en procesos de regulación del ciclo celular, comunicación celular y el control metabólico pueden ser gradualmente afectados por estos procesos. Si se suma el hecho que el incremento de mutaciones a lo largo del tiempo suele tener consecuencias biológicas más graves en la regulación y homeostasis celular es altamente probable que los exosomas puedan afectar enormemente a distancia lo que muchos hemos propuesto en años recientes.

Evaluación de la ruta de los exosomas hacia sus células blanco.

Aunque teóricamente los exosomas pueden ser captados por endocitosis u otros mecanismos por casi cualquier célula; deben de existir teóricamente gradientes de concentración de cada tipo de exosoma es decir dependiendo del tipo celular que lo libera por lo que es de esperarse que la captación pueda ser mayor en células cercanas al sitio de liberación de estos por sus células liberadoras. Posiblemente mediante técnicas de conjugación de anticuerpos con átomos radiactivos dirigidos hacia proteínas características de exosomas como **Alix** o as tetraspaninas **CD9**, **CD63** y **CD81** se puedan marcar los mismos y localizarlos anatómicamente generando un par de respuesta (aniquilación de partículas positrón-electrón)

pueda ser posible cuantificar la concentración de exosomas in vivo mediante un tomógrafo de emisión de Positrones (Andreu & Yáñez-Mó, 2014).

XIST circulante en cáncer de mama se asocia con la diseminación hacia el cerebro.

La metástasis cerebral es un proceso altamente complejo y un proceso selectivo debido al microambiente único de este órgano tan especializado. En un estudio reciente se identificó a XIST un lncRNA con funciones de metástasis, y funcionando como un gen supresor en el cerebro. La regulación negativa de XIST activo 3 vías distintas EMT, MSN/c-Met y la liberación del miRNA-503 a nivel exosomal. Juntos promueven la expresión de características metastáticas en las células tumorales y disparan eventos de reprogramación del microambiente mediante comunicación exosomal. El resultado de nuestro análisis de la base de datos TCGA indica que su expresión se decrementa en alrededor de 48% en células de cáncer basales, y en el caso de los cánceres del subtipo luminal A y de Her2+ es de un 19% , en la mayoría de las metástasis de cerebro corresponden al tipo basal y al subtipo Her+ (Chen et al., 2016). En forma interesante XIST se encuentra regulado negativamente en la mayoría de las muestras de tejido de estos pacientes con metástasis de cerebro 78% comparado con 32% los de metástasis de hueso y un 41% de los pacientes con metástasis de pulmón. Estos estudios son consistentes con la noción de que debe existir una función supresora de XIST particularmente en cerebro. XIST también realiza silenciamiento de genes del cromosoma X actuando en cis, a través del complejo PRC2 ayudando en la metilación de H3K27me3 (Brockdorff, 2013). Aun no se comprende la función de este lncRNA y porque solo actúa en cromosoma X, pero cuando se ha introducido artificialmente XIST en autosomas tiene efectos similares de inactivación cromosómica en cis. Esto ha hecho pensar a algunos que la cromatina autosómica está preparada para ser inactiva por XIST (Niwínska et al., 2009; Brockdorff., 2013). Una expresión aberrante de XIST se ha implicado en la inactivación de algunos miRNAs por un efecto de esponja y además desregulan las señales de AKT en este estudio, se demostró que MSN y el miRNA-503 se sobreexpresan una vez se ha realizado el silenciamiento de XIST. Ambos genes se codifican en el cromosoma X y están bajo el efecto directo de XIST mediante su acción epigenética. De esta forma XIST se considera ser una vía oncogénica específica de género (Brockdorff., 2013).

El predecir qué procesos biológicos podrían estar regulando los ncRNAs diferencialmente expresados, por supuesto que nos abre el panorama acerca de los que podrían estar haciendo en un paciente pediátrico; sin embargo, podría estar muy lejos de la realidad, ya que esto dependerá del tejido/órgano blanco al que se dirijan los exosomas.

Para el miRNA más abundantemente sobre expresado en exosomas difusos se detectaron varias formas relacionadas al miRNA-548 y se ha probado anteriormente que por ejemplo el miRNA-548-3p incrementa la migración e invasión en células de carcinoma de esófago (ESCC), mediante la regulación negativa de NRIP1 Neuropilina 1 que también se expresa en cerebro. Esta es una proteína nuclear que interacciona específicamente con el dominio de activación dependiente de la hormona AF2 de receptores nucleares, esta proteína modula la actividad transcripcional del receptor de estrógenos (Ni et al., 2018). Esto sugiere que altos niveles de expresión en tumores difusos relativo a pilocíticos de este miRNA-548 o algunos de los relacionados que se encuentran entre los más sobre expresados en exosomas difusos podría conducir a la diseminación o forma metastática de estas células si este mecanismo se encuentra presente en astrocitomas. Estudios realizados “*in silico*” demuestran que la familia miRNA-548 se asocia con los componentes principales de la vía de señalización PTEN/PI3K/Akt lo que disminuye la apoptosis y por ende incrementa la proliferación de células malignas, esto abre una perspectiva interesante en la terapia contra el cáncer (Yadollahi-Farsani et al., 2023).

Si los transcritos alternativos conservan sus sitios de unión a miRNA-548 será muy probable que sean los mismos mensajeros blanco y por ende se intervengan en menor o mayor medida las mismas vías de señalización que se describen en otros tejidos.

Con respecto al miRNA-1256 bajo nivel de expresión de sus transcritos es asociada con progresión de cáncer colorrectal (CRC) y se puede usar como biomarcador para esta enfermedad (Liu et al., 2018). El primer análisis comprensivo de miRNAs celulares y exosomales sugiere que existe una enorme diferencia en células tumorales (Honegger et al., 2015). Un blanco importante de este miRNA es E2F3 y funciona como un oncogén en células de cáncer de esófago, sin embargo, miRNA-1256 puede ser secuestrado por el RNA circular CircKRT14 incrementando la expresión de E2F3 (Guan et al., 2023). Con relación al miRNA-1973 y su función probable estaría desarrollada con reducción de la apoptosis del tumor (Fomicheva et al., 2017).

El miRNA-1290 se sobre expresó también y tiene funciones relacionadas con la perpetuación del linaje y progresión del cáncer en células tumorales cerebrales pediátricas (Kling et al., 2017). El miRNA-1290 también desregulado se ha detectado igualmente en carcinoma celular laríngeo escamoso (LSCC) esto se hizo por secuenciación de última generación y se detectó enriquecimiento de exosomas con miRNA-1290 y con miRNA-382-5p esto en comparación con sus células de origen. En cáncer colorrectal el miRNA-1290 decremento la expresión de thrombospondina 1 (THBS1), inhibidor Dickkopf de la vía de señalización Wnt (DKK3) y el supresor de invasión de células cancerosas (SCAI). En forma significativa aumentando la proliferación, migración, y angiogénesis (Soheilifar et al., 2022). La evidencia respecto al papel de importancia de los RNAs circulares (circRNAs) en el desarrollo del cáncer se incrementa día a día, ejemplo de eso es CircGAK que compite endógenamente por la unión del miRNA-1323. Este se ha identificado como blanco el transcrito que codifica a la proteína TPD52 como uno de sus blancos por interferencia en cáncer de mama, la proteína es localizada en retículo endoplasmático y la región perinuclear, una baja expresión de este miRNA provoca un incremento radical en la disponibilidad de transcritos de TPD52, así como de su traducción a proteína. A nivel clínico se constata que una expresión alta predice una pobre supervivencia en pacientes con cáncer de mama esto es debido a su regulación negativa sobre la vía de la proteína cinasa activada por AMP (AMPK) un regulador importante en la homeostasis (Chen et al., 2023). Si el mecanismo es similar en astrocitoma se pudiera hablar probablemente de un mecanismo de protección de emergencia en el que ésta elevada concentración detectada de miRNA-1323 suprime a TPD52 para proteger mecanismos de regulación homeostáticos.

El miRNA-1323 está involucrado en modular la radio resistencia y subraya la necesidad de estudio posterior como marcador predictivo de resistencia a la eficacia de radioterapia. Para el miRNA-382 se encontró en cáncer de mama (BC) que RERG ejercía su función supresora de tumores atenuando la activación de los efectores de señalización Ras/ERK. La molécula de miRNA-382-5p reprime directamente RERG por lo tanto promueve la viabilidad de cáncer de mama y su clonalidad, supervivencia, migración, invasión e in vivo su tumorigénesis-metástasis. El miRNA-329 está subexpresado en pacientes con cáncer pancreático que demostraron una supervivencia significativamente más corta con respecto a los pacientes que lo sobre expresan (Wang et al., 2016). Para el miRNA-802 se ha detectado

ya su sobreexpresión en tejidos de osteosarcoma en comparación con tejidos normales, su expresión reforzada fue capaz de promover proliferación celular en líneas celulares U2OS y MG63, su RNA antisentido inhibió la proliferación celular en experimentos de interferencia. La proteína p27 se une a la ciclina dependiente de cinasa (CDK) para detener el ciclo celular, además regula procesos como la migración celular y otras funciones independientes. El transcrito de p27 es un blanco de miRNA-802 y su sobreexpresión inactiva la vía PI3K/AKT lo que logra inducir la migración e invasión en osteosarcoma de acuerdo con hallazgos nuevos (Gao et al., 2022).

La sobreexpresión del miRNA-1305 indujo la diferenciación de células madre pluripotentes, apoptosis celular y aceleración de la transición G1/S, pero su subexpresión facilita la pluripotencia e incrementa la supervivencia celular. La regulación negativa de miRNA-1305 facilita la pluripotencia y un nivel de supervivencia celular incrementado. Esto sugiere que regula el nivel de equilibrio entre pluripotencia y diferenciación celular y puede estar regulando la expresión de genes (Weng et al., 2010). La regulación negativa del RNA circular circ_0008934 que es esponja de miRNA-1305 detiene el crecimiento del carcinoma hepatocelular y su metástasis produciendo la sobreexpresión de miRNA-1305 con lo que se inhibe TMTC3, esto sugiere una red de regulación circ_0008934/ miRNA-1305/ TMTC3 que podría estar presente en otros cánceres y ser un blanco terapéutico en este carcinoma (Li et al., 2022). En un estudio reciente por retrotranscripción - PCR cuantitativa o qRT-PCR, se ha demostrado la sobreexpresión de miRNA-1270 en osteosarcoma humano *in vivo* como en *in vitro*, también en muestras clínicas (Weng et al., 2010). En otro estudio se encontró sobre expresado el miRNA-1270 en cáncer de endometrio (Bao et al., 2013). Se sabe recientemente que NR3C1 es el blanco de miRNA-1270 y está fuertemente regulado en cáncer pancreático (Wang et al., 2023). El miRNA-1270 además en cáncer de mama tiene como blanco de interferencia al transcrito del factor asociado a diferenciación de macrófagos (MMD2) y logra suprimir la progresión maligna en estos tumores (Hu et al., 2022). En cuanto al miRNA-4500, la familia de let -7 es una de las primeras identificadas para los miRNAs, los miembros de la familia están altamente expresados en tejido pulmonar normal y se sabe que controlan negativamente varios oncogenes. Se ha descrito regulado negativamente en cáncer de pulmón “non-small cell lung cancer”, promoviendo el desarrollo tumoral. El miRNA-4500 logra esto teniendo como blanco el homólogo B de lin-28 y la GTPasa proto oncogén RAS. (Li et al.,

2019).. Resultados recientes indican que este miRNA suprime la proliferación celular, migración, invasión y promueve la apoptosis *in vitro*. Además, otros estudios muestran que inhibe la proliferación de cáncer de pulmón de células pequeñas (NSCLC) e indujo apoptosis (Fu et al., 2021). STAT3 es un oncogén conocido y recientemente se sabe es influido por miRNA-4500 en forma negativa (Song et al., 2003; Alvarez et al., 2006;). La activación constitutiva de STAT es una característica común en tejidos como el pulmón y se propone que tiene una función importante en la resistencia tumoral a tratamientos convencionales y terapias moleculares (Yin et al., 2012; You et al., 2014). Se conoce que STAT3 suprime la apoptosis en células cancerosas vía la inactivación de vías extrínsecas e intrínsecas (Epling-Burnette et al., 2001; Zhang et al., 2014). El miRNA-708 actúa como supresor tumoral en varios cánceres humanos, las células de retinoblastoma que sobreexpresan exhiben una tasa de migración e invasividad menor comparada al control (Dai et al., 2022).

Transcritos sobreexpresados en exosomas pilocíticos

Algunos tipos de ncRNAs se sobreexpresaron en muestras de exosomas de origen pilocítico respecto al grupo difusos. Algunos transcritos en el caso de los miRNAs estuvieron sobreexpresados en muestras de exosomas pilocíticos y sus funciones fisiológicas están relacionadas a procesos celulares relacionados a menor invasividad o actividad de migración celular de células tumorales lo que en cáncer se conoce como dormancia. Los miRNAs actúan comúnmente como supresores de tumores u oncogenes (OncomiR).

Nuestros resultados sugieren que muchos de los miRNAs sobre expresados en exosomas de origen pilocítico están relacionados a los aspectos de: inhibición de proliferación celular, migración e invasión. En estudios relacionados al cáncer se ha descrito que estas células tienen una fuerte respuesta a mantener mecanismos que les permitan estar localizados anatómicamente en una región determinada lo que se conoce como ubicuidad de las células tumorales en este caso de origen pilocítico, por lo que las células de este grado tumoral y su actividad natural menos invasiva. La dormancia en el cáncer es considerada un periodo de progresión del cáncer con enfermedad residual que permanece asintomática clínicamente por un largo periodo, puede aparecer en formación de tumores primarios, después en diseminación y en micro metástasis (Giancotti., 2013). La dormancia del cáncer se caracteriza con células que no se dividen y se encuentran en arresto en la fase G0-G1 del

ciclo celular es la causa mayor de metástasis (Jiang et al., 2019). La expresión del miRNA-642b-3p se ha propuesto como marcador de diagnóstico en pacientes de cáncer pancreático (Hussein et al., 2017).. Se ha propuesto actividad de OncomiR a miRNA-642b-3p, ya que regula negativamente a CSMD1 en cáncer gástrico. Se piensa que esto es ocasiona un incremento en actividad proliferativa afectando la vía Smad, estos son factores de transcripción que afectan genes específicos (Liu et al., 2022).

En tanto al miRNA-365a-3p este puede mediar la transducción PI3K/AKT vía p-AKT en carcinoma escamoso de laringe (LSCC), además puede actuar como oncomiR estimulando el crecimiento celular y metástasis por la vía de señalización PI3K/AKT (Geng et al., 2016). En cáncer colorrectal se detectaron bajos niveles del miRNA-365-3p asociados con tamaño de tumores grande y más invasión local y metástasis con un pronóstico más negativo a los pacientes. Este miRNA inhibe la vía de señalización JAK/STAT3 mediante la inhibición de ADAM10 y por ende la progresión metastática (Hong et al., 2020). La sobreexpresión de este miRNA en muestras del grupo pilocítico explicaría en parte la baja invasividad de estos tumores.

El miRNA-4443 fue el único miRNA que mostró diferencias significativas en la mayoría de las comparaciones en tumores de origen glial (Drusco et al., 2018). Algunos estudios comprueban que el miRNA-4443 abroga los efectos de FEZF1-AS1 en carcinoma hepatocelular (HCC) en proliferación celular, migración e invasión. (Gong et al., 2018). miRNA-4443 ha demostrado decrementar la invasividad en células de cáncer de colon humano (Meerson & Yehuda, 2016).

El miRNA-4779 actúa como supresor de tumores, induciendo apoptosis y arresto de ciclo celular *in vitro* como *in vivo* afectando a PAK2 y a CCND3 (Koo & Kwon., 2018). El miRNA-3690 promueve la proliferación celular en cáncer de tiroides y se considera un candidato a biomarcador de la enfermedad (Shen et al., 2020; Zhang et al., 2021).

El nivel de expresión del miRNA-320 está relacionado con la migración e invasión de cáncer su alto nivel indica un pronóstico negativo y riesgo de metástasis (Wang et al., 2017). Estudios demuestran que el miRNA-320b esta significativamente regulado en forma negativa en varios canceres incluyendo el colorrectal (CRC), (Dong et al., 2011), glioblastoma, (Roth et al., 2011). cáncer gástrico (Li et al., 2011) y cáncer de vejiga (Song et al., 2010). Los miRNA-320a y el miRNA-320b se detectan muy sobre expresados en neuroblastoma y están

involucrados en varios aspectos del cáncer como supervivencia, apoptosis, diferenciación, angiogénesis e invasión en forma de exosomas de células de neuroblastoma que contienen miRNAs oncogénicos (Haug et al., 2015).. La sobreexpresión de miRNA-320b inhibió la proliferación de células CRC mediante la regulación de c-Myc (Wang et al., 2015). Se sabe que en cáncer pancreático miRNA-320b tiene como blanco a FOXM1 Inhibiendo la proliferación celular (Jingyang., 2022).

La sobre regulación de miRNA-451 decrementó la proliferación celular, invasión, migración celular y formación de colonias in vitro, y el crecimiento tumoral in vivo en la migración de macrófagos en interacción con MIF (Liu et al., 2013). Recientemente se descubrió que este miRNA se asocia con altas probabilidades de supervivencia en pacientes con cáncer colorrectal. Mediante estudios de pérdida y ganancia de función se demostró que miRNA-451 Inhibía la proliferación y migración mediante sus efectos en inhibición de ciertos genes, en particular se identificó como blanco SAMD4B (Wu et al., 2021). El miRNA-let-7a confiere resistencia a proliferación celular en cáncer de células no pequeñas de pulmón (NSCLC). (Liu et al., 2018).. También se sabe que este miRNA en cáncer de mama metastático logra inhibir la invasión, migración suprimiendo a un represor transcripcional de la familia polcomb EZH2, así como la transición mesenquimal epitelial mediante su unión a MDAMB-231 (Patel et al., 2023). El miRNA-151a-3p se ha encontrado desregulado en cáncer de próstata y esofágico (Wong et al., 2003; Matsuda et al., 2011; Pasqualini et al., 2015).

Una alta asociación ha sido demostrada entre los niveles sobre expresados de miRNA-151a-3p y metástasis de cáncer de próstata (Barnabas et al., 2011). Se ha encontrado que la genisteína un isoflavonoide puede suprimir la expresión de miRNA-151a-3p y por consecuencia inhibir la proliferación y desarrollo de cáncer de próstata (Chiyomaru et al., 2012). Otro estudio demostró que el miRNA-151a-3p regula directamente la expresión de TWIST1 mediante represión de la región 3' UTR lo que reprime la migración e invasión en células de cáncer de mama a través del incremento de la expresión de E-cadherina.

Para el caso de este miRNA empaquetado en exosomas, se sabe que en exosomas de cáncer de pulmón el miRNA-151a-5p promueve proliferación celular, inhibe apoptosis, y la transición epitelial mesenquimal esto lo logra mediante su interacción con N4BP1,

acelerando el desarrollo el cáncer por lo que puede ser blanco de tratamiento la inhibición de este miRNA (Hu et al., 2023).

En el caso de cáncer colorrectal este miRNA-151a-5p estimula la proliferación celular, migración e invasión. Se reportó que su blanco funcional es el transcrito de agmatinasa (AGMAT). (Xie et al., 2023). Se ha demostrado que miRNA-519d-3p y el RNA largo no codificante regulador de reprogramación (ROR) interaccionan, usando miRcode y starBase v2.0, experimentalmente se verifico por ensayos de luciferasa e inmunofluorescencia de inmuno precipitación. Se piensa que esto crea una red de regulación para los procesos de proliferación, migración, invasión en cáncer gástrico (Jin et al., 2023).

Y-RNAs y su afinidad de unión a proteínas

Los primeros análisis de cuantificación de los 4 subtipos de Y-RNAs en cáncer humano se desarrollaron en tumores sólidos de carcinomas y adenocarcinomas de pulmón, páncreas, vejiga, próstata, colon y cervicouterino. Como regla general, los Y-RNAs se detectaron sobreexpresados en estos tipos de cáncer (Christov et al., 2008b). Sin embargo, la expresión del Y-RNA-5 no se correlaciona con la de los otros 3, esto quizás podría explicarse principalmente por su localización a nivel del núcleo, mientras los otros son más bien citoplasmáticos (Gendron et al., 2001). Una investigación reciente muestra la subexpresión de estos Y-RNAs en el cáncer de mama y con una alta correlación entre los Y-RNAs-1, Y-RNA-3, y Y-RNA-4, mientras que el Y-RNA-5 no se correlacionó (Tolkach et al., 2017). Las vesículas aisladas de leucemia mieloide tienen una cantidad relativamente alta del Y-RNA-5, que es el RNA más abundante después de los rRNAs y tRNAs (Chakraborty et al., 2015). Otro estudio sugiere una función importante de las vesículas circulantes y los Y-RNAs transportados en ellas como reguladores del Desarrollo de los tumores cerebrales (Spinelli et al., 2019).

Los transcritos de los genes humanos hY1, hY5 y de hY3 mostraron una sobreexpresión en el grupo difusos respecto al grupo pilocíticos. Los cambios en las concentraciones de los Y-RNAs se implican actualmente con varias enfermedades. En general algunos ncRNAs son descritos como reguladores en programas de diferenciación celular, en algunas células no diferenciadas hacia tipos neuronales y gliales (Aprea & Calegari., 2015). Los Y-RNAs son muy abundantes en términos cuantitativos y poseen una secuencia conservada de igual forma

que los miRNAs, y se detectan comúnmente en vesículas que se originan de diferentes tipos celulares y en muchos vertebrados (Bellingham et al., 2012; Nolte-T Hoen et al., 2012; Tosar et al., 2015; Driedonks & Nolte-T'Hoen., 2019). Los Y-RNAs transportados en vesículas se investigan en los procesos relacionados con muerte celular e inflamación, en células de inmunidad innata como monocitos con efectos tanto pro como antiinflamatorios, esto se observó cuando se detectaron fragmentos de Y-RNAs en exosomas que conferían cardio protección a través de la modulación de la expresión y secreción IL-10 (Cambier et al., 2017; Haderk et al., 2017).

Las probables interacciones de los cuatro Y-RNAs humanos con receptores celulares, al ser validadas en forma bioinformática, nos arrojan algunos indicios de sus funciones *in vivo*. Estas moléculas blanco participan en diversos procesos biológicos como: la comunicación celular, la activación inmune y la replicación del DNA, Algunos aspectos importantes han son reportados recientemente en la literatura y cuyas pruebas se basan en evidencia experimental, éstas describen solo interacciones de tipos individuales de Y-RNAs con proteínas de receptores celulares particulares u otras proteínas. En contraste, este trabajo presenta una aproximación predictiva, cuyos datos obtenidos sugieren fuertemente una variedad de interacciones que podrían en efecto estar ocurriendo en la naturaleza con miembros de familias de proteínas. El hecho de qué producto de las simulaciones realizadas se detecten Y-RNAs específicos de alguno de los 4 subtipos, con puntajes de unión significativos, con proteínas específicas, es importante pues sugiere su especificidad funcional. Por lo tanto, permite hipotetizar interacciones de Y-RNAs con receptores celulares específicos u otras proteínas que pudieran desencadenar respuestas particulares, dependiendo de la abundancia relativa de los diferentes subtipos de Y-RNAs. Un ejemplo de esto es lo observado cuando consideramos los altos valores de puntaje para el caso de los Y-RNA-4 y el Y-RNA-5 con respecto a los receptores “Toll” y los puntajes más bajos para los Y-RNAs Y-RNA-3 y Y-RNA-1 con respecto a esta misma familia de receptores y en general con otras familias de proteínas de receptores celulares humanos en estos análisis.

El enigma respecto a los altos niveles de expresión circulantes de los Y-RNAs, así como de sus fragmentos, es todavía algo intrigante. Las predicciones de interacción presentadas aquí apoyan la noción de que existe la posibilidad de que los Y-RNAs puedan ser efectivamente moléculas multitareas que pudieran regular procesos biológicos clave y por lo tanto, afectar

el metabolismo en el cáncer y otras patologías. Esto puede ser consecuencia de interacciones que activarían receptores relacionados con proceso de señalización en el sistema inmune, desencadenando procesos como la apoptosis, proliferación celular excesiva, alteraciones del ciclo celular, sólo por citar algunos.

En el caso de las interacciones predichas para los componentes de la maquinaria de replicación, en específico con las proteínas comúnmente asociadas a las horquillas de replicación del DNA, los resultados sugieren que efectivamente estas interacciones deben de ocurrir “in vivo”, ya que los puntajes encontrados para Y-RNA-4 y el Y-RNA-5, muestran un potencial de interacción física con moléculas de diferentes tipos de DNA polimerasas o helicasas, por ejemplo. Un hecho interesante es que el dominio “loop” parece ser suficiente, por sí mismo, para unirse en mayor o menor grado a algunos de los diferentes receptores Toll.

Lo cual apoya la idea de que los fragmentos procesados de Y-RNAs que contengan este dominio, pueden ser funcionales en cuanto a su unión a receptores y posible activación de éstos. Algunas preguntas quedan abiertas acerca de las funciones que desempeñan los Y-RNAs circulantes (en exosomas) y en su forma libre, así como el efecto que tiene el cambio en la expresión de los Y-RNAs en los Ast pediátricos y en otros tipos de cáncer. Por ende, Será necesario desarrollar nuevos métodos experimentales para evaluar con detalle estas interacciones y así lograr una mejor comprensión general de estos procesos biológicos relacionados con la actividad de los Y-RNAs circulantes.

Existen piRNAs sobreexpresados en exosomas difusos y pilocíticos

Los animales expresan piRNAs para controlar la transposición durante el desarrollo de la línea germinal (Ghildiyal & Zamore., 2009). La evolución adaptativa, con sustitución no sinónima, está diseminada ampliamente en la biogénesis de los genes de los piRNAs (Obbard et al., 2009). Los elementos transponibles (TE) son secuencias móviles de DNA en el genoma que pueden alterar o inactivar la expresión de los genes (Clegg & Durbin., 2003; Lerman & Feder., 2005).

Los elementos transponibles se movilizan por acción de la transposasa, que reconoce las repeticiones terminales invertidas para lograr la integración de una región de DNA de doble cadena hacia un sitio nuevo (Huang et al., 2012). La transposición se ha relacionado con el

cáncer y otras enfermedades (Belancio et al., 2008). Es posible que la fuerte expresión de múltiples piRNAs pudiera ser una respuesta o un tipo de mecanismo de defensa en contra de la expresión de transposones en etapas de desarrollo primario de tumores.

En cuanto a los resultados de las simulaciones contra transcritos como los de oncogenes o genes supresores para piRNAs sobreexpresados en exosomas de origen difuso y pilocítico, cuyos resultados serán próximamente publicados. En estos análisis se detectaron innumerables interacciones favorables entre estas RNAs piwi con este tipo de transcritos, además su cooperatividad es evidente pudiéndose unir varios distintos piRNAs a un mismo mRNA, esto es muy similar a los mecanismos de interferencia por miRNAs y nos lleva a replantearnos los papeles generales de los piRNAs de acuerdo con estos hallazgos “*in silico*”.

Los snoRNAs sobre expresados en exosomas difusos y en pilocíticos

Otros RNAs fuertemente sobreexpresados fueron los snoRNAs los cuales son un tipo de ncRNA que se relaciona principalmente al procesamiento de otros RNAs mediante modificaciones bioquímicas, en el caso del pre-rRNA este sufre un patrón complejo de modificación de nucleósidos, esto incluye metilaciones y pseudouridilaciones. Los genes de los snoRNAs están localizados de manera no uniforme en el genoma, la mayoría se codifican en intrones de genes de proteínas relacionados con síntesis de ribosomas o traducción, son transcritos por RNA polimerasa II y se pueden ubicar en regiones intergénicas, marcos de lectura abierta de genes de proteínas y en algunas regiones sin traducir (UTRs). Se pueden transcribir a través de sus promotores propios usando RNA polimerasa II y RNA polimerasa III (Kaur et al., 2012).

snRNAs U6, U7, U5 sobre expresados en exosomas difusos

El RNU6 conocido como U6 es el más conservado entre las especies de los cinco tipos generales de snRNAs, este RNA salta a otras regiones genómicas por medio de transposones y esto ocasiona múltiples copias en el genoma y exhibe alta abundancia de transcritos, que en la condición difusa es alta y debe estar involucrada en la escisión de intrones a partir del procesamiento de pre-mRNAs. Por qué este tipo de snRNAs se halla tan abundantemente en exosomas de muestras difusas podría relacionarse a desregulación en células tumorales. Y esta podría ser una forma para transportar al núcleo en ciertas células blanco para así interferir

en sus procesos de empalme (splicing) alternativo, esto podría generar variantes de transcripción de ciertos genes, esto a través de una inducción en células blanco para afectar la asociación de componentes del empalmosoma como U4, U5 y U2 por ejemplo afectando el procesamiento de transcritos y generando mayor cantidad de isoformas con respecto a su gen de origen. Como U6 se encuentra en el centro del empalmosoma este coordina la química del splicing con ayuda de los snRNAs U2 y U5 posiciona los sustratos para la reacción de splicing. Esta reacción consiste en dos pasos de transesterificación y se asemeja cercanamente a la reacción catalizada por los intrones de auto-splicing del grupo II (Wahl et al., 2009; Hoskins & Moore., 2012). De manera distinta a los otros snRNAs del empalmosoma, los cuales son sintetizados por la RNA pol II el U6 es sintetizado por RNA polimerasa III (Moenne et al., 1990). U6 es el más conservado de los snRNAs en secuencia y en tamaño (Brow & Guthrie., 1988). Es aceptado generalmente que U6 permanece en el núcleo y no es retenido en el nucleolo, se ha revelado también que puede formar un complejo con U4/U6 di-snRNP o un U4/U6. U5 tri-snRNP que se encuentran en compartimientos subnucleares llamados cuerpos de Cajal (Staněk et al., 2003). El splicing alternativo es un mecanismo de preprocesamiento de mRNAs precursores y es parte de la regulación de genes en eucariotas superiores, esta genera una diversidad enorme de transcriptoma a partir de un número relativamente pequeño de genes codificantes de proteínas esta transcripción alternativa será distinta entre tejidos con respecto a ciertos genes (Wang et al., 2008). Durante las respuestas celulares a estímulos externos y además en enfermedades humanas (Li et al., 2017) . Así U6 debe sufrir cambios durante el ensamble y activación del empalmosoma, este procesamiento asegura un control de calidad para preparar los pasos de expresión genética en eucariotas. La medición del índice de splicing es definido como la proporción del índice de expresión de un exón con respecto al gen de que se expresa, una diferencia significativa en el índice de splicing de un exón entre muestras indica un splicing alternativo diferencial (Clark et al., 2007). De acuerdo con nuestros datos 114 transcritos correspondientes a genes y pseudogenes de RNUs están notablemente sobreexpresados en los exosomas provenientes de la condición difusa, como ejemplo el U6 con 75 genes y pseudogenes y U7 con 24 genes y pseudogenes respectivamente.

Sorprendentemente después de análisis desarrollados con los datos del índice de splicing de exones (Exon Splicing Index, ESI) el número total de transcritos con mayor índice de

splicing, ESI mayor a 4 en cada condición, fueron en exosomas difusos 20,748 transcritos con respecto a pilocíticos y en exosomas pilocíticos respecto a difusos solamente 1,197 transcritos. Esto sugiere hiperactividad del sistema de splicing que genera un número notablemente mayor de copias de transcritos alternativos en la condición con mayor ESI que es la de exosomas difusos.

Esto apoya la idea de hiper excitabilidad de la maquinaria de splicing en células tumorales difusas, con una consecuencia de más diversidad de transcritos codificantes y no codificantes, también explicaría la enorme adaptación fisiológica y metabólica de estas células a través del uso de más isoformas moleculares. La pregunta entonces es si es posible atribuir al menos en parte la actividad de splicing a esta diversidad de cambios de expresión en la maquinaria de URNAs o RNUs.

También se origina la pregunta de qué tipo de mecanismos podría desencadenar en células blanco la captación de un buen número de exosomas en cuanto a sus funciones canónicas de splicing alternativo con estos transcritos U6, U7, U5 y de U3 entre otros. De cualquier forma, es muy aparente la relación en cuanto a los niveles de diversidad de expresión y la diversidad de transcritos alternativos. Estos datos en su conjunto describen la enorme complejidad de los diferentes tipos de RNAs no codificantes con funciones diversas. Contenidos en derivados de suero pediátrico estos exosomas con su bien conocido potencial de transporte de moléculas reguladoras y cuyos destinos pueden variar desde el microambiente local hasta células remotas en sitios anatómicos distintos a través de los mecanismos de captación de vesículas en células blanco. El hecho de que transcritos claramente determinados por sus variaciones tan significativas en sus niveles de expresión (población de transcritos) correspondientes a diferentes tipos de ncRNAs con funciones muy diversas como lo son los: miRNAs, snoRNAs, U6RNAs, Y-RNAs, piRNAs, así como otros ncRNAs que podrían ser útiles para diagnóstico de astrocitomas de grado pilocítico y difuso en forma de biomarcadores que permitan distinguir en estas 2 condiciones tumorales. De forma preferencial una mezcla de estas moléculas debería ser detectada simultáneamente en forma cualitativa y cuantitativa y posteriormente ser validada por PCR en tiempo real para algunos transcritos. Sin embargo, a esto es necesario incrementar el número de muestras analizadas para determinar con mayor precisión los biomarcadores de diagnóstico y su combinación exacta.

Biomarcadores potenciales en astrocitomas mediante ncRNAs.

Con los resultados de esta investigación se tiene la posibilidad de establecer señales particulares relacionadas con la expresión diferencial en el secretoma de pacientes pediátricos de astrocitoma como herramientas de rápido diagnóstico no invasivo como se ha mencionado. Ejemplo de esto puede ser el miRNA-548 con algunas de sus variantes como las: i-3, w, a-2 y la i-2. como biomarcadores para identificar condición difusa, con algunos transcritos de snRNAs de la familia U6, esto podría complementarse con información de los niveles relativos de los 4 Y-RNAs humanos (hY1, hY3, hY4 y el hY5). Para el caso de los tumores pilocíticos probablemente se deben validar primero a: miRNA-642b, miRNA-365a, miRNA-4443 y posiblemente a miRNA-4779, junto con bajo nivel de expresión de genes U6 y U7, algunos tipos de snoRNAs se pueden agregar por ejemplo el snora 72-L5 o el snora 72. Una interrogante es si usar algunos piRNAs claramente sobre expresados en esta condición como biomarcadores complementarios a los descritos.

Funciones probables para algunos ncRNAs desregulados en astrocitomas.

Estos datos apoyan la evidencia reciente en cuanto a lo que conocemos de exosomas y su naturaleza, en cuanto a su actividad como elementos mediadores de comunicación intercelular y transportadores de poderosos reguladores de la actividad de las células en forma de moléculas de RNAs no codificantes, codificantes y proteínas principalmente.

Si es que la integridad funcional de esta plétora de RNAs realmente es adquirida eficientemente por sus células blanco sin duda sus efectos biológicos deberán de estar activando cambios celulares profundos como lo son la transformación celular y la modificación de microambientes.

Para probar los blancos específicos de los transcritos provenientes de estos exosomas primero que nada se pueden desarrollar análisis de interacción “*in silico*” con diversos tipos de receptores celulares, esto es importante debido a la muy limitada información aun existente al respecto, aunque algunos transcritos se podrían internalizar simplemente por captación directa de vesículas o exosomas por parte de las células blanco mediante procesos como la fagocitosis o por fusión directa con la membrana.

De cualquier forma, surgen varias preguntas sobre la accesibilidad e internalización correcta y contenido de acuerdo con el tipo de transcritos y células de procedencia de las vesículas. Respecto a la funcionalidad de estas moléculas de diversa naturaleza de ncRNAs si estas son capturadas en células blanco pueden posiblemente reprogramar la actividad celular mediante la actividad de los transcritos transportados sobre moléculas blanco en las células blanco. Estos mecanismos tienen la ventaja de poder viajar y transportar a otros grupos de células en forma local o sistémicamente hacia órganos y tejidos lejanos y puede ser que esta sobreabundancia de transcritos por lo tanto tenga un rol importante en diferentes aspectos de la enfermedad como se ha mencionado y por lo tanto puedan ser blancos para terapias futuras en base a la aplicación de por ejemplo tecnología de interferencia de RNA o por aplicación local de moléculas de competencia endógena.

11. CONCLUSIONES

1. La estrategia experimental utilizada permitió el aislamiento de exosomas de muestras séricas provenientes de pacientes pediátricos con Astrocitoma pilocítico o difuso.
2. Con el método de microarreglos se determinó la expresión diferencial global de los transcritos circulantes en exosomas obtenidos a partir de pacientes pediátricos con astrocitoma pilocítico o difuso. Los resultados tienen que validarse posteriormente por qPCR o secuenciación masiva, para proceder a su uso rutinario como herramientas de diagnóstico. Hay que considerar validaciones individuales por paciente para cada uno de los biomarcadores seleccionados para determinar su sensibilidad y especificidad.
3. Se identificaron diversas especies de ncRNAs con un cambio en su expresión en los grupos Pilocítico y Difuso, así como la existencia de transcritos característicos para cada grupo. La sensibilidad y especificidad de los biomarcadores propuestos se tiene que establecer en muestras individuales.
4. El uso de herramientas computacionales de simulación permitió la predicción de las funciones celulares de mayor probabilidad de los Y-RNAs y piRNAs. Estas predicciones deberán de ser corroboradas en el futuro por técnicas experimentales que permitan demostrar las interacciones predichas de manera computacional.
5. Los mecanismos de interacción con proteínas, propuestos para los Y-RNAs, se focalizan en la replicación del DNA y en la regulación del sistema inmune. No obstante, algunos otros procesos de interacción con proteínas pueden estar presentes o incluso con otros ncRNAs.
6. La expresión diferencial de los piRNAs sugiere su participación como RNAs interferentes y por lo tanto como supresores de la expresión génica. Mas aún, las pruebas *in silico* mostraron posible cooperatividad en sus efectos interferentes ya que en varios mRNAs se detectaron diferentes sitios potenciales de unión simultáneos para distintos tipos de piRNAs.
7. La ventaja de la simulación es reducir las posibilidades de ocurrencia de sucesos a los más probables. Esto otorga información que permite establecer la ruta más corta en el trabajo experimental que deba realizarse a posteriori.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W., & Bartel, D. P. (2015). Predicting effective miRNA target sites in mammalian mRNAs. *ELife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.05005>
- Alarcón, C. R., Lee, H., Goodarzi, H., Halberg, N., & Tavazoie, S. F. (2015). N6-methyladenosine marks primary miRNAs for processing. *Nature*, 519(7544). <https://doi.org/10.1038/nature14281>
- Alexander, R. P., Fang, G., Rozowsky, J., Snyder, M., & Gerstein, M. B. (2010). Annotating non-coding regions of the genome. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2814>
- Aliotta, J. M., Pereira, M., Amaral, A., Dooner, M. S., DelTatto, M., Papa, E., Goldberg, L. R., & Quesenberry, P. J. (2010). Lung-Derived Microvesicles Induce Stable Long-Term Epigenetic Changes In Marrow Cells. *Blood*. <https://doi.org/10.1182/blood.v116.21.4799.4799>
- Allegra, A., Alonci, A., Campo, S., Penna, G., Petrungaro, A., Gerace, D., & Musolino, C. (2012). Circulating miRNAs: New biomarkers in diagnosis, prognosis and treatment of cancer (Review). In *International Journal of Oncology* (Vol. 41, Issue 6). <https://doi.org/10.3892/ijo.2012.1647>
- Alvarez, J. V., Greulich, H., Sellers, W. R., Meyerson, M., & Frank, D. A. (2006). Signal transducer and activator of transcription 3 is required for the oncogenic effects of non-small-cell lung cancer-associated mutations of the epidermal growth factor receptor. *Cancer Research*, 66(6). <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-3757>
- Alvarez-Erviti, L., Seow, Y., Yin, H., Betts, C., Lakhal, S., & Wood, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4). <https://doi.org/10.1038/nbt.1807>
- Amaral, P. P., Dinger, M. E., Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2008). The eukaryotic genome as an RNA machine. In *Science* (Vol. 319, Issue 5871). <https://doi.org/10.1126/science.1155472>
- Ambros, V., & Moss, E. G. (1994). Heterochronic genes and the temporal control of *C. elegans* development. *Trends in Genetics*, 10(4). [https://doi.org/10.1016/0168-9525\(94\)90213-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(94)90213-5)
- Andreu, Z., & Yáñez-Mó, M. (2014). Tetraspanins in extracellular vesicle formation and function. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00442>
- Apra, J., & Calegari, F. (2015). Long non-coding RNA s in corticogenesis: deciphering the non-coding code of the brain . *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.15252/embj.201592655>

- Aravin, A., Gaidatzis, D., Pfeffer, S., Lagos-Quintana, M., Landgraf, P., Iovino, N., Morris, P., Brownstein, M. J., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Chien, M., Russo, J. J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2006). A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature04916>
- Atwood, B. L., Woolnough, J. L., Lefevre, G. M., Ribeiro, M. S. J., Felsenfeld, G., & Giles, K. E. (2016). Human argonaute 2 is tethered to ribosomal RNA through miRNA interactions. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.725051>
- Baldi, P., Brunak, S., Chauvin, Y., Andersen, C. A. F., & Nielsen, H. (2000). Assessing the accuracy of prediction algorithms for classification: An overview. In *Bioinformatics* (Vol. 16, Issue 5). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/16.5.412>
- Balss, J., Meyer, J., Mueller, W., Korshunov, A., Hartmann, C., & von Deimling, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-008-0455-2>
- Bao, W., Wang, H. H., Tian, F. J., He, X. Y., Qiu, M. T., Wang, J. Y., Zhang, H. J., Wang, L. H., & Wan, X. P. (2013). A TrkB-STAT3-miRNA-204-5p regulatory circuitry controls proliferation and invasion of endometrial carcinoma cells. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-155>
- Barman, B., & Bhattacharyya, S. N. (2015). mRNA targeting to endoplasmic reticulum precedes ago protein interaction and miRNA (miRNA)-mediated translation repression in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.C115.661868>
- Barnabas, N., Xu, L., Savera, A., Hou, Z., & Barrack, E. R. (2011). Chromosome 8 markers of metastatic prostate cancer in African American men: Gain of the MIR151 gene and loss of the NKX3-1 gene. *Prostate*. <https://doi.org/10.1002/pros.21302>
- Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O., & Gidrol, X. (2011). Pre-miRNA and mature miRNA in human mitochondria. *PLoS ONE*, 6(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020220>
- Bartel, D. P. (2009). miRNA: Target Recognition and Regulatory Functions. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.002>
- Belancio, V. P., Hedges, D. J., & Deininger, P. (2008). Mammalian non-LTR retrotransposons: For better or worse, in sickness and in health. In *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.5558208>
- Bellaousov, S., Reuter, J. S., Seetin, M. G., & Mathews, D. H. (2013). RNAstructure: Web servers for RNA secondary structure prediction and analysis. *Nucleic Acids Research*, 41(Web Server issue). <https://doi.org/10.1093/nar/gkt290>

Bellingham, S. A., Coleman, B. M., & Hill, A. F. (2012). Small RNA deep sequencing reveals a distinct miRNA signature released in exosomes from prion-infected neuronal cells. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks832>

Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., Barzilai, A., Einat, P., Einav, U., Meiri, E., Sharon, E., Spector, Y., & Bentwich, Z. (2005). Identification of hundreds of conserved and nonconserved human miRNA. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1590>

Bernhardt, H. S. (2012). The RNA world hypothesis: the worst theory of the early evolution of life (except for all the others)a. In *Biology Direct* (Vol. 7). <https://doi.org/10.1186/1745-6150-7-23>

Betel, D., Wilson, M., Gabow, A., Marks, D. S., & Sander, C. (2008). The miRNA.org resource: Targets and expression. *Nucleic Acids Research*, 36(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm995>

Bose, M., Barman, B., Goswami, A., & Bhattacharyya, S. N. (2017). Spatiotemporal Uncoupling of miRNA -Mediated Translational Repression and Target RNA Degradation Controls MicroRNP Recycling in Mammalian Cells. *Molecular and Cellular Biology*, 37(4). <https://doi.org/10.1128/mcb.00464-16>

Bringmann, K., Grandoni, F., Saha, B., & Williams, V. V. (2019). Truly subcubic algorithms for language edit distance and RNA folding via fast bounded-difference min-plus product. *SIAM Journal on Computing*, 48(2). <https://doi.org/10.1137/17M112720X>

Brockdorff, N. (2013). Noncoding RNA and Polycomb recruitment. In *RNA* (Vol. 19, Issue 4). <https://doi.org/10.1261/rna.037598.112>

Brouha, B., Schustak, J., Badge, R. M., Lutz-Prigge, S., Farley, A. H., Morant, J. V., & Kazazian, H. H. (2003). Hot L1s account for the bulk of retrotransposition in the human population. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(9). <https://doi.org/10.1073/pnas.0831042100>

Brow, D. A., & Guthrie, C. (1988). Spliceosomal RNA U6 is remarkably conserved from yeast to mammals. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/334213a0>

Buzdin, A., Gogvadze, E., Kovalskaya, E., Volchkov, P., Ustyugova, S., Illarionova, A., Fushan, A., Vinogradova, T., & Sverdlov, E. (2003). The human genome contains many types of chimeric retrogenes generated through in vivo RNA recombination. *Nucleic Acids Research*, 31(15). <https://doi.org/10.1093/nar/gkg496>

Cai, Y., Yu, X., Hu, S., & Yu, J. (2009). A Brief Review on the Mechanisms of miRNA Regulation. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(08\)60044-3](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(08)60044-3)

Cambier, L., Couto, G., Ibrahim, A., Echavez, A. K., Valle, J., Liu, W., Kreke, M., Smith, R. R., Marbán, L., & Marbán, E. (2017). Y RNA fragment in extracellular vesicles confers

cardioprotection via modulation of IL -10 expression and secretion . EMBO Molecular Medicine. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606924>

Cambray, G., Guimaraes, J. C., & Arkin, A. P. (2018). Evaluation of 244,000 synthetic sequences reveals design principles to optimize translation in escherichia coli. In *Nature Biotechnology* (Vol. 36, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/nbt.4238>

Camussi, G., Deregibus, M. C., Bruno, S., Cantaluppi, V., & Biancone, L. (2010). Exosomes/microvesicles as a mechanism of cell-to-cell communication. In *Kidney International*. <https://doi.org/10.1038/ki.2010.278>

Cao, Y., Romero, J., & Aspuru-Guzik, A. (2018). Potential of quantum computing for drug discovery. *IBM Journal of Research and Development*, 62(6). <https://doi.org/10.1147/JRD.2018.2888987>

Chairoungdua, A., Smith, D. L., Pochard, P., Hull, M., & Caplan, M. J. (2010). Exosome release of β -catenin: A novel mechanism that antagonizes Wnt signaling. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.201002049>

Chakraborty, S. K., Prakash, A., Nechooshtan, G., Hearn, S., & Gingeras, T. R. (2015). Extracellular vesicle-mediated transfer of processed and functional RNY5 RNA. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.053629.115>

Chen, D. L., Ju, H. Q., Lu, Y. X., Chen, L. Z., Zeng, Z. L., Zhang, D. S., Luo, H. Y., Wang, F., Qiu, M. Z., Wang, D. S., Xu, D. Z., Zhou, Z. W., Pelicano, H., Huang, P., Xie, D., Wang, F. H., Li, Y. H., & Xu, R. H. (2016). Long non-coding RNA XIST regulates gastric cancer progression by acting as a molecular sponge of miRNA-101 to modulate EZH2 expression. *Journal of Experimental and Clinical Cancer Research*, 35(1). <https://doi.org/10.1186/s13046-016-0420-1>

Chen, G., Wang, Z., Wang, D., Qiu, C., Liu, M., Chen, X., Zhang, Q., Yan, G., & Cui, Q. (2013). LncRNADisease: A database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1099>

Chen, K. G., Valencia, J. C., Lai, B., Zhang, G., Paterson, J. K., Rouzaud, F., Berens, W., Wincovitch, S. M., Garfield, S. H., Leapman, R. D., Hearing, V. J., & Gottesman, M. M. (2006). Melanosomal sequestration of cytotoxic drugs contributes to the intractability of malignant melanomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600213103>

Chen, X., & Wolin, S. L. (2004). The Ro 60 kDa autoantigen: Insights into cellular function and role in autoimmunity. In *Journal of Molecular Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s00109-004-0529-0>

Chen, Y., Peng, C., Tan, W., Yu, J., Zayas, J., Peng, Y., Lou, Z., Pei, H., & Wang, L. (2023). Tumor protein D52 (TPD52) affects cancer cell metabolism by negatively regulating AMPK. *Cancer Medicine*, 12(1). <https://doi.org/10.1002/cam4.4911>

- Cheng, H. P., Deumens, E., Freericks, J. K., Li, C., & Sanders, B. A. (2020). Application of Quantum Computing to Biochemical Systems: A Look to the Future. In *Frontiers in Chemistry* (Vol. 8). <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.587143>
- Cheng, J., Guo, J. M., Xiao, B. X., Miao, Y., Jiang, Z., Zhou, H., & Li, Q. N. (2011). PiRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clinica Chimica Acta*. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2011.05.015>
- Cherubini, E., Gustincich, S., & Robinson, H. (2006). The mammalian transcriptome and the cellular complexity of the brain. In *Journal of Physiology*. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2006.118364>
- Chiyomaru, T., Yamamura, S., Zaman, M. S., Majid, S., Deng, G., Shahryari, V., Saini, S., Hirata, H., Ueno, K., Chang, I., Tanaka, Y., Tabatabai, Z. L., Enokida, H., Nakagawa, M., & Dahiya, R. (2012). Genistein suppresses prostate cancer growth through inhibition of oncogenic MiRNANA-151. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043812>
- Chowdhury, F. A. R. R., Zhang, H., & Huang, L. (2019). Learning to Fold RNAs in Linear Time. *BioRxiv*.
- Christov, C. P., Gardiner, T. J., Szuts, D., & Krude, T. (2006). Functional Requirement of Noncoding Y RNAs for Human Chromosomal DNA Replication. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/mcb.01060-06>
- Christov, C. P., Trivier, E., & Krude, T. (2008a). Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604254>
- Christov, C. P., Trivier, E., & Krude, T. (2008b). Noncoding human Y RNAs are overexpressed in tumours and required for cell proliferation. *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6604254>
- Ciesla, M., Skrzypek, K., Kozakowska, M., Loboda, A., Jozkowicz, A., & Dulak, J. (2011). miRNAs as biomarkers of disease onset. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. <https://doi.org/10.1007/s00216-011-5001-8>
- Clark, T. A., Schweitzer, A. C., Chen, T. X., Staples, M. K., Lu, G., Wang, H., Williams, A., & Blume, J. E. (2007). Discovery of tissue-specific exons using comprehensive human exon microarrays. *Genome Biology*. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-4-r64>
- Clegg, M. T., & Durbin, M. L. (2003). Tracing floral adaptations from ecology to molecules. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg1023>
- Cobb, M. (2017). 60 years ago, Francis Crick changed the logic of biology. *PLoS Biology*, 15(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003243>
- Collino, F., Deregibus, M. C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C., & Camussi, G. (2010). Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue

specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. PLoS ONE. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011803>

Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suciu, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. (2020). miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis. In *Cells* (Vol. 9, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/cells9020276>

Cooper, G. M., & Hausman, R. E. (2007). *The Cell: A Molecular Approach* 2nd Edition. In Sinauer Associates.

Costa dos Santos, G., Renovato-Martins, M., & de Brito, N. M. (2021). The remodel of the “central dogma”: a metabolomics interaction perspective. In *Metabolomics* (Vol. 17, Issue 5). <https://doi.org/10.1007/s11306-021-01800-8>

Costa-Silva, B., Aiello, N. M., Ocean, A. J., Singh, S., Zhang, H., Thakur, B. K., Becker, A., Hoshino, A., Mark, M. T., Molina, H., Xiang, J., Zhang, T., Theilen, T. M., García-Santos, G., Williams, C., Ararso, Y., Huang, Y., Rodrigues, G., Shen, T. L., ... Lyden, D. (2015). Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nature Cell Biology*, 17(6). <https://doi.org/10.1038/ncb3169>

Crick, F. (1970). Central dogma of molecular biology. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/227561a0>

Cristiano, S., Leal, A., Phallen, J., Fiksel, J., Adleff, V., Bruhm, D. C., Jensen, S. Ø., Medina, J. E., Hruban, C., White, J. R., Palsgrove, D. N., Niknafs, N., Anagnostou, V., Forde, P., Naidoo, J., Marrone, K., Brahmer, J., Woodward, B. D., Husain, H., ... Velculescu, V. E. (2019). Genome-wide cell-free DNA fragmentation in patients with cancer. *Nature*, 570(7761). <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1272-6>

Dai, C., Yu, H., Bai, Q., Huang, D., Li, J., & Wang, W. (2022). miRNA -708 suppresses the proliferation, migration, and invasion of human retinoblastoma cells by targeting RAP2B, a member of the RAS oncogene family. *Acta Biochimica Polonica*, 69(4). https://doi.org/10.18388/abp.2020_5872

Danylova, T. V., & Komisarenko, S. V. (2020). Standing on the shoulders of giants: James watson, francis crick, maurice wilkins, rosalind franklin and the birth of molecular biology. *Ukrainian Biochemical Journal*, 92(4). <https://doi.org/10.15407/ubj92.04.154>

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>

Detzer, A., Engel, C., Wünsche, W., & Sczakiel, G. (2011). Cell stress is related to re-localization of Argonaute 2 and to decreased RNA interference in human cells. *Nucleic Acids Research*, 39(7). <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1216>

Dong, Y., Wu, W. K. K., Wu, C. W., Sung, J. J. Y., Yu, J., & Ng, S. S. M. (2011). miRNAs dysregulation in colorectal cancer: A clinical perspective. In *British Journal of Cancer*. <https://doi.org/10.1038/bjc.2011.57>

Driedonks, T. A. P., & Nolte-T'Hoen, E. N. M. (2019). Circulating Y-RNAs in extracellular vesicles and ribonucleoprotein complexes; Implications for the immune system. In *Frontiers in Immunology* (Vol. 10, Issue JAN). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03164>

Drusco, A., Fadda, P., Nigita, G., Fassan, M., Bottoni, A., MP, G., Sacchi, D., Calore, F., Carosi, M., Antenucci, A., Casini, B., Kelani, H., Pescarmona, E., G, D. L., Zanesi, N., MS, B., & CM, C. (2018). Circulating miRNAs Predict Survival of Patients with Tumors of Glial Origin. *EBioMedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2018.03.022>

Dworkin, J. P., Lazcano, A., & Miller, S. L. (2003). The roads to and from the RNA world. *Journal of Theoretical Biology*, 222(1). [https://doi.org/10.1016/S0022-5193\(03\)00020-1](https://doi.org/10.1016/S0022-5193(03)00020-1)

Elling, R., Chan, J., & Fitzgerald, K. A. (2016). Emerging role of long noncoding RNAs as regulators of innate immune cell development and inflammatory gene expression. *European Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.1002/eji.201444558>

Epling-Burnette, P. K., Liu, J. H., Catlett-Falcone, R., Turkson, J., Oshiro, M., Kothapalli, R., Li, Y., Wang, J. M., Yang-Yen, H. F., Karras, J., Jove, R., & Loughran, T. P. (2001). Inhibition of STAT3 signaling leads to apoptosis of leukemic large granular lymphocytes and decreased Mcl-1 expression. *Journal of Clinical Investigation*, 107(3). <https://doi.org/10.1172/jci9940>

Esnault, C., Maestre, J., & Heidmann, T. (2000). Human LINE retrotransposons generate processed pseudogenes. *Nature Genetics*, 24(4). <https://doi.org/10.1038/74184>

Fabbri, M., Girnita, L., Varani, G., & Calin, G. A. (2019). Decrypting noncoding RNA interactions, structures, and functional networks. In *Genome Research* (Vol. 29, Issue 9). <https://doi.org/10.1101/gr.247239.118>

Fabini, G., Rutjes, S. A., Zimmermann, C., Pruijn, G. J. M., & Steiner, G. (2000). Analysis of the molecular composition of Ro ribonucleoprotein complexes. Identification of novel Y RNA-binding proteins. *European Journal of Biochemistry*. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01298.x>

Fallmann, J., Will, S., Engelhardt, J., Grüning, B., Backofen, R., & Stadler, P. F. (2017). Recent advances in RNA folding. In *Journal of Biotechnology* (Vol. 261). <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.07.007>

Fang, S., Zhang, L., Guo, J., Niu, Y., Wu, Y., Li, H., Zhao, L., Li, X., Teng, X., Sun, X., Sun, L., Zhang, M. Q., Chen, R., & Zhao, Y. (2018). NONCODEV5: A comprehensive annotation database for long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 46(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1107>

Fernandes, J. C. R., Acuña, S. M., Aoki, J. I., Floeter-Winter, L. M., & Muxel, S. M. (2019). Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: Physiology and disease. In *Non-coding RNA* (Vol. 5, Issue 1). <https://doi.org/10.3390/ncrna5010017>

Fomicheva, K. A., Knyazev, E. N., & Mal'tseva, D. V. (2017). hsa-miRNA-1973 miRNA is Significantly and Differentially Expressed in MDA-MB-231 Cells of Breast Adenocarcinoma and Xenografts Derived from the Tumor. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. <https://doi.org/10.1007/s10517-017-3873-0>

Fouraux, M. A., Bouvet, P., Verkaart, S., Van Venrooij, W. J., & Pruijn, G. J. M. (2002). Nucleolin associates with a subset of the human Ro ribonucleoprotein complexes. *Journal of Molecular Biology*. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00518-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00518-1)

Fox, D. M., MacDermaid, C. M., Schreij, A. M. A., Zwierzyna, M., & Walker, R. C. (2022). RNA folding using quantum computers. *PLoS Computational Biology*, 18(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1010032>

Freyssinet, J. M. (2003). Cellular microparticles: What are they bad or good for? In *Journal of Thrombosis and Haemostasis*. <https://doi.org/10.1046/j.1538-7836.2003.00309.x>

Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009a). Most mammalian mRNAs are conserved targets of miRNAs. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>

Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2009b). Most mammalian mRNAs are conserved targets of miRNAs. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.082701.108>

Fu, D., Ren, Y., Wang, C., Yu, L., & Yu, R. (2021). LINC01287 facilitates proliferation, migration, invasion and EMT of colon cancer cells via miRNA-4500/MAP3K13 pathway. *BMC Cancer*, 21(1). <https://doi.org/10.1186/s12885-021-08528-7>

Gagnon, K. T., Li, L., Chu, Y., Janowski, B. A., & Corey, D. R. (2014). RNAi factors are present and active in human cell nuclei. *Cell Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.013>

Gandhi, M., Caudron-Herger, M., & Diederichs, S. (2018). RNA motifs and combinatorial prediction of interactions, stability and localization of noncoding RNAs. In *Nature Structural and Molecular Biology* (Vol. 25, Issue 12). <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0155-0>

Gao, L. F., Jia, S., Zhang, Q. M., Xia, Y. F., Li, C. J., & Li, Y. H. (2022). miRNAs -802 promotes the progression of osteosarcoma through targeting p27 and activating PI3K/AKT pathway. *Clinical and Translational Oncology*, 24(2). <https://doi.org/10.1007/s12094-021-02683-w>

Gardiner, T. J., Christov, C. P., Langley, A. R., & Krude, T. (2009). A conserved motif of vertebrate Y RNAs essential for chromosomal DNA replication. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.1472009>

Gendron, M., Roberge, D., & Boire, G. (2001). Heterogeneity of human Ro ribonucleoproteins (RNPS): Nuclear retention of Ro RNPS containing the human hY5 RNA in human and mouse cells. *Clinical and Experimental Immunology*. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2001.01566.x>

Geng, J., Liu, Y., Jin, Y., Tai, J., Zhang, J., Xiao, X., Chu, P., Yu, Y., Wang, S. C., Lu, J., Han, S., Shi, J., Guo, Y., & Ni, X. (2016). miRNA-365a-3p promotes tumor growth and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Oncology Reports*, 35(4), 2017–2026. <https://doi.org/10.3892/or.2016.4617>

Ghidoni, R., Benussi, L., & Binetti, G. (2008). Exosomes: The Trojan horses of neurodegeneration. In *Medical Hypotheses*. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2007.12.003>

Ghildiyal, M., & Zamore, P. D. (2009). Small silencing RNAs: An expanding universe. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2504>

Giancotti, F. G. (2013). XMechanisms governing metastatic dormancy and reactivation. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.029>

Gibb, E. A., Vucic, E. A., Enfield, K. S. S., Stewart, G. L., Lonergan, K. M., Kennett, J. Y., Becker-Santos, D. D., MacAulay, C. E., Lam, S., Brown, C. J., & Lam, W. L. (2011). Human Cancer Long Non-Coding RNA Transcriptomes. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025915>

Gibbins, D. J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*, 11(9). <https://doi.org/10.1038/ncb1929>

Gilad, S., Lithwick-Yanai, G., Barshack, I., Benjamin, S., Krivitsky, I., Edmonston, T. B., Bibbo, M., Thurm, C., Horowitz, L., Huang, Y., Feinmesser, M., Steve Hou, J., St. Cyr, B., Burnstein, I., Gibori, H., Dromi, N., Sanden, M., Kushnir, M., & Aharonov, R. (2012). Classification of the four main types of lung cancer using a miRNA-based diagnostic assay. *Journal of Molecular Diagnostics*, 14(5). <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.004>

Gilbert, W. (1986). Origin of life: The RNA world. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/319618a0>

Gong, J., Wang, J., Liu, T., Hu, J., & Zheng, J. (2018). LncRNA FEZF1-AS1 contributes to cell proliferation, migration and invasion by sponging miRNA-4443 in hepatocellular carcinoma. *Molecular Medicine Reports*. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.9585>

Greidinger, E. L., Zang, Y. J., Martinez, L., Jaimes, K., Nassiri, M., Bejarano, P., Barber, G. N., & Hoffman, R. W. (2007). Differential tissue targeting of autoimmunity manifestations by autoantigen-associated Y RNAs. *Arthritis and Rheumatism*. <https://doi.org/10.1002/art.22601>

Griffiths-Jones, S., Saini, H. K., Van Dongen, S., & Enright, A. J. (2008). miRBase: Tools for miRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(SUPPL. 1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm952>

Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Neuböck, R., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA websuite. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>

Guan, X., Lan, T., Wang, Y., Cui, Y., Duan, J., & Xu, H. (2023). CircKRT14 upregulates E2F3 by interacting with miRNA-1256 to act as an oncogenic factor in esophageal cancer. *Human and Experimental Toxicology*, 42. <https://doi.org/10.1177/09603271231155093>

Guo, Y., Vickers, K., Xiong, Y., Zhao, S., Sheng, Q., Zhang, P., Zhou, W., & Flynn, C. R. (2017). Comprehensive evaluation of extracellular small RNA isolation methods from serum in high throughput sequencing. *BMC Genomics*, 18(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-3470-z>

György, B., Hung, M. E., Breakefield, X. O., & Leonard, J. N. (2015). Therapeutic Applications of Extracellular Vesicles: Clinical Promise and Open Questions. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124630>

Haderk, F., Schulz, R., Iskar, M., Cid, L. L., Worst, T., Willmund, K. V., Schulz, A., Warnken, U., Seiler, J., Benner, A., Nessling, M., Zenz, T., Göbel, M., Dürig, J., Diederichs, S., Paggetti, J., Moussay, E., Stilgenbauer, S., Zapatka, M., ... Seiffert, M. (2017). Tumor-derived exosomes modulate PD-L1 expression in monocytes. *Science Immunology*. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aah5509>

Hafner, M., Landthaler, M., Burger, L., Khorshid, M., Hausser, J., Berninger, P., Rothballer, A., Ascano, M., Jungkamp, A. C., Munschauer, M., Ulrich, A., Wardle, G. S., Dewell, S., Zavolan, M., & Tuschl, T. (2010). PAR-CLIP - A method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins. *Journal of Visualized Experiments*, 41. <https://doi.org/10.3791/2034>

Hansen, T. B., Jensen, T. I., Clausen, B. H., Bramsen, J. B., Finsen, B., Damgaard, C. K., & Kjems, J. (2013). Natural RNA circles function as efficient miRNA sponges. *Nature*, 495(7441). <https://doi.org/10.1038/nature11993>

Hansen, T. B., Wiklund, E. D., Bramsen, J. B., Villadsen, S. B., Statham, A. L., Clark, S. J., & Kjems, J. (2011). MiRNA-dependent gene silencing involving Ago2-mediated cleavage of a circular antisense RNA. *EMBO Journal*, 30(21). <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.359>

Harrow, J., Frankish, A., Gonzalez, J. M., Tapanari, E., Diekhans, M., Kokocinski, F., Aken, B. L., Barrell, D., Zadissa, A., Searle, S., Barnes, I., Bignell, A., Boychenko, V., Hunt, T., Kay, M., Mukherjee, G., Rajan, J., Despacio-Reyes, G., Saunders, G., ... Hubbard, T. J. (2012). GENCODE: The reference human genome annotation for the ENCODE project. *Genome Research*, 22(9). <https://doi.org/10.1101/gr.135350.111>

Hart, R. P., & Goff, L. A. (2016). Long noncoding RNAs: Central to nervous system development. In *International Journal of Developmental Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2016.06.001>

Haug, B. H., Hald, Ø. H., Utnes, P., Roth, S. A., Løkke, C., Flægstad, T., & Einvik, C. (2015). Exosome-like extracellular vesicles from MYCN-amplified neuroblastoma cells contain oncogenic miRNAs. *Anticancer Research*.

Hayder, H., O'Brien, J., Nadeem, U., & Peng, C. (2018). MiRNAs: Crucial regulators of placental development. In *Reproduction* (Vol. 155, Issue 6). <https://doi.org/10.1530/REP-17-0603>

Hayostek, C. J., Shaw, E. G., Scheithauer, B., O'Fallon, J. R., Weiland, T. L., Schomberg, P. J., Kelly, P. J., & Hu, T. C. (1993). Astrocytomas of the cerebellum: A comparative clinicopathologic study of pilocytic and diffuse astrocytomas. *Cancer*, 72(3). [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930801\)72:3<856::AID-CNCR2820720335>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3<856::AID-CNCR2820720335>3.0.CO;2-K)

Hedlund, M., Nagaeva, O., Kargl, D., Baranov, V., & Mincheva-Nilsson, L. (2011). Thermal- and oxidative stress causes enhanced release of NKG2D ligand-bearing immunosuppressive exosomes in leukemia/lymphoma T and B cells. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016899>

Hernández-Hernández, A., López-Santaella, T., Torres-Caballero, A., Serrato, A., Torres-Flores, U., Montesinos-Valencia, D., Chico-Ponce de León, F., González-Carranza, V., Torres-García, S., Rebollar-Vega, R., De la Rosa-Velázquez, I. A., Ortiz, R., Pérez-Ramírez, M., García-Hernández, N., García-Méndez, A., & Arenas-Huertero, F. (2022). The Transcriptomic Landscape of Pediatric Astrocytoma. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20). <https://doi.org/10.3390/ijms232012696>

Hogan, D. J., Riordan, D. P., Gerber, A. P., Herschlag, D., & Brown, P. O. (2008). Diverse RNA-binding proteins interact with functionally related sets of RNAs, suggesting an extensive regulatory system. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0060255>

Hogg, J. R., & Collins, K. (2007). Human Y5 RNA specializes a Ro ribonucleoprotein for 5S ribosomal RNA quality control. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1603907>

Honegger, A., Schilling, D., Bastian, S., Sponagel, J., Kuryshev, V., Sülthmann, H., Scheffner, M., Hoppe-Seyler, K., & Hoppe-Seyler, F. (2015). Dependence of Intracellular and Exosomal miRNAs on Viral E6/E7 Oncogene Expression in HPV-positive Tumor Cells. *PLoS Pathogens*. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004712>

Hong, Y. G., Xin, C., Zheng, H., Huang, Z. P., Yang, Y., Zhou, J. D., Gao, X. H., Hao, L., Liu, Q. Z., Zhang, W., & Hao, L. Q. (2020). MiRNA-365a-3p regulates ADAM10-JAK-STAT signaling to suppress the growth and metastasis of colorectal cancer cells. *Journal of Cancer*, 11(12). <https://doi.org/10.7150/jca.42731>

Hoskins, A. A., & Moore, M. J. (2012). The spliceosome: A flexible, reversible macromolecular machine. In *Trends in Biochemical Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.02.009>

- Hu, H., Jiang, L., Kang, X., Zhang, L., & Zeng, S. (2023). Extracellular vesicles derived from lung cancer cells promote the progression of lung cancer by delivering miRNA-151a-5p. *Experimental Cell Research*, 425(1). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2023.113526>
- Hu, S., Song, Y., Zhou, Y., Jiao, Y., & Wang, S. (2022). MiRNA-1270 Suppresses the Malignant Progression of Breast Cancer via Targeting MMD2. *Journal of Healthcare Engineering*, 2022. <https://doi.org/10.1155/2022/3677720>
- Huang, C. R. L., Burns, K. H., & Boeke, J. D. (2012). Active Transposition in Genomes. *Annual Review of Genetics*. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-110711-155616>
- Huang, L., Zhang, H., Deng, D., Zhao, K., Liu, K., Hendrix, D. A., & Mathews, D. H. (2019). LinearFold: Linear-time approximate RNA folding by 5'-to-3' dynamic programming and beam search. *Bioinformatics*, 35(14). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz375>
- Huang, X., Yuan, T., Tschannen, M., Sun, Z., Jacob, H., Du, M., Liang, M., Dittmar, R. L., Liu, Y., Liang, M., Kohli, M., Thibodeau, S. N., Boardman, L., & Wang, L. (2013). Characterization of human plasma-derived exosomal RNAs by deep sequencing. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-319>
- Hussein, N. A. E. M., Kholy, Z. A. E., Anwar, M. M., Ahmad, M. A., & Ahmad, S. M. (2017). Plasma miRNA-22-3p, miRNA-642b-3p and miRNA-885-5p as diagnostic biomarkers for pancreatic cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. <https://doi.org/10.1007/s00432-016-2248-7>
- Illana, J. C. (2014). Biología molecular y estructura del ADN. *Anales de Química de La RSEQ*, 110(3).
- Iyer, D. N., Wan, T. M. H., Man, J. H. W., Sin, R. W. Y., Li, X., Lo, O. S. H., Foo, D. C. C., Pang, R. W. C., Law, W. L., & Ng, L. (2020). Small RNA profiling of piRNAs in colorectal cancer identifies consistent overexpression of piR-24000 that correlates clinically with an aggressive disease phenotype. *Cancers*, 12(1). <https://doi.org/10.3390/cancers12010188>
- Iyer, M. K., Niknafs, Y. S., Malik, R., Singhal, U., Sahu, A., Hosono, Y., Barrette, T. R., Prensner, J. R., Evans, J. R., Zhao, S., Poliakov, A., Cao, X., Dhanasekaran, S. M., Wu, Y. M., Robinson, D. R., Beer, D. G., Feng, F. Y., Iyer, H. K., & Chinnaiyan, A. M. (2015). The landscape of long noncoding RNAs in the human transcriptome. *Nature Genetics*, 47(3). <https://doi.org/10.1038/ng.3192>
- Jarvinen, L., Badri, L., Wettlaufer, S., Ohtsuka, T., Standiford, T. J., Toews, G. B., Pinsky, D. J., Peters-Golden, M., & Lama, V. N. (2008). Lung Resident Mesenchymal Stem Cells Isolated from Human Lung Allografts Inhibit T Cell Proliferation via a Soluble Mediator. *The Journal of Immunology*. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.6.4389>
- Jeck, W. R., & Sharpless, N. E. (2014). Detecting and characterizing circular RNAs. In *Nature Biotechnology* (Vol. 32, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/nbt.2890>

Jiang, J., Zheng, M., Zhang, M., Yang, X., Li, L., Wang, S. sha, Wu, J. shun, Yu, X. hua, Wu, J. biao, Pang, X., Tang, Y. jie, Tang, Y. ling, & Liang, X. hua. (2019). PRRX1 Regulates Cellular Phenotype Plasticity and Dormancy of Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Through miRNA-642b-3p. *Neoplasia* (United States), 21(2), 216–229. <https://doi.org/10.1016/j.neo.2018.12.001>

Jin, W., Zhang, H., Li, M., & Lin, S. (2023). Long Noncoding RNA Regulator of Reprogramming Regulates Cell Growth, Metastasis, and Cisplatin Resistance in Gastric Cancer via miRNA-519d-3p/HMGA2 Axis. *Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals*, 38(2). <https://doi.org/10.1089/cbr.2019.3525>

Jingyang, Z. (2022). MiRNA-320b Inhibits Pancreatic Cancer Cell Proliferation by Targeting FOXM1. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, 22(8). <https://doi.org/10.2174/18734316mtewsmdidy>

John, B., Enright, A. J., Aravin, A., Tuschl, T., Sander, C., & Marks, D. S. (2004). Human miRNA targets. *PLoS Biology*. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020363>

Jurka, J. (2004). Evolutionary impact of human Alu repetitive elements. In *Current Opinion in Genetics and Development* (Vol. 14, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.gde.2004.08.008>

Kadakkuzha, B. M., Liu, X. A., McCrate, J., Shankar, G., Rizzo, V., Afinogenova, A., Young, B., Fallahi, M., Carvalloza, A. C., Raveendra, B., & Puthanveetil, S. V. (2015). Transcriptome analyses of adult mouse brain reveal enrichment of lncRNAs in specific brain regions and neuronal populations. *Frontiers in Cellular Neuroscience*. <https://doi.org/10.3389/fncel.2015.00063>

Kapranov, P., St Laurent, G., Raz, T., Ozsolak, F., Reynolds, C. P., Sorensen, P. H. B., Reaman, G., Milos, P., Arceci, R. J., Thompson, J. F., & Triche, T. J. (2010). The majority of total nuclear-encoded non-ribosomal RNA in a human cell is “dark matter” un-annotated RNA. *BMC Biology*. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-8-149>

Karlsson, O., & Baccarelli, A. A. (2016). Environmental Health and Long Non-coding RNAs. In *Current environmental health reports* (Vol. 3, Issue 3). <https://doi.org/10.1007/s40572-016-0092-1>

Kaur, D., Gupta, A. K., Kumari, V., Sharma, R., Bhattacharya, A., & Bhattacharya, S. (2012). Computational prediction and validation of C/D, H/ACA and Eh_U3 snoRNAs of *Entamoeba histolytica*. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-390>

Keller, S., Ridinger, J., Rupp, A. K., Janssen, J. W. G., & Altevogt, P. (2011). Body fluid derived exosomes as a novel template for clinical diagnostics. *Journal of Translational Medicine*, 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-86>

Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D. R., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., Van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E. S., & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying

complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>

Kim, V. N. (2006). Small RNAs just got bigger: Piwi-interacting RNAs (piRNAs) in mammalian testes. In *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1456106>

Kling, T., Wenger, A., Lunavat, T. R., Jang, S. C., Rydenhag, B., Lötvall, J., Pollard, S. M., Danielsson, A., & Carén, H. (2017). Pediatric brain tumor cells release exosomes with a miRNA repertoire that differs from exosomes secreted by normal cells. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21621>

Kogure, T., Lin, W. L., Yan, I. K., Braconi, C., & Patel, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated miRNANA transfer: A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*. <https://doi.org/10.1002/hep.24504>

Koo, K. H., & Kwon, H. (2018). MiRNANA miRNA-4779 suppresses tumor growth by inducing apoptosis and cell cycle arrest through direct targeting of PAK2 and CCND3 article. *Cell Death and Disease*, 9(2). <https://doi.org/10.1038/s41419-017-0100-x>

Korshunov, A., Meyer, J., Capper, D., Christians, A., Remke, M., Witt, H., Pfister, S., von Deimling, A., & Hartmann, C. (2009). Combined molecular analysis of BRAF and IDH1 distinguishes pilocytic astrocytoma from diffuse astrocytoma. *Acta Neuropathologica*. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0550-z>

Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of miRNAs in living cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.107821>

Kourembanas, S. (2015). Exosomes: Vehicles of Intercellular Signalling, Biomarkers, and Vectors of Cell Therapy. *Annual Review of Physiology*. <https://doi.org/10.1146/annurev-physiol-021014-071641>

Kowalski, M. P., & Krude, T. (2015). Functional roles of non-coding Y RNAs. In *International Journal of Biochemistry and Cell Biology* (Vol. 66, pp. 20–29). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2015.07.003>

Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). MiRBase: From miRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, 47(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>

Krek, A., Grün, D., Poy, M. N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E. J., MacMenamin, P., Da Piedade, I., Gunsalus, K. C., Stoffel, M., & Rajewsky, N. (2005). Combinatorial miRNANA target predictions. *Nature Genetics*. <https://doi.org/10.1038/ng1536>

Krishnan, A. R., Korrapati, A., Zou, A. E., Qu, Y., Wang, X. Q., Califano, J. A., Wang-Rodriguez, J., Lippman, S. M., Hovell, M. F., & Ongkeko, W. M. (2017). Smoking status regulates a novel panel of PIWI-interacting RNAs in head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*, 65. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.12.022>

Labbé, J. C., Hekimi, S., & Rokeach, L. A. (1999). The levels of the RoRNP-associated Y RNA are dependent upon the presence of ROP-1, the *Caenorhabditis elegans* Ro60 protein. *Genetics*.

Lässer, C., Seyed Alikhani, V., Ekström, K., Eldh, M., Torregrosa Paredes, P., Bossios, A., Sjöstrand, M., Gabrielsson, S., Lötval, J., & Valadi, H. (2011). Human saliva, plasma and breast milk exosomes contain RNA: Uptake by macrophages. *Journal of Translational Medicine*. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-9-9>

Law, P. T. Y., Qin, H., Ching, A. K. K., Lai, K. P., Co, N. N., He, M., Lung, R. W. M., Chan, A. W. H., Chan, T. F., & Wong, N. (2013). Deep sequencing of small RNA transcriptome reveals novel non-coding RNAs in hepatocellular carcinoma. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.01.032>

Lerman, D. N., & Feder, M. E. (2005). Naturally occurring transposable elements disrupt hsp70 promoter function in *Drosophila melanogaster*. *Molecular Biology and Evolution*. <https://doi.org/10.1093/molbev/msi063>

Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005a). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are miRNA targets. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>

Lewis, B. P., Burge, C. B., & Bartel, D. P. (2005b). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are miRNA targets. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2004.12.035>

Lewis, B. P., Shih, I. H., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P., & Burge, C. B. (2003). Prediction of Mammalian miRNA Targets. *Cell*. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)01018-3](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(03)01018-3)

Li, J., Ma, W., Zeng, P., Wang, J., Geng, B., Yang, J., & Cui, Q. (2014). LncTar: A tool for predicting the RNA targets of long noncoding RNAs. *Briefings in Bioinformatics*, 16(5), 806–812. <https://doi.org/10.1093/bib/bbu048>

Li, J., Tian, H., Yang, J., & Gong, Z. (2016). Long Noncoding RNAs Regulate Cell Growth, Proliferation, and Apoptosis. *DNA and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1089/dna.2015.3187>

Li, J. X., Wang, J. J., Deng, Z. F., Zheng, H., Yang, C. M., Yuan, Y., Yang, C., Gu, F. F., Wu, W. Q., Qiao, G. L., & Ma, L. J. (2022). Circular RNA circ_0008934 promotes hepatocellular carcinoma growth and metastasis through modulating miRNA-1305/TMTC3 axis. *Human Cell*, 35(2). <https://doi.org/10.1007/s13577-021-00657-2>

Li, X., Luo, F., Li, Q., Xu, M., Feng, D., Zhang, G., & Wu, W. (2011). Identification of new aberrantly expressed miRNAs in intestinal-type gastric cancer and its clinical significance. *Oncology Reports*. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1437>

Li, Y., Sahni, N., Pancsa, R., McGrail, D. J., Xu, J., Hua, X., Coulombe-Huntington, J., Ryan, M., Tychon, B., Sudhakar, D., Hu, L., Tyers, M., Jiang, X., Lin, S. Y., Babu, M. M., & Yi,

S. (2017). Revealing the Determinants of Widespread Alternative Splicing Perturbation in Cancer. *Cell Reports*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.09.071>

Li, Y., Wu, X., Gao, H., Jin, J. M., Li, A. X., Kim, Y. S., Pal, S. K., Nelson, R. A., Lau, C. M., Guo, C., Mu, B., Wang, J., Wang, F., Wang, J., Zhao, Y., Chen, W., Rossi, J. J., Weiss, L. M., & Wu, H. (2015). Piwi-interacting RNAs (piRNAs) are dysregulated in renal cell carcinoma and associated with tumor metastasis and cancer-specific survival. *Molecular Medicine*, 21. <https://doi.org/10.2119/molmed.2014.00203>

Li, Z., & Nagy, P. D. (2011). Diverse roles of host RNA-binding proteins in RNA virus replication. In *RNA Biology* (Vol. 8, Issue 2). <https://doi.org/10.4161/rna.8.2.15391>

Li, Z. Y., Zhang, Z. Z., Bi, H., Zhang, Q. Di, Zhang, S. J., Zhou, L., Zhu, X. Q., & Zhou, J. (2019). miRNA 4500 suppresses tumor progression in non small cell lung cancer by regulating STAT3. *Molecular Medicine Reports*, 20(6), 4973–4983. <https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10737>

Liang, H., Li, X., Wang, L., Yu, S., Xu, Z., Gu, Y., Pan, Z., Li, T., Hu, M., Cui, H., Liu, X., Zhang, Y., Xu, C., Guo, R., Lu, Y., Yang, B., & Shan, H. (2013). miRNAs contribute to promyelocyte apoptosis in As 2 O 3 -treated APL cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*. <https://doi.org/10.1159/000356615>

Lipovich, L., Tarca, A. L., Cai, J., Jia, H., Chugani, H. T., Sterner, K. N., Grossman, L. I., Uddin, M., Hof, P. R., Sherwood, C. C., Kuzawa, C. W., Goodman, M., & Wildman, D. E. (2014). Developmental changes in the transcriptome of human cerebral cortex tissue: Long noncoding RNA transcripts. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/bhs414>

Liu, H., Chen, Y., Zhou, L., Jiang, X., & Zhou, X. (2022). MiRNANA-642b-3p functions as an oncomiR in gastric cancer by down-regulating the CUB and sushi multiple domains protein 1/smad axis. *Bioengineered*, 13(4). <https://doi.org/10.1080/21655979.2022.2056813>

Liu, J. K., Liu, H. F., Ding, Y., & Gao, G. D. (2018). Predictive value of miRNA let-7a expression for efficacy and prognosis of radiotherapy in patients with lung cancer brain metastasis A case–control study. *Medicine (United States)*, 97(44). <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000012847>

Liu, J., Valencia-Sanchez, M. A., Hannon, G. J., & Parker, R. (2005). miRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nature Cell Biology*, 7(7). <https://doi.org/10.1038/ncb1274>

Liu, N., Jiang, N., Guo, R., Jiang, W., He, Q. M., Xu, Y. F., Li, Y. Q., Tang, L. L., Mao, Y. P., Sun, Y., & Ma, J. (2013). MiRNA-451 inhibits cell growth and invasion by targeting MIF and is associated with survival in nasopharyngeal carcinoma. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-123>

Liu, X., Zheng, J., Xue, Y., Yu, H., Gong, W., Wang, P., Li, Z., & Liu, Y. (2018). PIWIL3/OIP5-AS1/miRNA-367-3p/CEBPA feedback loop regulates the biological behavior of glioma cells. *Theranostics*. <https://doi.org/10.7150/thno.21740>

Liu, Z. Y., Yang, L., & Chang, H. Y. (2018). Clinicopathologic and prognostic relevance of miRNA-1256 in colorectal cancer: A preliminary clinical study. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.26355/eurrev-201811-16391>

Lötvall, J., Hill, A. F., Hochberg, F., Buzás, E. I., Vizio, D. Di, Gardiner, C., Ghossein, Y. S., Kurochkin, I. V., Mathivanan, S., Quesenberry, P., Sahoo, S., Tahara, H., Wauben, M. H., Witwer, K. W., & Théry, C. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: A position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. In *Journal of Extracellular Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v3.26913>

Lotvall, J., & Valadi, H. (2007). Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. In *Cell adhesion & migration*. <https://doi.org/10.4161/cam.1.3.5114>

Louis, D. N., Perry, A., Wesseling, P., Brat, D. J., Cree, I. A., Figarella-Branger, D., Hawkins, C., Ng, H. K., Pfister, S. M., Reifenberger, G., Soffietti, R., von Deimling, A., & Ellison, D. W. (2021). The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Neuro-Oncology*, 23(8). <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>

Lu, W., Tang, Y., Wu, H., Huang, H., Fu, Q., Qiu, J., & Li, H. (2019). Predicting RNA secondary structure via adaptive deep recurrent neural networks with energy-based filter. *BMC Bioinformatics*, 20. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-3258-7>

Lyngsø, R. B., & Pedersen, C. N. S. (2000). RNA pseudoknot prediction in energy-based models. *Journal of Computational Biology*, 7(3–4). <https://doi.org/10.1089/106652700750050862>

Ma, L., Li, A., Zou, D., Xu, X., Xia, L., Yu, J., Bajic, V. B., & Zhang, Z. (2015). LncRNAWiki: Harnessing community knowledge in collaborative curation of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Research*, 43(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gku1167>

Mahoney, B. P., Raghunand, N., Baggett, B., & Gillies, R. J. (2003). Tumor acidity, ion trapping and chemotherapeutics: I. Acid pH affects the distribution of chemotherapeutic agents in vitro. *Biochemical Pharmacology*. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00467-2](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00467-2)

Maraia, R., Sakulich, A. L., Brinkmann, E., & Green, E. D. (1996). Gene encoding human Ro-associated autoantigen Y5 RNA. *Nucleic Acids Research*, 24(18). <https://doi.org/10.1093/nar/24.18.3552>

Marshall, O. J. (2004). PerlPrimer: Cross-platform, graphical primer design for standard, bisulphite and real-time PCR. *Bioinformatics*, 20(15). <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bth254>

Matsuda, R., Enokida, H., Chiyomaru, T., Kikkawa, N., Sugimoto, T., Kawakami, K., Tatarano, S., Yoshino, H., Toki, K., Uchida, Y., Kawahara, K., Nishiyama, K., Seki, N., & Nakagawa, M. (2011). LY6K is a novel molecular target in bladder cancer on basis of

integrate genome-wide profiling. *British Journal of Cancer*.
<https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605990>

Mcmahon, M., Contreras, A., & Ruggero, D. (2015). Small RNAs with big implications: New insights into H/ACA snoRNA function and their role in human disease. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*. <https://doi.org/10.1002/wrna.1266>

Meerson, A., & Yehuda, H. (2016). Leptin and insulin up-regulate miRNA-4443 to suppress NCOA1 and TRAF4, and decrease the invasiveness of human colon cancer cells. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-016-2938-1>

Meldolesi, J. (2018). Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication. In *Current Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.059>

Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S. D., Gregersen, L. H., Munschauer, M., Loewer, A., Ziebold, U., Landthaler, M., Kocks, C., Le Noble, F., & Rajewsky, N. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature*, 495(7441).
<https://doi.org/10.1038/nature11928>

Mercer, T. R., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2009). Long non-coding RNAs: Insights into functions. In *Nature Reviews Genetics*. <https://doi.org/10.1038/nrg2521>

Mercer, T. R., Dinger, M. E., Sunkin, S. M., Mehler, M. F., & Mattick, J. S. (2008). Specific expression of long noncoding RNAs in the mouse brain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0706729105>

Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. In *Nature Structural and Molecular Biology*.
<https://doi.org/10.1038/nsmb.2480>

Milligan, M. J., & Lipovich, L. (2015). Pseudogene-derived lncRNAs: Emerging regulators of gene expression. In *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00476>

Mittal, N., Roy, N., Babu, M. M., & Janga, S. C. (2009). Dissecting the expression dynamics of RNA-binding proteins in posttranscriptional regulatory networks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(48).
<https://doi.org/10.1073/pnas.0906940106>

Mizrak, A., Bolukbasi, M. F., Ozdener, G. B., Brenner, G. J., Madlener, S., Erkan, E. P., Ströbel, T., Breakefield, X. O., & Saydam, O. (2013). Genetically engineered microvesicles carrying suicide mRNA/protein inhibit schwannoma tumor growth. *Molecular Therapy*.
<https://doi.org/10.1038/mt.2012.161>

Moenne, A., Camier, S., Anderson, G., Margottin, F., Beggs, J., & Sentenac, A. (1990). The U6 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is transcribed by RNA polymerase C (III) in vivo and in vitro. *The EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1990.tb08105.x>

Morel, O., Toti, F., Hugel, B., Bakouboula, B., Camoin-Jau, L., Dignat-George, F., & Freyssinet, J. M. (2006). Procoagulant microparticles: Disrupting the vascular homeostasis equation? In *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000246775.14471.26>

Mouliere, F., Chandrananda, D., Piskorz, A. M., Moore, E. K., Morris, J., Ahlborn, L. B., Mair, R., Goranova, T., Marass, F., Heider, K., Wan, J. C. M., Supernat, A., Hudcová, I., Gounaris, I., Ros, S., Jimenez-Linan, M., Garcia-Corbacho, J., Patel, K., Østrup, O., ... Rosenfeld, N. (2018). Enhanced detection of circulating tumor DNA by fragment size analysis. *Science Translational Medicine*, 10(466). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat4921>

Mulcahy, L. A., Pink, R. C., & Carter, D. R. F. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. In *Journal of Extracellular Vesicles* (Vol. 3, Issue 1). <https://doi.org/10.3402/jev.v3.24641>

Mulholland, P. J., Fiegler, H., Mazzanti, C., Gorman, P., Sasieni, P., Adams, J., Jones, T. A., Babbage, J. W., Vatcheva, R., Ichimura, K., East, P., Poullikas, C., Collins, V. P., Carter, N. P., Tomlinson, I. P. M., & Sheer, D. (2006). Genomic profiling identifies discrete deletions associated with translocations in glioblastoma multiforme. *Cell Cycle*, 5(7). <https://doi.org/10.4161/cc.5.7.2631>

Muppirala, U. K. (2013). Computational Tools for Investigating RNA-Protein Interaction Partners. *Journal of Computer Science & Systems Biology*. <https://doi.org/10.4172/jcsb.1000115>

Muppirala, U. K., Honavar, V. G., & Dobbs, D. (2011). Predicting RNA-Protein Interactions Using Only Sequence Information. *BMC Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-489>

Murphy, K., & Weaver, C. (2018). Janeway Immunologie. In *Janeway Immunologie*. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-56004-4>

Nacher, J. C., & Araki, N. (2010). Structural characterization and modeling of ncRNA-protein interactions. *BioSystems*, 101(1). <https://doi.org/10.1016/j.biosystems.2010.02.005>

Ni, X. F., Zhao, L. H., Li, G., Hou, M., Su, M., Zou, C. L., & Deng, X. (2018). MiRNANA-548-3p and miRNANA-576-5p enhance the migration and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells via NR1P1 down-regulation. *Neoplasma*. https://doi.org/10.4149/neo_2018_171206N803

Ning, S., Zhang, J., Wang, P., Zhi, H., Wang, J., Liu, Y., Gao, Y., Guo, M., Yue, M., Wang, L., & Li, X. (2016). Lnc2Cancer: A manually curated database of experimentally supported lncRNAs associated with various human cancers. *Nucleic Acids Research*, 44(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1094>

Nishi, K., Takahashi, T., Suzawa, M., Miyakawa, T., Nagasawa, T., Ming, Y., Tanokura, M., & Ui-Tei, K. (2015). Control of the localization and function of a miRNA silencing

component TNRC6A by Argonaute protein. *Nucleic Acids Research*, 43(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1026>

Nishisho, T., Hata, K., Nakanishi, M., Morita, Y., Sun-Wada, G. H., Wada, Y., Yasui, N., & Yoneda, T. (2011). The $\alpha 3$ isoform vacuolar type H $^{+}$ -ATPase promotes distant metastasis in the mouse B16 melanoma cells. *Molecular Cancer Research*. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-10-0449>

Niwińska, A., Murawska, M., & Pogoda, K. (2009). Breast cancer brain metastases: Differences in survival depending on biological subtype, RPA RTOG prognostic class and systemic treatment after whole-brain radiotherapy (WBRT). *Annals of Oncology*, 21(5). <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp407>

Noerholm, M., Balaj, L., Limperg, T., Salehi, A., Zhu, L. D., Hochberg, F. H., Breakefield, X. O., Carter, B. S., & Skog, J. (2012). RNA expression patterns in serum microvesicles from patients with glioblastoma multiforme and controls. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-12-22>

Nolte 'T Hoen, E. N. M., Buermans, H. P. J., Waasdorp, M., Stoorvogel, W., Wauben, M. H. M., & 'T Hoen, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gks658>

Obbard, D. J., Gordon, K. H. J., Buck, A. H., & Jiggins, F. M. (2009). The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. <https://doi.org/10.1098/rstb.2008.0168>

Ogryzko, V. V. (2008). Erwin Schroedinger, Francis Crick and epigenetic stability. *Biology Direct*, 3. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-3-15>

Ohno, S. I., Takanashi, M., Sudo, K., Ueda, S., Ishikawa, A., Matsuyama, N., Fujita, K., Mizutani, T., Ohgi, T., Ochiya, T., Gotoh, N., & Kuroda, M. (2013). Systemically injected exosomes targeted to EGFR deliver antitumor miRNAs to breast cancer cells. *Molecular Therapy*. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.180>

Ossandon, M. R., Agrawal, L., Bernhard, E. J., Conley, B. A., Dey, S. M., Divi, R. L., Guan, P., Lively, T. G., McKee, T. C., Sorg, B. S., & Tricoli, J. V. (2018). Circulating tumor DNA assays in clinical cancer research. *Journal of the National Cancer Institute*, 110(9). <https://doi.org/10.1093/jnci/djy105>

Ostertag, E. M., & Kazazian, J. (2001). Biology of mammalian L1 retrotransposons. In *Annual Review of Genetics* (Vol. 35). <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.091032>

Palucka, K., & Banchereau, J. (2014). Cancer immunotherapy via dendritic cells. In *Interaction of Immune and Cancer Cells*. https://doi.org/10.1007/978-3-7091-1300-4_4

Paraskevopoulou, M. D., Georgakilas, G., Kostoulas, N., Vlachos, I. S., Vergoulis, T., Reczko, M., Filippidis, C., Dalamagas, T., & Hatzigeorgiou, A. G. (2013). DIANA-microT web server v5.0: service integration into miRNA functional analysis workflows. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt393>

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., & Fais, S. (2009a). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49). <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>

Parolini, I., Federici, C., Raggi, C., Lugini, L., Palleschi, S., De Milito, A., Coscia, C., Iessi, E., Logozzi, M., Molinari, A., Colone, M., Tatti, M., Sargiacomo, M., & Fais, S. (2009b). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.041152>

Pasqualini, L., Bu, H., Puhr, M., Narisu, N., Rainer, J., Schlick, B., Schäfer, G., Angelova, M., Trajanoski, Z., Börno, S. T., Schweiger, M. R., Fuchsberger, C., & Klocker, H. (2015). miRNA-22 and miRNA-29a are members of the androgen receptor cistrome modulating LAMC1 and Mcl-1 in prostate cancer. *Molecular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1358>

Patel, N., Garikapati, K. R., Makani, V. K. K., Pal, S., Vangara, N., & Bhadra, M. P. (2023). miRNA let-7a inhibits invasion, migration, anchorage-independent growth by suppressing EZH2 and promotes mesenchymal to epithelial transition in MDAMB-231. *Gene Reports*, 31. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2023.101752>

Pegtel, D. M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D. A., Van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Lindenberg, J. L., De Gruijl, T. D., Würdinger, T., & Middeldorp, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0914843107>

Peng, L., Song, L., Liu, C., Lv, X., Li, X., Jie, J., Zhao, D., & Li, D. (2016). piR-55490 inhibits the growth of lung carcinoma by suppressing mTOR signaling. *Tumor Biology*. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4056-0>

Perreault, J., Noël, J. F., Brière, F., Cousineau, B., Lucier, J. F., Perreault, J. P., & Boire, G. (2005). Retropseudogenes derived from the human Ro/SS-A autoantigen-associated hY RNAs. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gki504>

Pfister, S., Janzarik, W. G., Remke, M., Ernst, A., Werft, W., Becker, N., Toedt, G., Wittmann, A., Kratz, C., Olbrich, H., Ahmadi, R., Thieme, B., Joos, S., Radlwimmer, B., Kulozik, A., Pietsch, T., Herold-Mende, C., Gnekow, A., Reifenberger, G., ... Lichter, P. (2008). BRAF gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. *Journal of Clinical Investigation*, 118(5). <https://doi.org/10.1172/JCI33656>

Pichler, M., Ress, A. L., Winter, E., Stiegelbauer, V., Karbiener, M., Schwarzenbacher, D., Scheideler, M., Ivan, C., Jahn, S. W., Kiesslich, T., Gerger, A., Bauernhofer, T., Calin, G. A., & Hoefler, G. (2014). MiRNA-200a regulates epithelial to mesenchymal transition-related gene expression and determines prognosis in colorectal cancer patients. *British Journal of Cancer*, 110(6). <https://doi.org/10.1038/bjc.2014.51>

Pradere, J. P., Dapito, D. H., & Schwabe, R. F. (2014). The Yin and Yang of Toll-like receptors in cancer. In *Oncogene*. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.302>

Pruijn, G. J. M., Wingens, P. A. E. T. M., Peters, S. L. M., Thijssen, J. P. H., & van Venrooij, W. J. (1993). Ro RNP associated Y RNAs are highly conserved among mammals. *BBA - Gene Structure and Expression*. [https://doi.org/10.1016/0167-4781\(93\)90006-Y](https://doi.org/10.1016/0167-4781(93)90006-Y)

Qureshi, I. A., & Mehler, M. F. (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. In *Nature Reviews Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nrn3234>

Ramkissoon, L. A., Horowitz, P. M., Craig, J. M., Ramkissoon, S. H., Rich, B. E., Schumacher, S. E., McKenna, A., Lawrence, M. S., Bergthold, G., Brastianos, P. K., Tabak, B., Ducar, M. D., Van Hummelen, P., MacConaill, L. E., Pouissant-Young, T., Cho, Y. J., Taha, H., Mahmoud, M., Bowers, D. C., ... Ligon, K. L. (2013). Genomic analysis of diffuse pediatric low-grade gliomas identifies recurrent oncogenic truncating rearrangements in the transcription factor MYBL1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(20). <https://doi.org/10.1073/pnas.1300252110>

Ramsay, R. G., & Gonda, T. J. (2008). MYB function in normal and cancer cells. In *Nature Reviews Cancer* (Vol. 8, Issue 7). <https://doi.org/10.1038/nrc2439>

Ransohoff, J. D., Wei, Y., & Khavari, P. A. (2018). The functions and unique features of long intergenic non-coding RNA. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 19, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.104>

Rashid, F., Shah, A., & Shan, G. (2016). Long Non-coding RNAs in the Cytoplasm. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.005>

Ratajczak, J., Wysoczynski, M., Hayek, F., Janowska-Wieczorek, A., & Ratajczak, M. Z. (2006). Membrane-derived microvesicles: Important and underappreciated mediators of cell-to-cell communication. In *Leukemia*. <https://doi.org/10.1038/sj.leu.2404296>

Riley, J. L. (2009). PD-1 signaling in primary T cells. In *Immunological Reviews*. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2009.00767.x>

Rilling, J. K. (2014). Comparative primate neurobiology and the evolution of brain language systems. In *Current Opinion in Neurobiology* (Vol. 28). <https://doi.org/10.1016/j.conb.2014.04.002>

Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2020). Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions. In *Annual Review of Biochemistry* (Vol. 89). <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012708>

Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>

Robbins, P. D., & Morelli, A. E. (2014). Regulation of immune responses by extracellular vesicles. In *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri3622>

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L., & Bradley, A. (2004). Identification of mammalian miRNAs host genes and transcription units. *Genome Research*. <https://doi.org/10.1101/gr.2722704>

Romero, J. P., Muniategui, A., De Miguel, F. J., Aramburu, A., Montuenga, L., Pio, R., & Rubio, A. (2016). EventPointer: An effective identification of alternative splicing events using junction arrays. *BMC Genomics*, 17(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2816-x>

Roth, P., Wischhusen, J., Happold, C., Chandran, P. A., Hofer, S., Eisele, G., Weller, M., & Keller, A. (2011). A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *Journal of Neurochemistry*. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07307.x>

Ruiz Esparza-Garrido, R., Rodríguez-Corona, J. M., López-Aguilar, J. E., Rodríguez-Flrido, M. A., Velázquez-Wong, A. C., Viedma-Rodríguez, R., Salamanca-Gómez, F., & Velázquez-Flores, M. Á. (2017). Differentially Expressed Long Non-Coding RNAs Were Predicted to Be Involved in the Control of Signalling Pathways in Pediatric Astrocytoma. *Molecular Neurobiology*, 54(8), 6598–6608. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0123-9>

Safaei, R., Larson, B. J., Cheng, T. C., Gibson, M. A., Otani, S., Naerdemann, W., & Howell, S. B. (2005). Abnormal lysosomal trafficking and enhanced exosomal export of cisplatin in drug-resistant human ovarian carcinoma cells. *Molecular Cancer Therapeutics*. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-05-0102>

Saha, B. (2017). Fast & space-efficient approximations of language edit distance and rna folding: An amnesic dynamic programming approach. *Annual Symposium on Foundations of Computer Science - Proceedings*, 2017-October. <https://doi.org/10.1109/FOCS.2017.35>

Salameh, A., Lee, A. K., Cardó-Vila, M., Nunes, D. N., Efstathiou, E., Staquicini, F. I., Dobroff, A. S., Marchiò, S., Navone, N. M., Hosoya, H., Lauer, R. C., Wen, S., Salmeron, C. C., Hoang, A., Newsham, I., Lima, L. A., Carraro, D. M., Oliviero, S., Kolonin, M. G., ... Arap, W. (2015). PRUNE2 is a human prostate cancer suppressor regulated by the intronic long noncoding RNA PCA3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.1507882112>

SantaLucia Jr., J., & Turner, D. H. (1997). Measuring the thermodynamics of RNA secondary structure formation. *Biopolymers*, 44, 309–319.

http://mddb.wiley.com/db/mdresolve.cgi?issn=0006-3525&volume=44&issue=3&first*page=309
<http://www.interscience.wiley.com/jpages/0006-3525>

SantaLucia, J. (1998). A unified view of polymer, dumbbell, and oligonucleotide DNA nearest-neighbor thermodynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(4). <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1460>

Sato, S., & Weaver, A. M. (2018). Extracellular vesicles: Important collaborators in cancer progression. In *Essays in Biochemistry*. <https://doi.org/10.1042/EBC20170080>

Schonlau, M., & Zou, R. Y. (2020). The random forest algorithm for statistical learning. *Stata Journal*, 20(1). <https://doi.org/10.1177/1536867X20909688>

Schörnig, M., & Taverna, E. (2021). A Closer Look to the Evolution of Neurons in Humans and Apes Using Stem-Cell-Derived Model Systems. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.661113>

Scott, M. S., & Ono, M. (2011). From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie*, 93(11), 1987–1992. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.05.026>

Shen, F., Gan, X. X., Deng, X. Y., Feng, J. H., Cai, W. S., Shen, L., Xiao, H. Q., & Xu, B. (2020). miRNA-3690 promotes cell proliferation and cell cycle progression by altering DKK3 expression in human thyroid cancer. *Oncology Letters*, 20(5). <https://doi.org/10.3892/ol.2020.12086>

Shen, J., Zhang, J., Luo, X., Zhu, W., Yu, K., Chen, K., Li, Y., & Jiang, H. (2007). Predicting protein-protein interactions based only on sequences information. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(11). <https://doi.org/10.1073/pnas.0607879104>

Shtam, T. A., Kovalev, R. A., Varfolomeeva, E. Y., Makarov, E. M., Kil, Y. V., & Filatov, M. V. (2013). Exosomes are natural carriers of exogenous siRNA to human cells in vitro. *Cell Communication and Signaling*. <https://doi.org/10.1186/1478-811X-11-88>

Simon, S., Roy, D., & Schindler, M. (1994). Intracellular pH and the control of multidrug resistance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.3.1128>

Singh, G., Roy, J., Rout, P., & Mallick, B. (2018). Genome-wide profiling of the PIWI-interacting RNA-mRNA regulatory networks in epithelial ovarian cancers. *PLoS ONE*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0190485>

Singh, J., Hanson, J., Paliwal, K., & Zhou, Y. (2019). RNA secondary structure prediction using an ensemble of two-dimensional deep neural networks and transfer learning. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13395-9>

Skog, J., Würdinger, T., van Rijn, S., Meijer, D. H., Gainche, L., Curry, W. T., Carter, B. S., Krichevsky, A. M., & Breakefield, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb1800>

Soheilifar, M. H., Pornour, M., Saidijam, M., Najafi, R., Jalilian, F. A., Neghab, H. K., & Amini, R. (2022). miRNA-1290 contributes to oncogenesis and angiogenesis via targeting of THBS1, DKK3 and, SCAI. *BioImpacts*, 12(4). <https://doi.org/10.34172/bi.2021.23571>

Solé, C., Tramonti, D., Schramm, M., Goicoechea, I., Armesto, M., Hernandez, L. I., Manterola, L., Fernandez-Mercado, M., Mujika, K., Tuneu, A., Jaka, A., Tellaetxe, M., Friedländer, M. R., Estivill, X., Piazza, P., Ortiz-Romero, P. L., Middleton, M. R., & Lawrie, C. H. (2019). The circulating transcriptome as a source of biomarkers for melanoma. *Cancers*, 11(1). <https://doi.org/10.3390/cancers11010070>

Song, L., Turkson, J., Karras, J. G., Jove, R., & Haura, E. B. (2003). Activation of Stat3 by receptor tyrosine kinases and cytokines regulates survival in human non-small cell carcinoma cells. *Oncogene*, 22(27). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206479>

Song, T., Xia, W., Shao, N., Zhang, X., Wang, C., Wu, Y., Dong, J., Cai, W., & Li, H. (2010). Differential miRNA expression profiles in bladder urothelial carcinomas. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*.

Spinelli, C., Adnani, L., Choi, D., & Rak, J. (2019). Extracellular vesicles as conduits of non-coding RNA emission and intercellular transfer in brain tumors. In *Non-coding RNA*. <https://doi.org/10.3390/ncrna5010001>

Staněk, D., Rader, S. D., Klingauf, M., & Neugebauer, K. M. (2003). Targeting of U4/U6 small nuclear RNP assembly factor SART3/p110 to Cajal bodies. *Journal of Cell Biology*. <https://doi.org/10.1083/jcb.200210087>

Stein, A. J., Fuchs, G., Fu, C., Wolin, S. L., & Reinisch, K. M. (2005). Structural insights into RNA quality control: The Ro autoantigen binds misfolded RNAs via its central cavity. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.03.009>

Struhl, K. (2007). Transcriptional noise and the fidelity of initiation by RNA polymerase II. In *Nature Structural and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1038/nsmb0207-103>

Sugimoto, N., Nakano, S. I., Yoneyama, M., & Honda, K. I. (1996). Improved thermodynamic parameters and helix initiation factor to predict stability of DNA duplexes. *Nucleic Acids Research*, 24(22). <https://doi.org/10.1093/nar/24.22.4501>

Sunwoo, H., Dinger, M. E., Wilusz, J. E., Amaral, P. P., Mattick, J. S., & Spector, D. L. (2009). Men ϵ/β nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Research*, 19(3). <https://doi.org/10.1101/gr.087775.108>

Syeda, Z. A., Langden, S. S. S., Munkhzul, C., Lee, M., & Song, S. J. (2020). Regulatory mechanism of miRNA expression in cancer. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051723>

Tan, L., Mai, D., Zhang, B., Jiang, X., Zhang, J., Bai, R., Ye, Y., Li, M., Pan, L., Su, J., Zheng, Y., Liu, Z., Zuo, Z., Zhao, Q., Li, X., Huang, X., Yang, J., Tan, W., Zheng, J., & Lin, D. (2019). PIWI-interacting RNA-36712 restrains breast cancer progression and chemoresistance by interaction with SEPW1 pseudogene SEPW1P RNA. *Molecular Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12943-019-0940-3>

Taylor, D. D., & Gercel-Taylor, C. (2011). Exosomes/microvesicles: mediators of cancer-associated immunosuppressive microenvironments. In *Seminars in immunopathology*. <https://doi.org/10.1007/s00281-010-0234-8>

Tebaldi, T., Zuccotti, P., Peroni, D., Köhn, M., Gasperini, L., Potrich, V., Bonazza, V., Dudnakova, T., Rossi, A., Sanguinetti, G., Conti, L., Macchi, P., D'Agostino, V., Viero, G., Tollervey, D., Hüttelmaier, S., & Quattrone, A. (2018). HuD Is a Neural Translation Enhancer Acting on mTORC1-Responsive Genes and Counteracted by the Y3 Small Non-coding RNA. *Molecular Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.06.032>

Teunissen, S. W. M. (2000). Conserved features of Y RNAs: a comparison of experimentally derived secondary structures. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/28.2.610>

Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and Characterization of Exosomes from Cell Culture Supernatants and Biological Fluids. *Current Protocols in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1002/0471143030.cb0322s30>

Théry, C., Ostrowski, M., & Segura, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. In *Nature Reviews Immunology*. <https://doi.org/10.1038/nri2567>

Tkach, M., & Théry, C. (2016). Communication by Extracellular Vesicles: Where We Are and Where We Need to Go. In *Cell* (Vol. 164, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.01.043>

Tolkach, Y., Stahl, A. F., Niehoff, E. M., Zhao, C., Kristiansen, G., Müller, S. C., & Ellinger, J. (2017). Y-RNA expression predicts survival in bladder cancer patients. *BMC Cancer*. <https://doi.org/10.1186/s12885-017-3746-y>

Tosar, J. P., Gámbaro, F., Sanguinetti, J., Bonilla, B., Witwer, K. W., & Cayota, A. (2015). Assessment of small RNA sorting into different extracellular fractions revealed by high-throughput sequencing of breast cell lines. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv432>

Ulitsky, I., & Bartel, D. P. (2013). XlincRNAs: Genomics, evolution, and mechanisms. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.020>

- Valadi, H., Ekström, K., Bossios, A., Sjöstrand, M., Lee, J. J., & Lötval, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and miRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*. <https://doi.org/10.1038/ncb1596>
- Van Balkom, B. W. M., Eisele, A. S., Michiel Pegtel, D., Bervoets, S., & Verhaar, M. C. (2015). Quantitative and qualitative analysis of small RNAs in human endothelial cells and exosomes provides insights into localized RNA processing, degradation and sorting. *Journal of Extracellular Vesicles*. <https://doi.org/10.3402/jev.v4.26760>
- van Gelder, C. W. g, Thijssen, J. P. h m, Klaassen, E. C. J., Sturchler, C., Krol, A., Van Walther, J., & Pruijn, G. J. M. (1994). Common structural features of the Ro RNP associated hY1 and hY5 RNAs. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/22.13.2498>
- Van Niel, G., Raposo, G., Candalh, C., Boussac, M., Hershberg, R., Cerf-Bensussan, N., & Heyman, M. (2001). Intestinal epithelial cells secrete exosome-like vesicles. *Gastroenterology*. <https://doi.org/10.1053/gast.2001.26263>
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P. (2004a). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1201404>
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crété, P., & Bartel, D. P. (2004b). The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes and Development*. <https://doi.org/10.1101/gad.1201404>
- Velázquez-Flores, M., Rodríguez-Corona, J. M., López-Aguilar, J. E., Siordia-Reyes, G., Ramírez-Reyes, G., Sánchez-Rodríguez, G., & Ruiz Esparza-Garrido, R. (2021). Noncoding RNAs as potential biomarkers for DIPG diagnosis and prognosis: XIST and XIST-210 involvement. *Clinical and Translational Oncology*, 23(3), 501–513. <https://doi.org/10.1007/s12094-020-02443-2>
- Vella, F. (1998). The cell. A molecular approach. *Biochemical Education*, 26(1). [https://doi.org/10.1016/s0307-4412\(98\)00065-x](https://doi.org/10.1016/s0307-4412(98)00065-x)
- Verweij, F. J., Van Eijndhoven, M. A. J., Hopmans, E. S., Vendrig, T., Wurdinger, T., Cahir-Mcfarland, E., Kieff, E., Geerts, D., Van Der Kant, R., Neefjes, J., Middeldorp, J. M., & Pegtel, D. M. (2011). LMP1 association with CD63 in endosomes and secretion via exosomes limits constitutive NF-κB activation. *EMBO Journal*. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.123>
- Wahl, M. C., Will, C. L., & Lührmann, R. (2009). The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. In *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.009>
- Wahlgren, J., Statello, L., Skogberg, G., Telemo, E., & Valadi, H. (2016). Delivery of small interfering RNAs to cells via exosomes. In *Methods in Molecular Biology*. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3112-5_10

Wang, E. T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S. F., Schroth, G. P., & Burge, C. B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/nature07509>

Wang, F., Ying, H. Q., He, B. S., Pan, Y. Q., Deng, Q. W., Sun, H. L., Chen, J., Liu, X., & Wang, S. K. (2015). Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miRNA-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3219>

Wang, H., Cao, F., Li, X., Miao, H., E, J., Xing, J., & Fu, C. gang. (2015). miRNA-320b suppresses cell proliferation by targeting c-Myc in human colorectal cancer cells. *BMC Cancer*, 15(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1728-5>

Wang, H., Hou, L., Li, A., Duan, Y., Gao, H., & Song, X. (2014). Expression of serum exosomal miRNA-21 in human hepatocellular carcinoma. *BioMed Research International*, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/864894>

Wang, K., Zhang, S., Marzolf, B., Troisch, P., Brightman, A., Hu, Z., Hood, L. E., & Galas, D. J. (2009). Circulating miRNAs, potential biomarkers for drug-induced liver injury. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813371106>

Wang, M., Li, M., Liu, Z., Jiang, C., Lv, H., & Yang, Q. (2023). Hsa_circ_0128846 knockdown attenuates the progression of pancreatic cancer by targeting miRNA-1270/NR3C1 axis. *Scientific Reports*, 13(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-023-28439-w>

Wang, W., Yang, J., Xiang, Y. Y., Pi, J., & Bian, J. (2017). Overexpression of Hsa-miRNA-320 Is Associated With Invasion and Metastasis of Ovarian Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*. <https://doi.org/10.1002/jcb.26009>

Wang, X. (2008). miRDB: A miRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *RNA*. <https://doi.org/10.1261/rna.965408>

Wang, X., Lu, X., Zhang, T., Wen, C., Shi, M., Tang, X., Chen, H., Peng, C., Li, H., Fang, Y., Deng, X., & Shen, B. (2016). MiRNA-329 restricts tumor growth by targeting grb2 in pancreatic cancer. *Oncotarget*. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7375>

Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P., & Ohgaki, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *American Journal of Pathology*, 174(4). <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.080958>

Wei, M. M., & Zhou, G. B. (2016). Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer. In *Genomics, Proteomics and Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.007>

Wei, M.-M., & Zhou, G.-B. (2016). Long Non-coding RNAs and Their Roles in Non-small-cell Lung Cancer. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2016.03.007>

Wei, W., Gilbert, N., Ooi, S. L., Lawler, J. F., Ostertag, E. M., Kazazian, H. H., Boeke, J. D., & Moran, J. V. (2001). Human L1 Retrotransposition: cis Preference versus trans Complementation. *Molecular and Cellular Biology*, 21(4). <https://doi.org/10.1128/mcb.21.4.1429-1439.2001>

Weiner, A. M. (2000). Do all SINEs lead to LINEs? In *Nature Genetics* (Vol. 24, Issue 4). <https://doi.org/10.1038/74135>

Weiner, A. M., Deininger, P. L., & Efstratiadis, A. (1986). Nonviral retroposons: Genes, pseudogenes, and transposable elements generated by the reverse flow of genetic information. In *Annual Review of Biochemistry*: Vol. VOL. 55. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.55.1.631>

Weng, L., Wu, X., Gao, H., Mu, B., Li, X., Wang, J. H., Guo, C., Jin, J. M., Chen, Z., Covarrubias, M., Yuan, Y. C., Weiss, L. M., & Wu, H. (2010). MiRNA profiling of clear cell renal cell carcinoma by whole-genome small RNA deep sequencing of paired frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens. *Journal of Pathology*. <https://doi.org/10.1002/path.2736>

Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I., & Diederichs, S. (2009). Many roads to maturity: MiRNA biogenesis pathways and their regulation. In *Nature Cell Biology* (Vol. 11, Issue 3). <https://doi.org/10.1038/ncb0309-228>

Wong, M. P., Fung, L. F., Wang, E., Chow, W. S., Chiu, S. W., Lam, W. K., Ho, K. K., Ma, E. S. K., Wan, T. S. K., & Chung, L. P. (2003). Chromosomal aberrations of primary lung adenocarcinomas in nonsmokers. *Cancer*. <https://doi.org/10.1002/cncr.11183>

WU, C., LIU, X., LI, B., SUN, G., PENG, C., XIANG, D., & LI, B. (2021). miRNA-451 suppresses the malignant characteristics of colorectal cancer via targeting SAMD4B. *Molecular Medicine Reports*, 24(2). <https://doi.org/10.3892/mmr.2021.12196>

Wu, H., Yang, L., & Chen, L. L. (2017). The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation. In *Trends in Genetics* (Vol. 33, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.05.004>

Xie, Y., Zhang, Y., Liu, X., Cao, L., Han, M., Wang, C., Chen, J., & Zhang, X. (2023). miRNA-151a-5p promotes the proliferation and metastasis of colorectal carcinoma cells by targeting AGMAT. *Oncology Reports*, 49(3). <https://doi.org/10.3892/or.2023.8487>

Xing, Z., Lin, A., Li, C., Liang, K., Wang, S., Liu, Y., Park, P. K., Qin, L., Wei, Y., Hawke, D. H., Hung, M. C., Lin, C., & Yang, L. (2014). LncRNA directs cooperative epigenetic regulation downstream of chemokine signals. *Cell*. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.013>

Yadollahi-Farsani, M., Amini-Farsani, Z., Moayedi, F., Khazaei, N., & Yaghoobi, H. (2023). MiRNA-548k suppresses apoptosis in breast cancer cells by affecting PTEN/PI3K/AKT signaling pathway. *IUBMB Life*, 75(2). <https://doi.org/10.1002/iub.2688>

- Yang, G., Fu, H., Zhang, J., Lu, X., Yu, F., Jin, L., Bai, L., Huang, B., Shen, L., Feng, Y., Yao, L., & Lu, Z. (2010). RNA-Binding Protein Quaking, a Critical Regulator of Colon Epithelial Differentiation and a Suppressor of Colon Cancer. *Gastroenterology*, 138(1). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.08.001>
- Yang, Y. C. T., Di, C., Hu, B., Zhou, M., Liu, Y., Song, N., Li, Y., Umetsu, J., & Lu, J. J. (2015). CLIPdb: A CLIP-seq database for protein-RNA interactions. *BMC Genomics*, 16(1). <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1273-2>
- Yao, J., Wang, Y. W., Fang, B. B., Zhang, S. J., & Cheng, B. L. (2016). piR-651 and its function in 95-D lung cancer cells. *Biomedical Reports*. <https://doi.org/10.3892/br.2016.628>
- Yin, Z., Zhang, Y., Li, Y., Lv, T., Liu, J., & Wang, X. (2012). Prognostic significance of STAT3 expression and its correlation with chemoresistance of non-small cell lung cancer cells. *Acta Histochemica*, 114(2). <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2011.04.002>
- You, S., Li, R., Park, D., Xie, M., Sica, G. L., Cao, Y., Xiao, Z. Q., & Deng, X. (2014). Disruption of STAT3 by niclosamide reverses radioresistance of human lung cancer. *Molecular Cancer Therapeutics*, 13(3). <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-13-0608>
- Zhang, H., Ren, Y., Xu, H., Pang, D., Duan, C., & Liu, C. (2013). The expression of stem cell protein Piwil2 and piR-932 in breast cancer. In *Surgical Oncology*. <https://doi.org/10.1016/j.suronc.2013.07.001>
- Zhang, H., Zhang, L., Mathews, D. H., & Huang, L. (2020). LinearPartition: Linear-time approximation of RNA folding partition function and base-pairing probabilities. *Bioinformatics*, 36. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTAA460>
- Zhang, L., Qian, J., Qiang, Y., Huang, H., Wang, C., Li, D., & Xu, B. (2014). Down-regulation of miRNA-4500 promoted non-small cell lung cancer growth. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 34(4). <https://doi.org/10.1159/000366329>
- Zhao, S., Lin, Y., Xu, W., Jiang, W., Zhai, Z., Wang, P., Yu, W., Li, Z., Gong, L., Peng, Y., Ding, J., Lei, Q., Guan, K. L., & Xiong, Y. (2009). Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1 α . *Science*, 324(5924). <https://doi.org/10.1126/science.1170944>
- Zuker, M., & Stiegler, P. (1981). Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Research*, 9(1). <https://doi.org/10.1093/nar/9.1.133>

13. SITIOS WEB Y BASES DE DATOS

Centro Nacional de información sobre biotecnología (NCBI), Maryland, Estados Unidos

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

Centro de estudios del cáncer. Memorial Sloan Kettering

<https://cbio.mskcc.org/miRNA2003/miranda.html>

Departamento de computación y de ingeniería eléctrica universidad de Tesalónica en Grecia

<http://diana.imis.athena-innovation.gr>

Laboratorio de Rawejsky en la Universidad de Nueva York y el centro de genómica funcional comparativa Max Delbruck Centrum en Berlín, Alemania.

<https://pictar.mdc-berlin.de/>

Instituto para investigación en bioinformática instituto Whitehead para investigación biomédica. TargetScan 8.0

https://www.targetscan.org/vert_80/

diccionario de vías metabólicas de miRNAs (miRPathDB) Universidad de Sarre

<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/overview.html>

Servidor web RNAfold Instituto de química teórica, Universidad de Viena, Austria.

<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>

Dobbs Lab. base de datos de interacciones Proteínas-RNA RPI-Seq perteneciente a la Universidad Estatal de Iowa

<http://pridb.gdcb.iastate.edu/RPISeq/batch-rna.html>

Thomas lab en la Universidad del sur de California

<https://www.pantherdb.org/>

14. ABREVIATURAS

3D: tridimensionales, tridimensionales.

AI: Artificial intelligence, Inteligencia Artificial.

Ast: **astrocitoma.**

cfRNA: Circulating Free RNA, RNA libre en circulación.

circRNAs: RNAs Circulares.

CNS: Central Nervous System, Sistema Nervioso Central.

ctDNA: DNA de tumores circulantes.

DNA: Deoxyribose Nucleic Acid, ácido deoxyribonucleico.

EMT: Transición Epitelial-mesenquimal.

EV: extracellular vesicles, vesículas extracelulares.

GTP: Guanidine three phosphate, trifosfato de guanidina.

HTA: Human Transcriptome Array, Microarreglo de Transcriptoma Humano.

ILVs: Intraluminal Vesicles, Vesículas Intraluminales.

lncRNA: Long noncoding RNA, RNA largo no codificante.

m7G: 7-methylguanina.

miRISC: micro-RNA Silencing Inducing Complex, Complejo Inductor del Silenciamiento.

miRNA: micro-RNA, micro RNA.

mRNA: messenger RNA, RNA mensajero.

MSC: Mesenchymal Stem Cells, células madre mesenquimales.

ncRNA: noncoding RNA, RNA no codificante.

nt: **nucleótidos.**

NGS: Next Generation Sequencing, Secuenciación Masiva de Última generación.

p-Ast: Astrocitomas pediátricos.

pH: potencial de hidrógeno.

piRNAs: piwi interacting RNAs, RNA de interacción con piwi.

PMV: Plasma Membrane Vesicles, Vesículas de Membrana Plasmática.

poliA: polyadenylates, poliadenilación.

RF: Random Forest, Bosque aleatorio.

RNA pol: RNA polimerasa.

RNA: Ribo Nucleic Acid, ácido ribonucleico.

RNAseq: RNA Sequencing, secuenciación de RNA.

rRNA: RNA ribosomal.

RT-PCR: Retrotranscription Polymerase Chain Reaction, Reacción de cadena de polimerasa acoplada a reverso transcripción.

scRNAs: RNAs de los cuerpos de Cajal.

shRNA: small hairpin RNA, RNA pequeño de pasador.

SINE: Short inter dispersed Nuclear Elements, Elementos nucleares dispersos cortos.

siRNA: Small Interfering RNA, RNA pequeño interferente.

snoRNAs: small nucleolar RNAs, RNA pequeño nucleolar.

snRNAs: small nuclear RNAs, RNA pequeño nuclear.

TLRs: Toll like receptors, Receptores Tipo Toll.

UTR: Untranslated Región, Región sin traducir.

VSM: Vector Support Machine, máquina de soporte vectorial.

vtRNAs: vault RNAs, RNA de bóveda.

Y-RNA: RNA cYtoplasmic, RNA citoplasmático.

Apéndice 1

Tabla A1.1. Nivel de expresión de miRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	miRNA
-198.41	miRNA-548i-3
-107.29	miRNA-548w
-106.77	miRNA-548i-3
-94.85	miRNA-548a-2
-88.63	miRNA-548 i-2
-86.45	miRNA-548 i3
-67.38	miRNA-543
-64.01	miRNA-548i-1
-61.62	miRNA-548m
-59.86	miRNA-1256
-41.12	miRNA-548i-2
-24.77	miRNA-1290
-22.72	miRNA-1261
-20.95	miRNA-509 (1,2,3)
-19.94	miRNA-548u
-18.38	miRNA-708
-17.96	miRNA-548a-2
-15.28	miRNA-1973
-15.03	miRNA-509-3
-11.25	miRNA-1323
-10.83	miRNA-548an
-10.62	miRNA-382
-10.3	miRNA-329-2
-8.5	miRNA-4320
-7.96	miRNA-513b
-7.9	miRNA-1256
-7.38	miRNA-670
-7.13	miRNA-802
-7.1	miRNA-544a
-7.01	miRNA-548h-2
-6.93	miRNA-1305
-6.77	miRNA-1270
-6.77	miRNA-1270
-6.6	miRNA-4659a
-6	miRNA-4500

Tabla A1.2. Nivel de expresión de lincRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	lincRNA
-21.86	lincRNA-1061
-10.48	lincRNA-266-1
-9.9	lincRNA-1061
-9.24	lincRNA-1061
-9.24	lincRNA-1061
-8.54	lincRNA-1001
-7.26	lincRNA-1377
-6.09	lincRNA-837

Tabla A1.3. Nivel de expresión de snRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	snRNA
-96.47	SNRNA-U6 small nuclear 15, pseudogene
-95.69	SNRNA-Ro-associated Y1
-77.99	SNRNA-U6 small nuclear (1,2)
-72.53	SNRNA-U7 small nuclear 48 pseudogene (RNU7-48P) on chromosome 6
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 37, pseudogene (RNU6-37P) on chromosome 1
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 5, pseudogene (RNU6-5P) on chromosome 2
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 1
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 2
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 7
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 8
-67.86	SNRNA-U6 small nuclear 9
-52.42	SNRNA-U6 small nuclear 36, pseudogene
-35.81	SNRNA-U6 small nuclear 16, pseudogene
-32.11	SNRNA-U6 small nuclear 33, pseudogene
-31.43	SNRNA-U6 small nuclear 45, pseudogene
-25.63	SNRNA-Ro-associated Y5
-22.68	SNRNA-Ro-associated Y3
-12.21	SNRNA-U6 small nuclear 39, pseudogene
-11.27	SNRNA-U4 small nuclear 5, pseudogene
-10.12	SNRNA-U4 small nuclear 1
-9.89	SNRNA-U6 small nuclear 21, pseudogene
-9.58	SNRNA-U6 small nuclear 34, pseudogene
-8.81	SNRNA-U7 small nuclear 76 pseudogene
-8.49	SNRNA-U5E, U5D small nuclear 1
-8.3	SNRNA-U6 small nuclear 10, pseudogene
-8.01	SNRNA-variant U1 small nuclear 17

-7.61	SNRNA-U6 small nuclear 71, pseudogene
-------	---------------------------------------

Tabla A1.4. Nivel de expresión de snoRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	snoRNA
-61.33	snoRNA-SNORD118L12
-18.86	snoRNA-C/D box 115-22
-15.07	snoRNA-C/D box 115-11; 115-36; 115-43; 115-29
-15.07	snoRNA-C/D box 115-29; 115-43; 115-11
-15.07	snoRNA-C/D box 115-43; 115-29; 115-11
-15.07	snoRNA-C/D box 115-43; 115-36; 115-11; 115-29
-9.65	snoRNA-C/D box 115-15
-9.52	snoRNA-C/D box 116-2;116-6
-9.35	snoRNA-C/D box 115-15; 115-20; 115-21; 115-34
-8.73	snoRNA-H/ACA box 70E
-8.7	snoRNA-C/D box 115-5; 115-12; 115-9; 115-10
-8.7	snoRNA-C/D box 115-5; 115-9; 115-10
-8.7	snoRNA-C/D box 115-5; 115-9; 115-10; 115-12
-7.94	snoRNA-H/ACA box 38
-7.94	snoRNA-H/ACA box 38
-7.94	snoRNA-H/ACA box 38
-7.94	snoRNA-H/ACA box 38
-7.94	snoRNA-H/ACA box 38
-7.06	snoRNA-C/D box 115-2
-6.8	snoRNA-C/D box 115-10
-6.77	snoRNA-C/D box 114-2
-6.46	snoRNA-C/D box 53

Tabla A1.5. Nivel de expresión de lncRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	lncRNA
-374.83	LOC102724034
-98.25	LOC729218
-63.19	LOC102724135
-52.79	LOC101927648
-19.97	LOC100653008
-17.26	LOC101927827
-14.09	LOC105370612
-11.97	LOC100652902
-11.31	LOC100996920
-10.54	LOC105370612
-9.82	LOC101927429
-8.07	LOC101928381
-8.07	LOC101928381
-8.07	LOC101928381
-8.07	LOC101928626
-8.07	LOC101928626
-8.07	LOC101928626
-7.78	LOC100134822
-7.59	LOC100126582
-7.45	LOC105372582
-7.37	LOC100190986
-6.7	LOC101927827
-6.29	LOC101928626
-6.1	LOC105379499
-6.06	LOC100652750

Tabla A1.6. Nivel de expresión de mRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast difusos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	mRNA
-1977.78	GOLGA80 transcript variant X1, mRNA
-345.56	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-246.01	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), transcript variant 6, non-coding RNA
-191.24	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form-like (LOC101060022)
-180.79	chromosome 12 open reading frame 57 (C12orf57), transcript variant 6, non-coding RNA
-164.66	LOC107987394 mRNA
-146.53	septin 7 pseudogene 2 (SEPT7P2), non-coding RNA
-142.8	phosphodiesterase 4D interacting protein-like (LOC100996724), transcript variant 2, non-coding RNA
-133.89	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha, muscle-specific form-like (LOC101060022)
-95.07	LOC105370852 (LOC105370852), ncRNA
-90.25	dynamitin 1 pseudogene 41 (DNM1P41), non-coding RNA
-90.25	phosphoglucosyltransferase 5 (PGM5), transcript variant X1, mRNA
-87.13	Phosphoglucosyltransferase
-86.73	microtubule affinity regulating kinase 2 pseudogene 14 (MARK2P14) on chromosome 3

-13.81	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 2 pseudogene
-13.5	immunoglobulin kappa variable 2D-28
-12.93	apolipoprotein B
-12.61	ankyrin repeat domain 20 family, member A3
-11.95	immunoglobulin kappa constant
-11.89	RNA, 5S ribosomal pseudogene 314
-11.89	RNA, 5S ribosomal pseudogene 316
-11.52	integrator complex subunit 4
-11.51	ribosomal protein L23a pseudogene 4
-11.29	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 1 pseudogene
-11.24	keratin associated protein 25-1
-10.73	keratin associated protein 5-11
-10.65	ribosomal protein S26
-10.59	coxsackie virus and adenovirus receptor pseudogene 2
-10.38	translation machinery associated 7 homolog (S. cerevisiae) pseudogene
-10.3	olfactory receptor, family 4, subfamily X, member 2 (gene/pseudogene)
-10.18	olfactory receptor, family 6, subfamily C, member 74
-10.13	renal clear cell carcinoma-associated transcript 198
-10.03	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 87 pseudogene
-9.98	RNA, 5S ribosomal pseudogene 313
-9.9	centaurin, gamma-like family, member 12 pseudogene
-9.76	olfactory receptor, family 14, subfamily J, member 1
-9.72	olfactory receptor, family 5, subfamily D, member 16
-9.64	olfactory receptor, family 4, subfamily D, member 10
-9.55	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 2 pseudogene
-9.46	SMG1 pseudogene 1
-9.42	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
-9.27	ribosomal protein L21; ribosomal protein L21 pseudogene 28
-9.14	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 5
-8.98	olfactory receptor, family 4, subfamily Q, member 3
-8.94	amylase, alpha 1B (salivary); amylase, alpha 1C (salivary); amylase, alpha 1A (salivary)
-8.79	G antigen 12F; G antigen 12C; G antigen 12D; G antigen 6; G antigen 12I; G antigen 12G; G antigen 7; G antigen 5; G antigen 4; G antigen 12B
-8.79	G antigen 12F; G antigen 12C; G antigen 12D; G antigen 6; G antigen 12I; G antigen 2D; G antigen 7; G antigen 5; G antigen 4; G antigen 12G; G antigen 12B
-8.78	olfactory receptor, family 2, subfamily M, member 4
-8.7	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-8.61	centaurin, gamma-like family, member 12 pseudogene
-8.6	hect domain and RLD 2 pseudogene 7
-8.49	keratin associated protein 9-8
-8.49	RANBP2-like and GRIP domain containing 8
-8.33	immunoglobulin kappa variable 2D-40
-8.29	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 4
-8.28	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 91 pseudogene
-8.15	mucin 17, cell surface associated
-8.11	RNA, 7SK small nuclear
-8.09	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 35 pseudogene
-8.01	olfactory receptor, family 10, subfamily G, member 2
-8	mediator complex subunit 27
-7.95	olfactory receptor, family 8, subfamily G, member 2
-7.87	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 6; ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4
-7.83	neuroblastoma breakpoint family, member 9
-7.81	immunoglobulin kappa variable 1D-33
-7.76	immunoglobulin kappa variable 1-27
-7.68	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 37 pseudogene

-7.65	hect domain and RLD 2 pseudogene 2
-7.64	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 7, pseudogene
-7.62	decapping exoribonuclease
-7.61	immunoglobulin kappa variable 2-28
-7.57	keratin associated protein 7-1 (gene/pseudogene)
-7.51	olfactory receptor, family 1, subfamily D, member 4 (gene/pseudogene)
-7.51	olfactory receptor, family 1, subfamily L, member 8
-7.48	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-7.45	keratin associated protein 9-1; keratin associated protein 4-8
-7.42	high mobility group nucleosomal binding domain 2 pseudogene 17
-7.4	immunoglobulin heavy diversity 3-22
-7.38	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 29
-7.38	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 29
-7.38	solute carrier family 17 (organic anion transporter), member 1
-7.37	myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia; translocated to, 10 pseudogene 1
-7.36	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 4C
-7.36	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 4C
-7.32	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-7.32	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-7.32	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-7.32	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-7.32	olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 3; olfactory receptor, family 2, subfamily J, member 2
-7.3	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 4A
-7.27	keratin associated protein 4-8
-7.26	lymphotoxin beta (TNF superfamily, member 3)
-7.26	olfactory receptor, family 7, subfamily E, member 24
-7.18	seven transmembrane helix receptor
-7.15	olfactory receptor, family 56, subfamily A, member 1
-7.05	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)-like 4G
-6.98	ubiquitin specific peptidase 17-like family member 9, pseudogene
-6.96	olfactory receptor, family 1, subfamily J, member 4
-6.93	coxsackie virus and adenovirus receptor pseudogene 2
-6.9	leucine rich repeat containing 37, member A2
-6.87	olfactory receptor, family 1, subfamily S, member 2
-6.87	SMG1 pseudogene 1
-6.85	ACTR3B pseudogene 2
-6.85	G protein-coupled receptor 50
-6.85	nuclear pore complex interacting protein family, member B9
-6.84	olfactory receptor, family 5, subfamily L, member 2
-6.79	ret finger protein-like 4A-like 1
-6.69	amylase, alpha 1B (salivary); amylase, alpha 1C (salivary); amylase, alpha 1A (salivary)
-6.63	profilin 1 pseudogene 2
-6.61	olfactory receptor, family 7, subfamily A, member 10
-6.59	actin, beta
-6.56	ACTR3B pseudogene 2
-6.56	ArfGAP with GTPase domain, ankyrin repeat and PH domain 4
-6.56	ARP3 actin-related protein 3 homolog B (yeast) pseudogene 6
-6.56	olfactory receptor, family 4, subfamily F, member 17
-6.55	olfactory receptor, family 10, subfamily D, member 1 pseudogene
-6.52	AFAP1 antisense RNA 1
-6.5	glucuronidase, beta pseudogene 3
-6.46	olfactory receptor, family 5, subfamily AK, member 2
-6.45	synovial sarcoma, X breakpoint 7
-6.44	immunoglobulin kappa variable 2D-26

Tabla A1.7. Nivel de expresión de miRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	miRNA
-8.95	miRNA642b
-8.75	miRNA365a
-8.58	miRNA4443
-7.58	miRNA4779
-7.33	miRNA3690
-7.02	miRNA320b2
-6.88	miRNA451b
-6.82	miRNALET7a1
-6.54	miRNA606
-6.52	miRNA151a

Tabla A1.8. Nivel de expresión de snRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	snRNA
-10.86	SNRNA-U6-583P
-9.57	SNRNA-U6-993
-8.1	SNRNA-U6-303P
-7.52	SNRNA-U6-100P
-7.42	SNRNA-U6-542P
-7.18	SNRNA-U6-972P
-7.06	SNRNA-U6-645P
-6.79	SNRNA-U6-555P
-6.7	SNRNA-U6-659P
-6.68	SNRNA-U6-99P
-6.04	SNRNA-U6ATAC20P

Tabla A1.9. Nivel de expresión de snoRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

Abundancia	snoRNA
-17.81	snoRNA-A72L5
-10.07	snoRNA-A72
-8.43	snoRNA-L4
-7.4	snoRNA-13C
-6.76	snoRNA-22B
-6.5	snoRNA-63C
-6.11	snoRNA-36BL1

Tabla A1.10. Nivel de expresión de lncRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

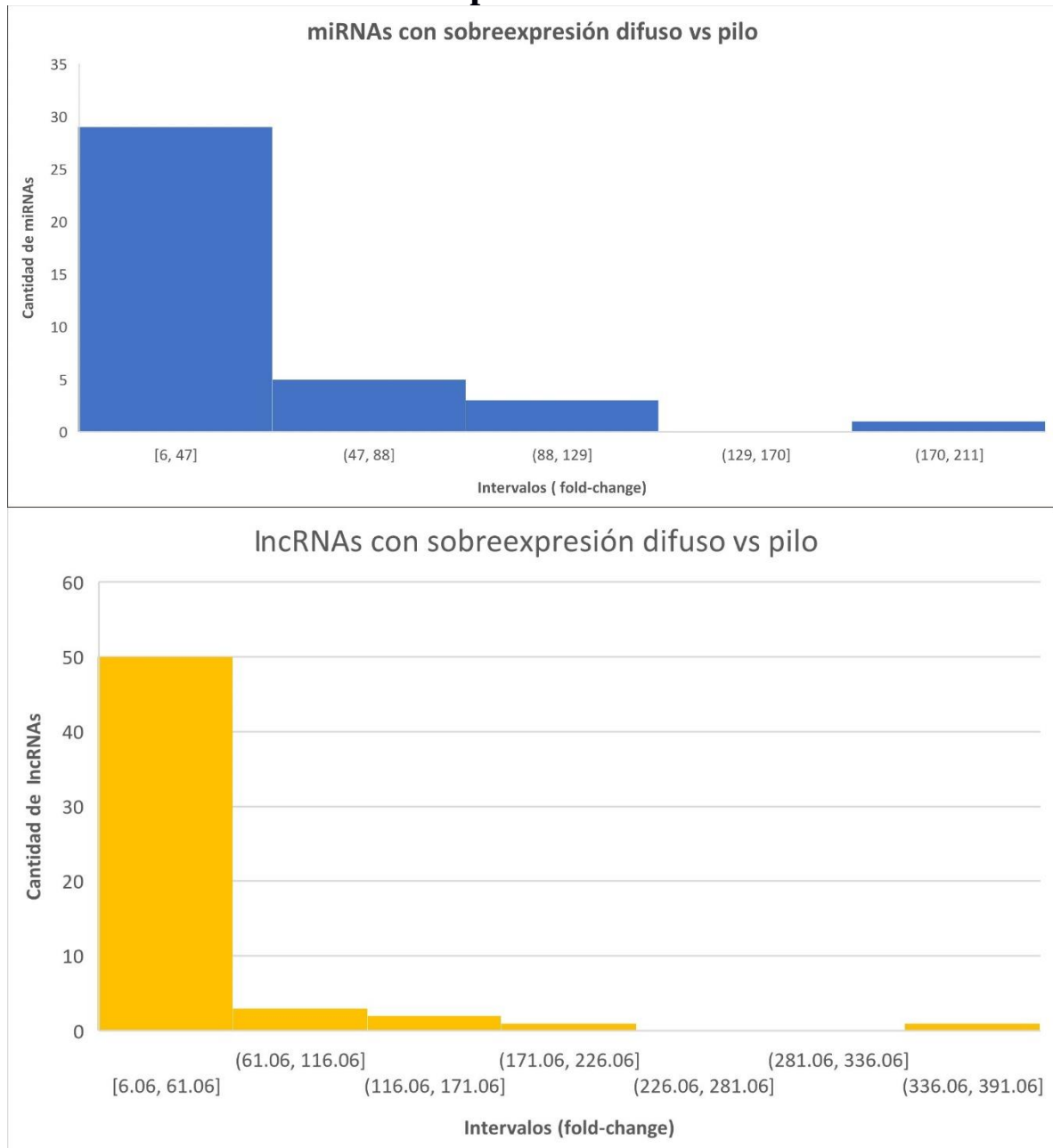
Abundancia	lncRNA
8.4	LOC105375026
4.48	LINC00302
4.43	C16orf72
4.14	LOC102724919

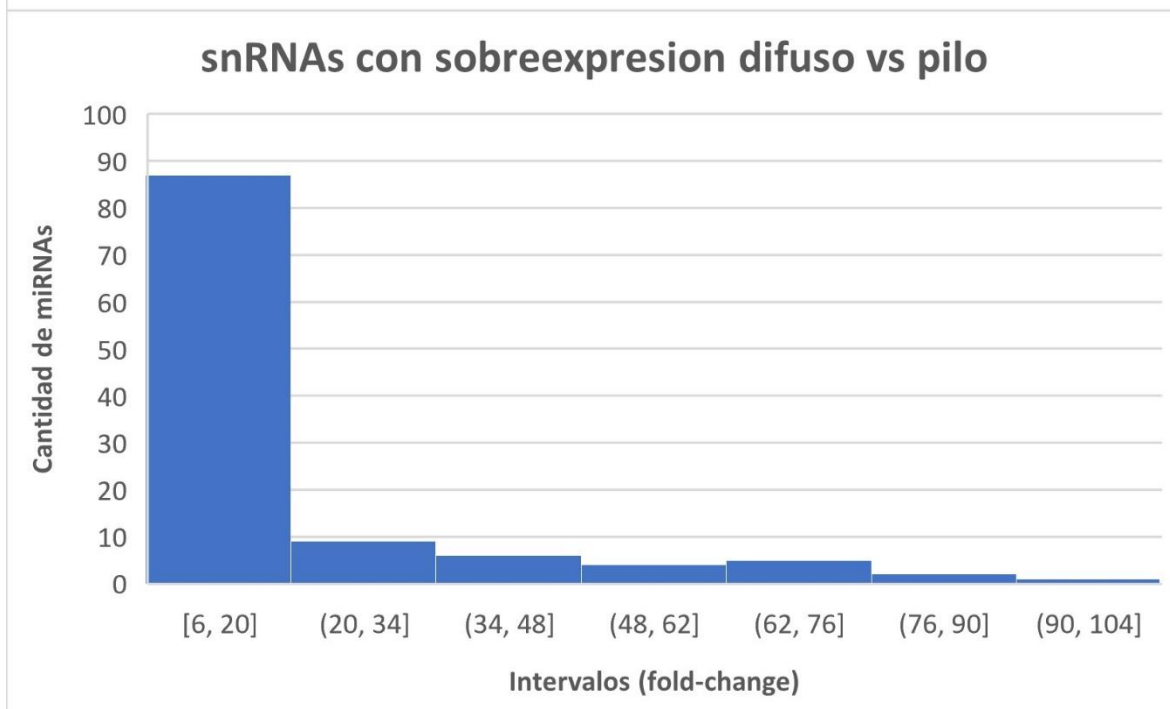
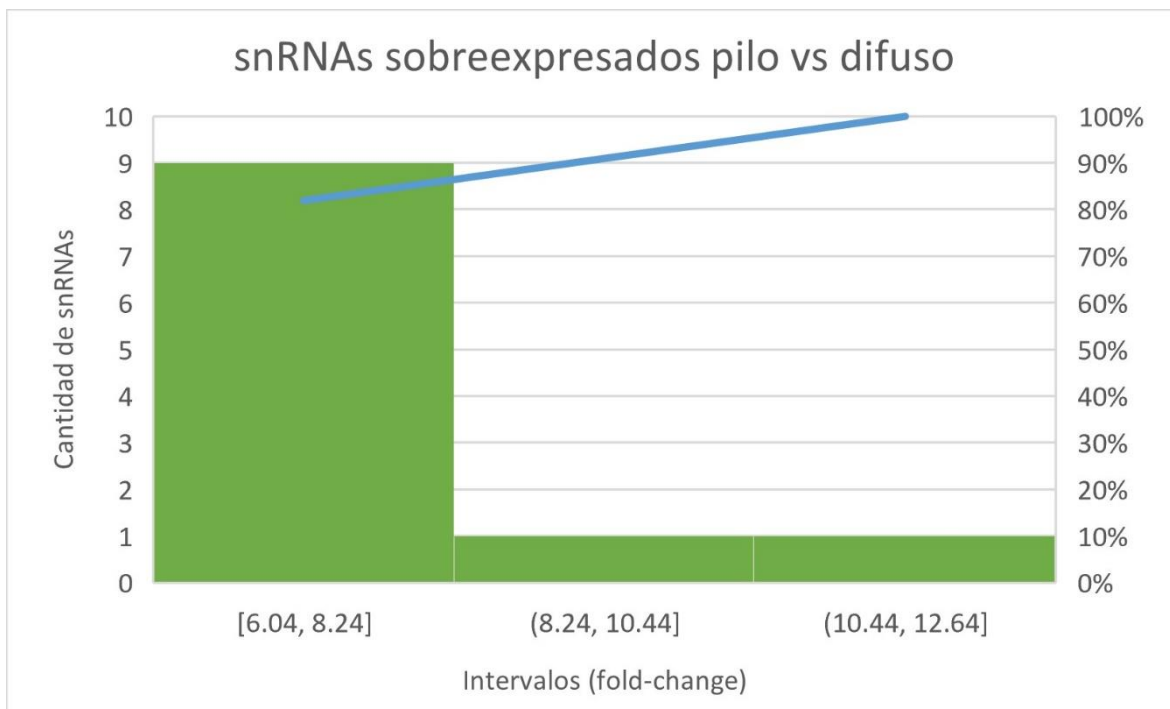
4.14	LOC647070
------	-----------

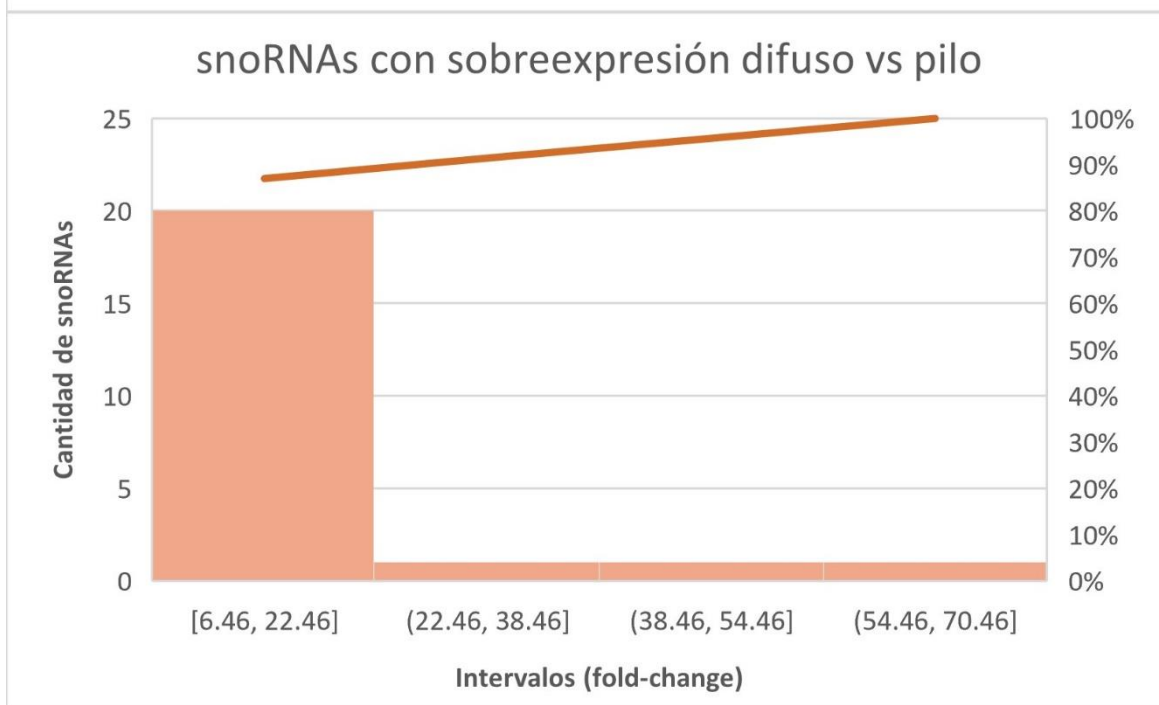
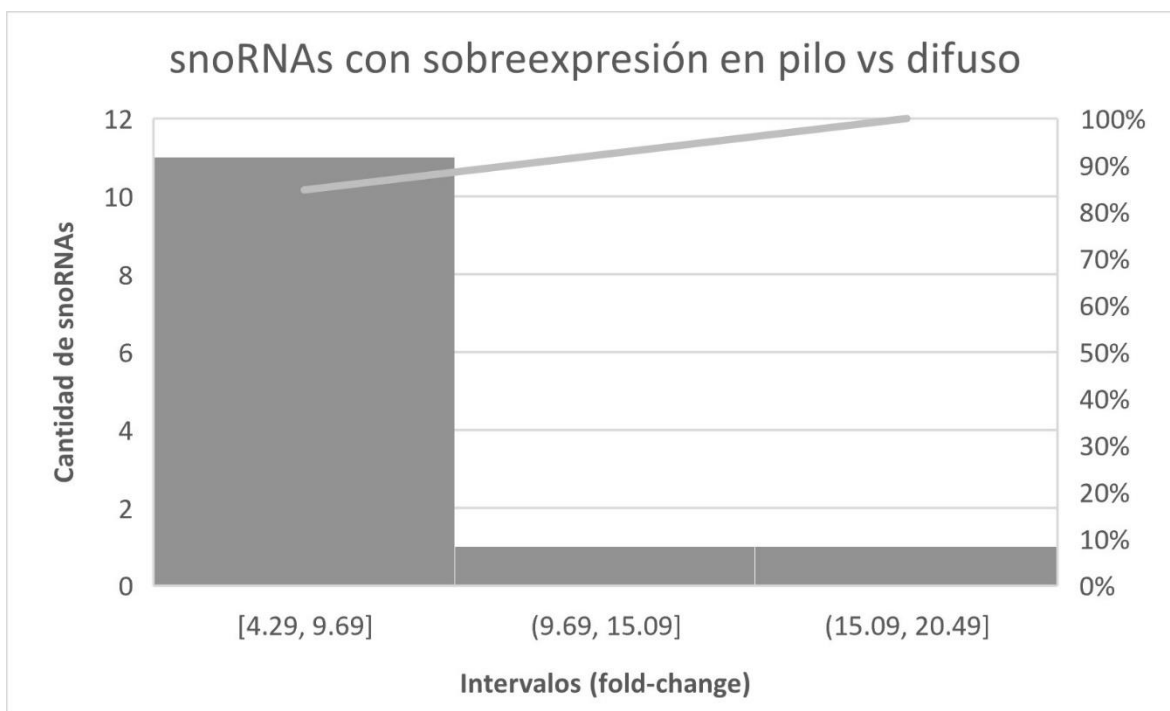
Tabla A1.11. Nivel de expresión de mRNAs sobreexpresados en exosomas de p-Ast pilocíticos. Ordenados de mayor a menor Abundancia relativa filtro de Fold-change de 6.

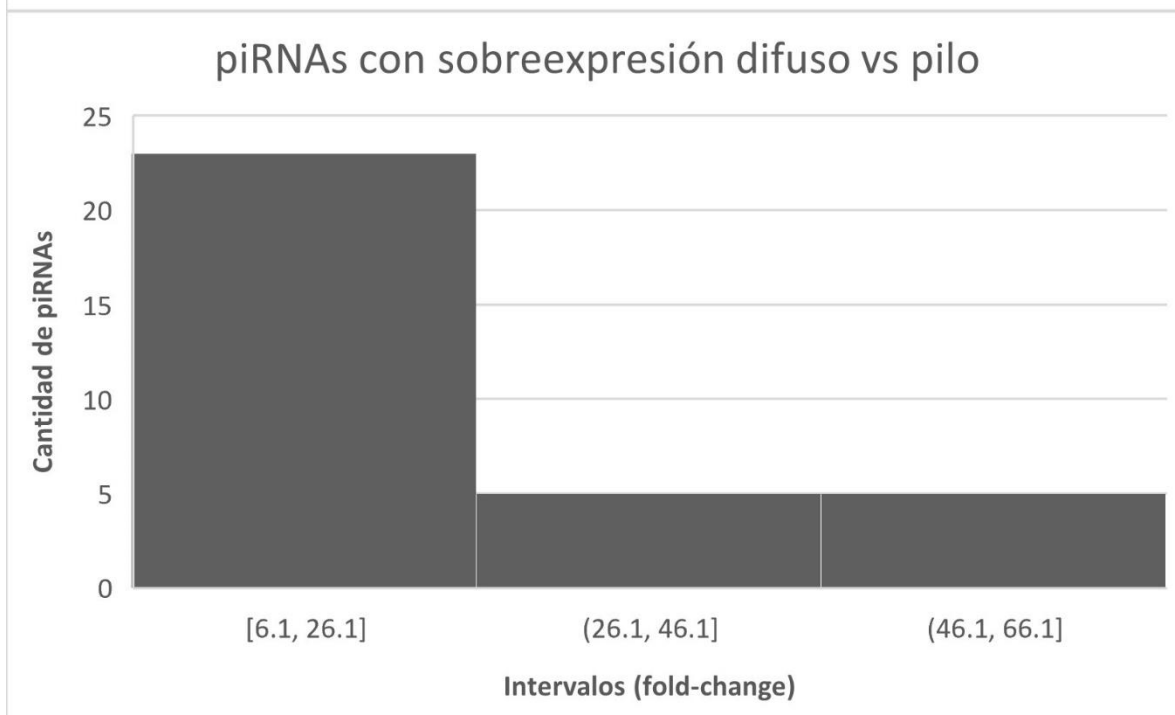
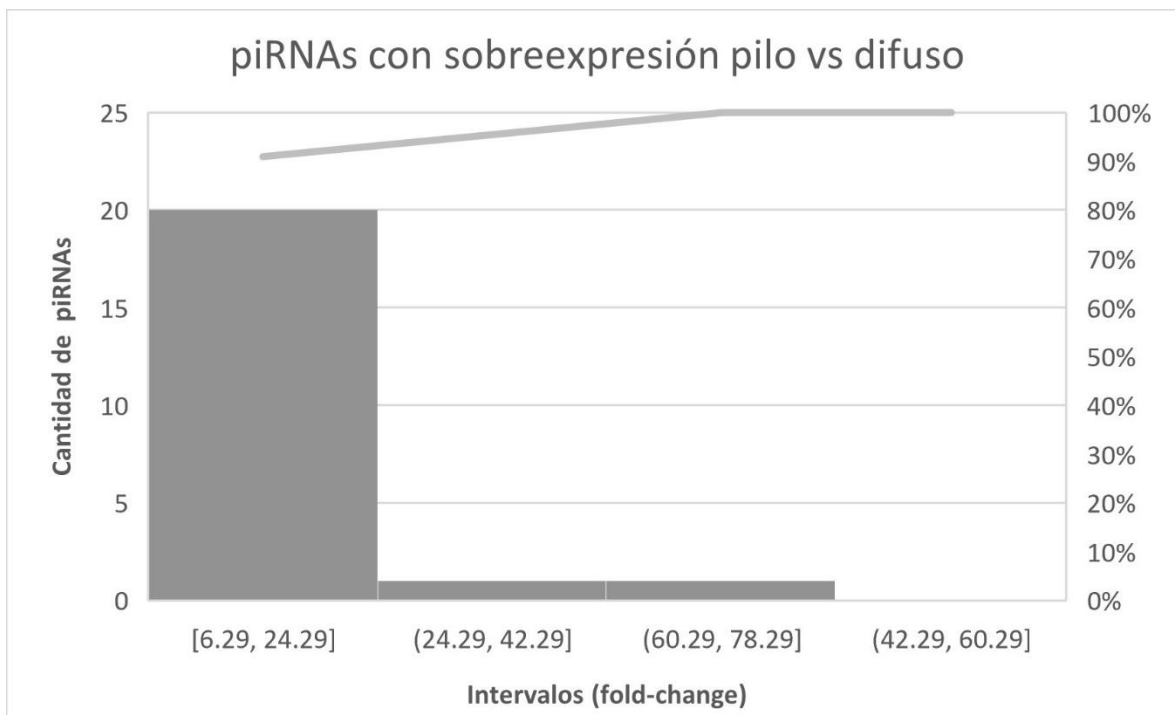
Abundancia	mRNA
49.8	ALFA MANOSIL TRANSFERASA
44.06	SCL LOCUS
16.92	(LRRC37A2)
15.15	HBA1; HBA2
14.81	dystrophin (DMD)
14.32	HBA2; HBA1
11.78	C4B
10.35	HBA2
8.51	IGHD2-2
7.47	RPS18
7.31	BICD1
7.06	TSEN2
6.57	OR5V1

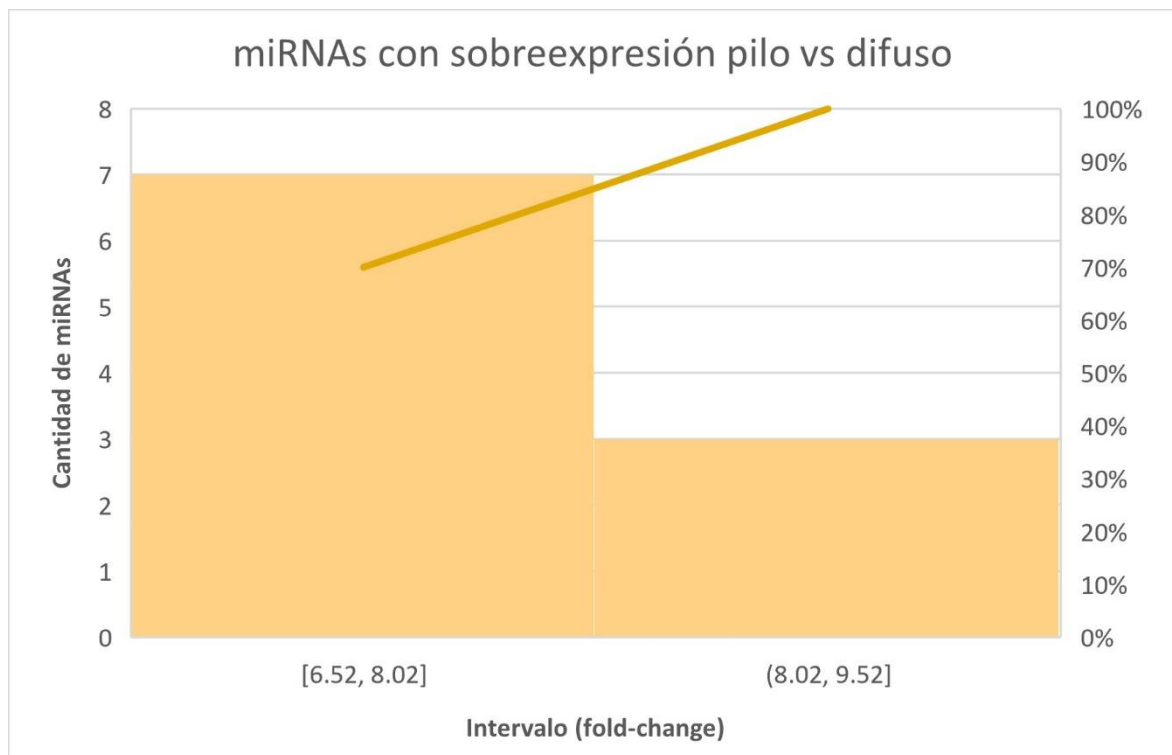
Apéndice 2



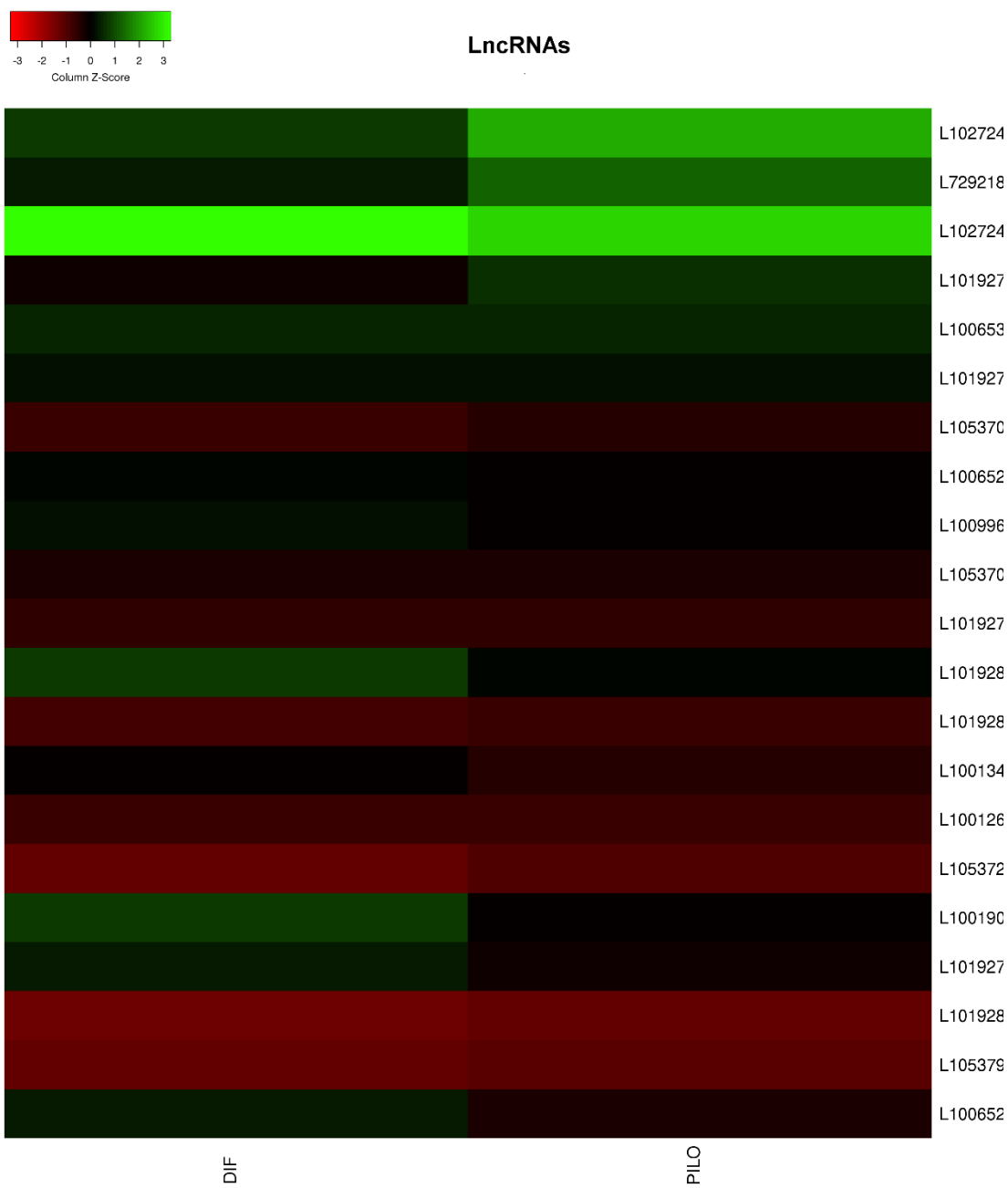


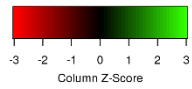




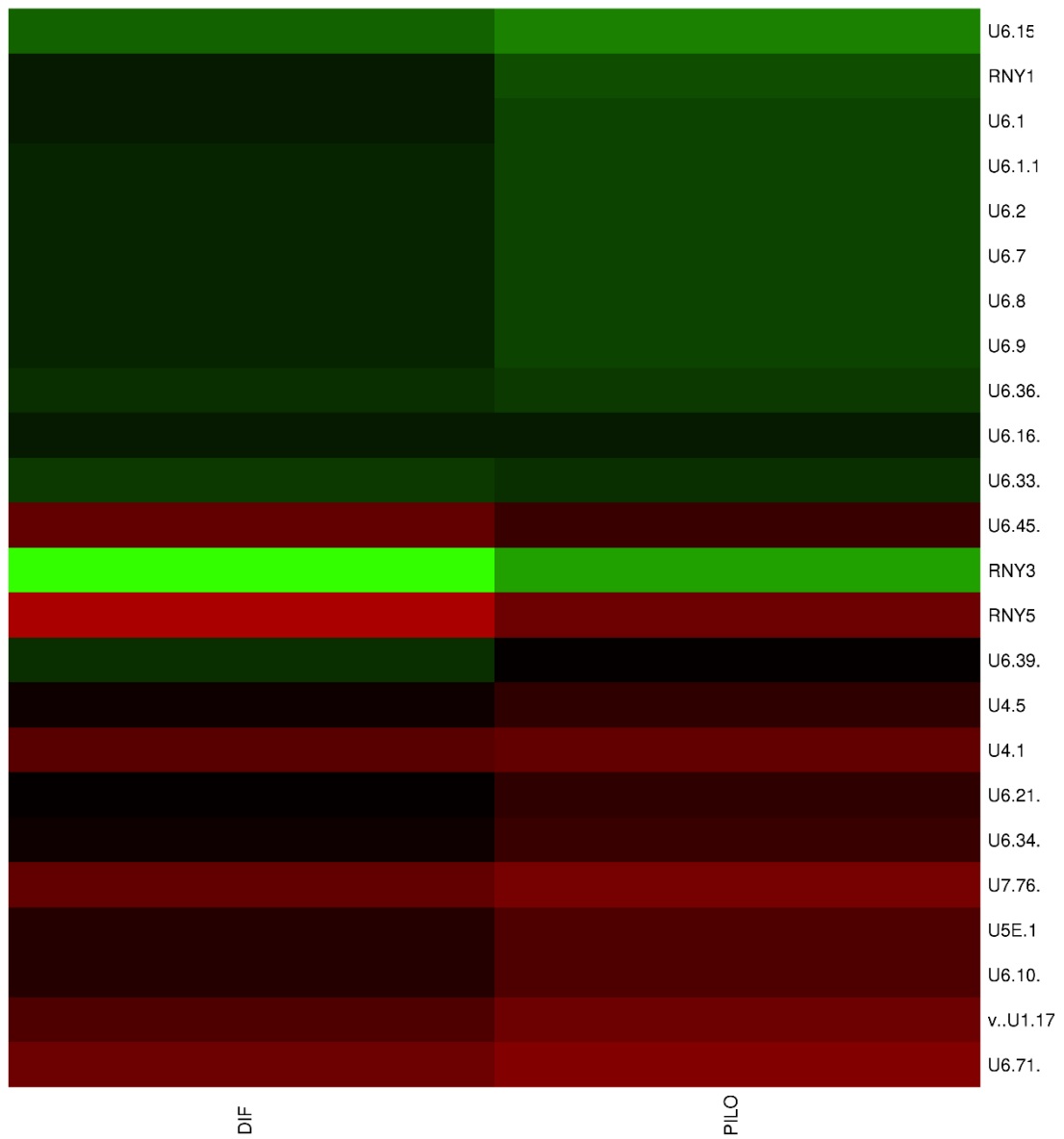


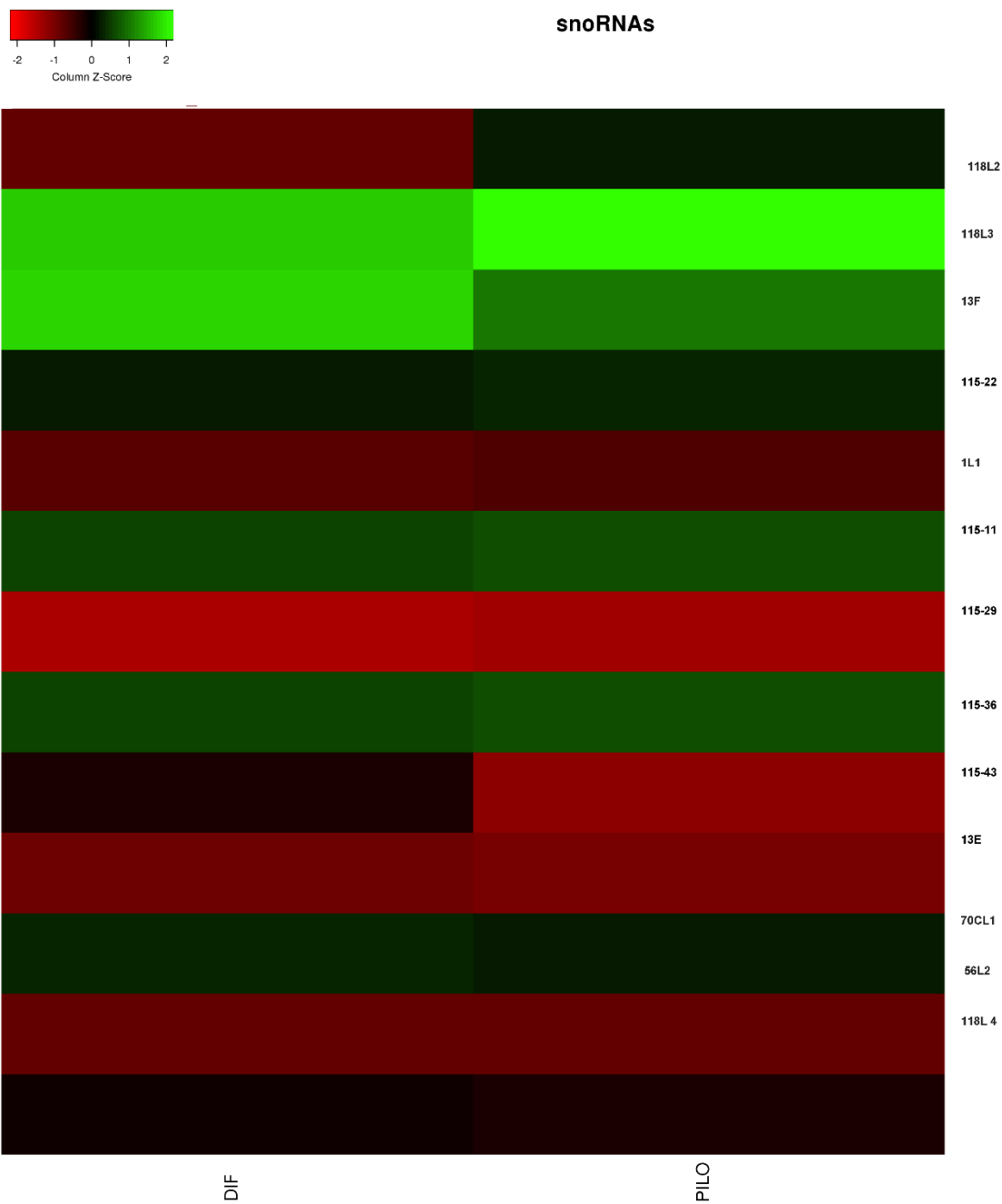
Apéndice 3





snRNAs





miRNAs

