



Universidad Nacional Autónoma de México  
Dirección General de Estudios de Posgrado  
Instituto Mexicano del Seguro Social



Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Pediatría,  
Centro Médico Nacional Siglo XXI

## PROGRAMA ÚNICO DE ESPECIALIZACIONES MÉDICAS

### “IDENTIFICACIÓN DE LA ANEXINA V COMO PROTEÍNA BLANCO DE miR-21 EN ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS MEDIANTE UNA BÚSQUEDA *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS BLANCO DE miRNAS EN ASTROCTIOMAS PEDIÁTRICOS”

#### PROTOCOLO DE INVESTIGACIÓN

Para obtener el diploma de  
Especialista en Genética Médica

P R E S E N T A

**Dra. Leyla Soraya Camarillo Blancarte**

#### **Tutores de la Tesis:**

**Dr. Diego Julio Arenas Aranda**

Jefe de la Unidad de Investigación Médica en Genética Humana Hospital de  
Pediatría, CMN SXXI, arenasdi@gmail.com

**Dr. Enrique López Aguilar**

Jefe de Servicio de Oncología, Laboratorio de Investigación en Tumores  
Cerebrales, UMAE Hospital de Pediatría, CMNSXXI IMSS  
elopezaguilar@hotmail.com



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **Cotutores**

### **Dra. Martha Eugenia Ruíz-Tachiquín**

Unidad de investigación Médica en Genética Humana UMAE-Hospital de Pediatría-CMNSXXI- IMSS mertachiquin@gmail.com

### **Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes**

Servicio de Patología, UMAE Hospital de Pediatría, CMNSXXI georginasiordia@hotmail.com

### **Dr. Marco Antonio Ramírez Florido**

Neuro-Patólogo Laboratorio de Tumores Cerebrales, Hospital de Pediatría CMN SXXI mar-florido@gmail.com

### **Asesor y revisor metodológico**

Dr. Enrique Blanco Lemus

Servicio de Patología del Hospital de Especialidades, CMN SXXI, IMSS nfkb64@gmail.com

## Agradecimientos

Gracias Di-s por darme la capacidad de ver las oportunidades y tomarlas.

Gracias al IMSS por darme todo lo que tengo desde mi infancia y llenar mi vida de gratos momentos.

Querido Padre, gracias porque eres el motor de mi vida.

Felipe, gracias por tu incondicional apoyo y cariño.

Dr. Santiago Echeverría gracias por darme la oportunidad de ser especialista y abrirme las puertas para un mejor futuro. Gracias!

Dr. Fausto Barajas gracias por ser nuestro ángel de familia.

Gracias a mis maestros por alentarme en todo momento y su especial apoyo: Dra. Araujo, Dr. Huicochea, Dr. Blanco Lemus y Dr. Rodríguez Florido.

Gracias Gabs por ser mi lindo complemento.

Dr. JC Zenteno, gracias por darme el impulso y lugar cuando más lo necesitaba.

Dr. Chacón, amigo y Maestro, gracias por la academia y la confianza.

Dra. Sepúlveda V. gracias por su gran apoyo y por confiar en mi.

Dr. López Aguilar gracias por darme la oportunidad de trabajar a su lado.

Rabanit Turi Baasul gracias por todo el aliento y por ser un ejemplo como mujer.

Gracias a mis niños por iluminar cada uno de mis días: Dudu, Hamud, Katan y Cruze.

Gracias a mis compañeros y amigos por estar siempre a mi lado.

April dear y Dra. Herrera, gracias!

T. Lupita, gracias por todo, te quiero.

Anita, gracias por tu sincero apoyo y lealtad.

Shema Israel...

## ÍNDICE

RESÚMEN .....	5
MARCO TEÓRICO.....	6
JUSTIFICACIÓN.....	18
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	18
OBJETIVOS.....	18
HIPÓTESIS.....	18
MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
RESULTADOS.....	29
DISCUSIÓN.....	39
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA.....	42
ANEXOS.....	46

# IDENTIFICACIÓN DE LA ANEXINA V COMO PROTEÍNA BLANCO DE miR-21 EN ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS MEDIANTE UNA BÚSQUEDA *IN SILICO* DE LAS SECUENCIAS BLANCO

## Resumen

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) representan el 20% de todos los tumores, siendo la segunda neoplasia más común después de la leucemia en niños. Los astrocitomas abarcan más del 50% de todas las neoplasias del SNC.

Existe una gran variedad de genes y múltiples vías involucradas en la patogénesis y desarrollo de los astrocitomas. Actualmente se sabe que los cambios a nivel de la cromatina, de RNA o bien de microRNA tienen un papel importante en procesos celulares como: diferenciación, progresión del ciclo celular, respuesta al estrés y apoptosis. Se estima que cada miRNA tiene más de un transcrito blanco, lo que provoca degradación del mRNA y/o inhibición de la traducción, la mayoría de los genes que codifican proteínas son sujetos a regulación de sus mRNAs por los miRNAs. Por lo que están involucrados en la génesis tumoral y de ahí la importancia de su estudio. Se sabe que miR-21 regula a anexina V lo que se comprobará en astrocitomas pediátricos.

Por medio del análisis *in silico* de los microRNAs se identificó que la anexina V es uno de los blancos de miR-21, esto contribuye a enriquecer y esclarecer más puntualmente la biogénesis de los astrocitomas en población pediátrica.

## **Marco teórico**

### **Tumores primarios del Sistema Nervioso Central**

Los tumores primarios del Sistema Nervioso Central (SNC) representan el 20% de todos los tumores, siendo la segunda neoplasia después de la leucemia en niños. Los tumores infratentoriales se encuentran en un 60% en lactantes y escolares, mientras que en adultos son más frecuentes los tumores supratentoriales (1). En edad pediátrica, los astrocitomas, meduloblastomas y ependimomas son los tumores de mayor frecuencia. Principalmente, los derivados de la glía (60%), de éstos destacan los astrocitomas (2).

### **Tumores gliales**

Los gliomas son los tumores primarios más comunes del SNC, presentan características histológicas que semejan a las células gliales (tienen forma estelar y prolongaciones). Se clasifican de acuerdo con el tipo de célula tumoral. Se dividen en: astrocíticos (glioblastoma), tumores oligodendrogliales, gliomas mixtos (oligoastrocitoma) y tumores ependimarios (3).

### **Astrocitomas**

El término astrocitoma se aplica para designar a una diversidad de tumores gliales (4) y abarcan más del 50% de todas las neoplasias del SNC (1). Son los tumores primarios más frecuentes tanto en niños como en adultos. Los astrocitomas son de origen neuroectodérmico, también llamados gliomas astrocíticos, provienen de la neuroglia astrocítica. La Organización Mundial de la Salud (OMS), los ha clasificado en cuatro categorías dependiendo de su grado de malignidad en: pilocítico, difuso, anaplásico y glioblastoma multiforme (5). El astrocitoma junto con el ependimoma, son los principales tumores de la médula espinal. Los astrocitomas suelen ser grandes, pudiendo extenderse desde la parte inferior del tronco del encéfalo hasta el cono medular (1). Los astrocitomas están compuestos por células denominadas astrocitos (3).

Existen varios genes y múltiples vías involucradas en el desarrollo de los astrocitomas, por ejemplo, los receptores de cinasa de tirosina (*RTK*, por sus siglas en inglés) como *EGFR* y *PDGFR* (Receptor del factor de crecimiento epidérmico y receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas) por lo regular se encuentran sobre-activados, estimulando las vías de señalización como Ras y PI3K. *NF1* y *PTEN* son genes supresores de tumor que regulan negativamente a *Ras* y *PI3K*, respectivamente. Otros genes supresores de tumor se encuentran involucrados, entre ellos *p53* y retinoblastoma (*Rb*). Éstos regulan la función de las células troncales neurales. *BMP*, *Notch*, *Sonic Hedgehog (Shh)* y *Wnt* están regulando las vías que están activas en células troncales neurales normales, desreguladas en los astrocitomas (3).

A continuación se presenta una tabla de síndromes con tumores del SNC y cáncer hereditario (Tabla 1), incluidos astrocitomas y los genes involucrados en la tumorigénesis.

Tabla 1 Síndromes con tumores en SNC y cáncer hereditario.

Síndrome	Gen - locus	Tumor predominante
Neurofibromatosis tipo 1	<i>NF1</i> – 17q11.2	Neurofibroma, glioma óptico
Neurofibromatosis tipo 2	<i>NF2</i> – 22q12	Schwannoma, meningioma
von Hippel Lindau	<i>VHL</i> – 3q25	Hemangioblastoma capilar, carcinoma de células renales, feocromocitoma
Esclerosis tuberosa	<i>TSC1</i> - 9q34 <i>TSC2</i> – 16p13.3	Astrocitoma. Subependimoma de células gigantes.
Li-Fraumeni	<i>P53</i> – 17p13.1	Sarcomas óseos y de tejidos blandos, cáncer de mama, leucemia y PNET (Tumor del neuroectodermo primitivo).
Gorlin	<i>PTCH</i> - 9p22	Carcinoma de células basales, PNET, meningioma.
Ataxia teleangiectasia	<i>ATM</i> - 11q22-23	Tumores linfoides
Cowden	<i>PTEN</i> - 10q23	Ganglioma de cerebelo, meningioma.
Turcot	<i>GMLH1</i> – 3p21.2-p23	PNET

(6,7)

## Clasificación

La OMS clasifica los tumores primarios en cuatro estadios y en función de su morfología (Tabla 2).

Tabla 2. Clasificación de tumores primarios

Grado I Bajo grado	Benignos con potencial de proliferación mínimo y posibilidad de curación tras resección quirúrgica. Astrocitomas pilocíticos, subependimomas, ependimoma mixopapilar de la cauda equina, schwannomas y meningiomas.
Grado II Bajo grado	Tumores infiltrantes, con baja actividad mitótica, pero potencialmente recurrentes. Astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas.
Grado III Alto grado	Evidencia histológica de malignidad, presentan anaplasia, aumento de la actividad mitótica, aumento de la celularidad y polimorfismo nuclear.
Grado IV Alto grado	Alta malignidad, mitosis activa, con necrosis y por lo general se asocian con rápida evolución pre y postquirúrgica. Glioblastomas y tumores del neuroectodermo primitivo.

(8)

Por otro lado, la Clasificación Internacional de Enfermedades (*International Classification of Diseases, ICD* por sus siglas en inglés) y la OMS sugieren que los tumores malignos del SNC, se clasifiquen de acuerdo con el grado que presentan, lo cual se muestra en la Tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de tumores del SNC según la OMS

Tipo del tumor	Grado				ICD-0
	I	II	III	IV	
<b>Tumores astrocíticos</b>					
Subependimario de células gigantes	*				1
Pilocítico	*				3
De bajo grado					3
Xantoastrocitoma pleomórfico		*			3
Anaplásico			*		3
Glioblastoma				*	3

(8)

## **Incidencia Pediátrica (0-19 años de edad)**

El registro de tumores del SNC de los Estados Unidos (*Central Brain Tumor Registry of the United States* CBTRUS) afirma que, la incidencia de tumores primarios malignos y no malignos es de 4.84:100,000/año. La incidencia es mayor en mujeres en los tumores ubicados en meninges e hipófisis, mientras que en varones se presenta alta incidencia en tumores localizados en los lóbulos, cerebro, ventrículos, cerebelo, tallo, médula espinal y cauda equina *versus* mujeres (9).

La incidencia anual es de 10 y 18 casos por millón con una frecuencia de presentación de 12% (10). La razón varón:mujer es 1:1, excepto por los gliomas de bajo grado supratentoriales, en los cuales la razón es 2:1. Sin embargo, desde el punto de vista histopatológico, los tumores que prevalecen son neuroepiteliales (1).

La OMS indica que en México las causas de muerte en la infancia por enfermedades del sistema nervioso (SN) se encuentran en el quinto lugar, después de las enfermedades infecciosas y parasitarias, de las enfermedades infecciosas intestinales, sibilancias y déficit nutricional (8). En nuestro país, los tumores del SNC presentan una incidencia de 8.8 a 18.6:100,000 niños al año, de los cuales del 50 al 70% de neoplasias sólidas se diagnostican en etapas avanzadas, lo que influye en un mal pronóstico (11).

En el HPCMNSXXI del IMSS durante el periodo comprendido de 1996 – 1998 se atendió un total de 1,056 casos de neoplasias, ocupando el primer lugar las leucemias (43.9%), seguido de los tumores de SNC (12.2%) y en tercer lugar los linfomas (10.8%) (12, 13).

Mejía Aranguré y col. realizaron un estudio multicéntrico durante el período de 1980 a 1992, en los hospitales de la ciudad de México con mayor frecuencia de atención a pacientes pediátricos, incluyendo al HP CMN SXXI del IMSS, en los cuales encontró que el pico de incidencia máxima para los tumores de SNC es a los 5 años y los más frecuentes fueron los astrocitomas (33.9% de los casos); sin predominio de género; mientras que el

glioblastoma multiforme (GBM) representó el 16.4% de los casos, entre los 4 - 5 años en niñas y de 4 - 6 años en niños, con una incidencia máxima a los 6 años (14).

Algunos factores como la disfunción de genes supresores de tumor (p53), la activación de oncogenes y la interacción de éstos con el ambiente son los responsables de la formación de procesos neoplásicos, además de alteraciones citogenéticas. Sin embargo, se reporta que los procesos malignos aparecen en tejidos que han sufrido daño en su ácido desoxirribonucleico (DNA) o procesos patológicos como inflamación crónica, proliferación, distrofia, irritación y/o trauma (15).

## **Dogma Central**

### **DNA-RNA-Proteína**

A partir de que el DNA (molécula con la información necesaria para obtener copias fieles de la misma) se replica, por medio de la maquinaria específica para duplicar el material, se obtiene una cadena de RNA. Este RNA sufre modificaciones y es exportado al citoplasma, donde pasará por una serie de eventos importantes antes de ser traducido a un polipéptido y según las necesidades celulares se producirán transcripción inversa, priones o bien, diferentes moléculas de RNA mensajero, ribosomal, de transferencia, largos, pequeños nucleares, pequeños nucleolares y microRNAs (16).

### **Biogénesis de los microRNAs**

El concepto de microRNA se remonta a 1975. Actualmente se conocen más de 1,400 miRNAs, éstos se encuentran registrados en bases de datos como "mirbase.org" (15), entre otras. Los miRNAs se identificaron al observar que se requería de un RNA de 22 nucleótidos para el desarrollo post-embriónico de *Caenorhabditis elegans* (17).

Aproximadamente, el 70% del genoma se transcribe y los transcritos que codifican proteínas representan menos del 2% de éste (16). Los miRNAs son pequeñas moléculas no codificantes conservadas evolutivamente, que regulan la expresión génica a nivel post-transcripcional al degradar o reprimir a sus blancos (mRNA). Los miRNAs cuentan con aproximadamente 18 - 26

nucleótidos y regulan la transcripción de sus RNA mensajeros (mRNA) blancos al aparearse al extremo 3' UTR aunque hay algunos que lo hacen en el extremo 5'UTR (18).

Tienen un papel importante en procesos celulares como: diferenciación, progresión del ciclo celular, respuesta al estrés y apoptosis. Además, se estima que cada miRNA tiene más de un transcrito blanco, porque su apareamiento es imperfecto, lo que provoca degradación del mRNA y/o inhibición de la traducción, la mayoría de los genes que codifican proteínas son sujetos a regulación por los miRNAs. Los miRNAs disminuyen el nivel de sus transcritos blancos, así como, la cantidad de proteína codificada por éstos (19). La mayoría de los miRNAs se encuentran en regiones intrónicas, las que generalmente tienen la misma orientación (dirección, río abajo) y se expresan de manera coordinada con los genes que codifican proteínas (20).

Los cuerpos citoplasmáticos de procesamiento ricos en glicina y triptófano (GWB o *P Bodies*), son focos citoplasmáticos de células de mamíferos enriquecidos con proteína GW182, que se caracterizan por múltiples repetidos de glicina (G) y triptófano (W) y un dominio de unión clásico carboxi-terminal de RNA. Los cuerpos proveen el microambiente adecuado para el complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC) y la vía del RNA de interferencia (iRNA). Así como sitios para el procesamiento y degradación del mRNA (21).

El proceso de maduración de los miRNAs es complejo y se lleva a cabo en tres etapas: 1.- Transcripción del pri-miRNA 2.- Translocación al citoplasma 3.- Maduración. El pri-miRNA puede tener un tamaño de 1Kb y se sintetiza en el núcleo por medio de las DNA y RNA polimerasas II. En el primer paso, el pri-miRNA forma una estructura tallo-asa y se convierte en pre-miRNA cuya longitud es de 60-70pb y es el precursor del miRNA. Posteriormente, es exportado del núcleo al citoplasma por medio de la exportina-5 y finalmente, anclado en el asa por la enzima *Dicer* para formar el dúplex miRNA-microRNA. Por lo general, una de las cadenas del dúplex se degrada mientras que la otra permanece y se acumula como miRNA maduro. Los miRNAs maduros pueden interferir con la expresión de proteínas de dos formas:

- miRNA maduro asociado con RIS ubica el blanco y ancla al mRNA.
- los miRNAs maduros pueden interferir con la expresión de proteínas por medio de inhibición transcripcional (22).

El mecanismo molecular de acción de los miRNAs tiene tres posibles opciones: 1) represión de la traducción, es decir que bloquee la elongación y la progresión ribosomal sobre el mensajero, favoreciendo una terminación prematura con producción de una proteína truncada; 2) degradación del mensajero. Los RNAs mensajeros se desestabilizan por la interacción con sus miRNAs, los iRNA degradan al mRNA de manera endonucleotídica y 3) los mRNA se desestabilizan por la interacción con sus miRNAs, los iRNA degradan al mRNA de manera endonucleotídica (23).

### **miRNAs y cáncer**

El cáncer es una enfermedad multifactorial, que involucra mecanismos genéticos y epigenéticos, requieren de la activación de genes supresores de tumor y activación de proto-oncogenes. Las secuencias de DNA mutado se transcriben a mRNA para ser traducido a proteínas funcionalmente aberrantes (16). Los miRNAs son reguladores negativos de la expresión de sus genes. El efecto de un oncogen puede resultar de la desregulación positiva de un oncomir y un gen supresor puede ser desregulado de manera negativa de un mir-supresor, el cual está encargado de contener la expresión de un oncogen (15). Así mismo, la ubicación genómica influye en la expresión de los miRNAs, por ejemplo, la expresión de miR-16a, que se encuentra en el locus 13q14.3, está disminuida o ausente en la mayoría de los casos de leucemia linfocítica crónica de células B (B-CLL) mientras que la expresión de miR-26a en 3p21 y miR-99a en 21q11.2 no están involucrados en B-CLL. Estos miRNAs no están expresados o lo están muy poco en líneas de células cancerígenas de pulmón, lo cual está correlacionado con su ubicación en regiones de pérdida de heterocigocidad (*loss of heterocigocity* LOH) en el cáncer de pulmón (24).

Hoy en día, se sabe que el 60% de los miRNAs se expresan en cerebro. Dentro de los más estudiados en SNC se encuentra miR-124, que tiene una función en la diferenciación neuronal, miR-155 está ya identificado en

astrocitos, lesiones de esclerosis y respuesta inmune, regulado por citocinas, mientras que, el miR-146a asociado a inflamación está sobre expresado en los astrocitos del lóbulo temporal en epilepsia (20).

Se sabe que los siguientes miRNAs se encuentran en neoplasias del SNC. En astrocitoma pilocítico: miR-93, miR-125a, miR-129, miR-135b, miR-106b, miR-42, miR-29, miR-138, miR-299-5p y miR-34a.

En meduloblastoma: miR-92b, miR-23a, miR-27a, miR-146b, miR-22, miR-216, miR-135b, miR-217, miR-592, miR-340.

En glioblastoma: miR-617, miR-200a, miR-769-3p, miR-584, miR-537, miR-495, miR-34c, miR-10b, miR-125a y miR-10a.

Ejemplos de entidades donde los miRNAs están alterados, ya sea sobre- o sub-expresados:

- Pérdida de expresión de miR-15a en leucemia linfocítica crónica
- Pérdida de expresión de miR-16-1 en cáncer de próstata
- Sobreexpresión de miR-183 en cáncer colorectal
- Aumento de miR-21 en linaje de células de glioblastoma (18).

Tabla 4. Ejemplos de miRNAs alterados

<b>Función</b>	<b>miRNA</b>	<b>Locus</b>	<b>Rearreglo cromosómico</b>	<b>Cáncer</b>	<b>Molecular</b>
Supresor de tumor	miR-16-1/15a CD	13q14.2, intrón 2 de <i>DLEU</i>	del 13q14.3; LOH en cánceres hematopoyéticos	Regulación a la baja en B-CLL	Induce apoptosis en leucemia y disminuye niveles de BCL2 antiapoptótico
Supresor de tumor	Familia let-7	varios	LOH en cáncer de pulmón	Expresión disminuida en pulmón	<i>Let-7</i> regula a RAS en pulmón
Oncogen	miR-17/92 CD	13q31.3, intrón 3 de <i>C13orf25</i>	Amplificación en linfoma folicular	Sobreexpresión en linfoma y cáncer de pulmón	Promueve proliferación celular
Oncogen	miR-21	7q23.2, 3'UTR	Amplificación en neuroblastoma, cáncer de	Elevado en glioblastoma, mama, colon,	Aumenta apoptosis en glioblastoma,

		VMP	mama, colon y pulmón	pulmón, páncreas, próstata, estómago y colangiocarcinoma	modula a gemcitabina e induce apoptosis por medio de <i>PTEN</i>
--	--	-----	----------------------	--	--

(21)

### Secuencias blanco de miRNAs

Las secuencias blanco de los miRNAs son los mRNA, los genes y los productos finales, es decir las proteínas. De tal forma que las secuencias blanco son todas aquellas secuencias provenientes del procesamiento génico y son estos elementos que al estar alterados producen neoplasia, ya sea que el gen esté alterado, el mRNA haya sufrido algún cambio produciendo una proteína anómala o no la produce, únicamente una proteína que por lo general no está presente o que la cantidad de la proteína presente no sea la habitual.

Se ha demostrado la expresión alterada de miRNA-125b en varias neoplasias como próstata, mama y cáncer de páncreas.

miRNA-125 tiene dos isoformas en humanos miRNA-125a y miRNA-125b1/b2, ubicados en el cromosoma 19, 11 y 21, respectivamente. Sin embargo, está reportado que un solo miRNA puede tener más de un mRNA blanco, se ha logrado identificar que p53 y varios de sus reguladores río arriba son blancos de miRNA-125a y miRNA-125b. miRNA-125b parece reducir directamente los niveles de proteína de p53 por arresto transcripcional del mRNA de p53 al unirse a regiones homólogas de p53 en la región 3'-UTR (25).

Los patrones globales de miRNAs en cáncer están sub-expresados comparados con tejido sano y el silenciamiento que provocan sobre los genes supresores de tumor favorece el crecimiento de las células tumorales. Este tipo de reguladores incluye a los potenciadores de progresión tumoral.

El gen blanco de miR-10b es el grupo de *HOXD* en 2q31.1 que regulan la migración e invasión celular. miR-10 inhibe la traducción de *HOXD10*, lo que provoca un aumento en la expresión del gen prometastásico RhoC. miR-10

se encuentra sobre-expresado en glioblastoma y ésta se asocia con gliomas de alto grado (26).

La sobre-expresión de miR-92b y hsa-miR-9 indica una desregulación de los microRNAs, su pluripotencialidad y tumorigénesis. Además son útiles para distinguir tumores primarios *versus* tumores derivados de tejidos fuera del SNC (19).

Los miRNAs regulan el crecimiento celular, la diferenciación celular y el proceso de apoptosis (27). De manera específica, se conoce que miR-3910, miR-124, miR-146, miR-21 y miR-506 regulan y modifican a la anexina (28).

La anexina es una proteína anticoagulante que actúa como un inhibidor indirecto del complejo tromboplastina, por lo que está involucrada en la cascada de coagulación (29). Su gen se encuentra en el cromosoma 4q27 y se le conoce también como ancorina CII, anexina 5, ENX2, ANX5, calpobindina, endonexina, lipocortina, proteína anticoagulante placentaria 4, inhibidor de tromboplastina, ANXA5, VAC-alfa, PD4, PAP-1 y CBP-1. El gen tiene un tamaño de 29kb, 13 exones, un mRNA de 1.6kb, la proteína es de 35KD, se localiza en el citoplasma y tiene dos repetidos, un repetido de unión a calcio y otro de unión a fosfolípido (28).

La proteína codificada por el gen pertenece a la familia de las anexinas, las cuales son proteínas de unión a calcio dependientes de fosfolípidos. La anexina V es una fosfolipasa A2, proteín cinasa C inhibidora con actividad de canal de calcio y está involucrada en transducción de señales, inflamación, crecimiento y diferenciación celular (28). Así mismo, es una proteína recombinante de unión que interactúa con residuos de fosfatidilserina y por medio de éstos induce apoptosis. En la membrana plasmática hay externalización de residuos de fosfatidilserina (PS) y la anexina V es lo suficientemente sensible para detectar una sola célula en apoptosis (30).

La anexina V muestra plausibilidad biológica, ya que debido a que las células exhiben residuos de PS se puede detectar apoptosis en los tejidos, sin embargo hay estudios que demuestran que es tejido específico (31). Por lo que anexina V podría ser un marcador de apoptosis, no solo en SNC sino en otros tejidos y diferentes neoplasias, cualidad que la convierte en una buena

candidata de estudio, por lo que decidimos analizar su presencia a nivel de los microRNAs que regulan al mRNA que la codifica. Así mismo evaluar su existencia *in situ* en astrocitomas pediátricos por medio de la técnica de inmunohistoquímica (IHQ) y determinar si tiene impacto en la clínica de los pacientes (32).

El centro nacional de información para la biotecnología (National Center for Biotechnology Information, NCBI por sus siglas en inglés) define un “marcador biológico a los parámetros biológicos cuantificables y mesurables (como concentración específica enzimática, concentración específica hormonal, el fenotipo específico en una población, la presencia de sustancias biológicas) que sirven como índices para la relación salud y fisiología, como riesgo de enfermedad, alteraciones psiquiátricas, exposición ambiental y sus efectos, diagnóstico de enfermedad, procesos metabólicos, abuso de sustancia, embarazo, desarrollo de una línea celular, estudios epidemiológicos, etc (33). De modo que el marcar o identificar la proteína permite obtener una clara idea de la cantidad real de apoptosis en el tumor y sería de gran utilidad para establecer estrategias terapéuticas en forma rápida y efectiva para este tipo de patología.

En estudios previos, la proteína anexina V y su anticuerpo, anti-anexina V se han evaluado por medio de la técnica de IHQ en tumores de SNC, glioblastoma multiforme en adultos (34, 35, 36, 37), por lo que se la ha propuesto como un marcador de malignidad *in vivo* e *in vitro* (38).

### **Análisis *in silico***

Debido al desarrollo de la tecnología se ha podido avanzar en el diagnóstico y tratamiento de las enfermedades (39). Sin embargo, es necesario aprovechar las ventajas que ofrece la tecnología para la investigación y el desarrollo de nuevas técnicas. A través de programas computacionales ahora es posible construir rutas metabólicas, ilustrar la síntesis proteica y armar redes proteicas, que finalmente serán con fines académicos, de curación y prevención (40, 41). El abordaje bioinformático está al alcance de todos, ya que se encuentra disponible en bases de datos internacionales gratuitas y de uso abierto al público navegador de la red. Se puede acceder desde cualquier

equipo de cómputo de escritorio o portátil siempre y cuando se tenga red para la navegación (39).

En la actualidad y desde hace aproximadamente 10 años existen bases de datos con el genoma de microorganismos, del humano y modelos animales para experimentación *in silico* o *in vivo* (42). Todo esto, con el fin de fomentar y facilitar los estudios de investigación en todas las áreas y conocer mejor las enfermedades. El propósito de realizar un estudio *in silico* es enriquecer la información actualmente disponible, en especial para la comunidad científica dedicada al cáncer para producir nuevos y efectivos tratamientos. Las bases de datos ofrecen desde anatomía, histología, clínica, FISH, microarreglos, análisis epigenético, genético, genómico e imágenes de estudios de gabinete de pacientes, de cultivos celulares y de modelos animales para una misma entidad.

En este caso en particular se utilizó la base de datos de microRNAs “miRDB”, la cual es una base de datos en línea para la predicción de blancos de microRNAs. Está fundamentada en un programa de máquinas de apoyo vectorial, las cuales mediante esclas logarítmicas realizan las predicciones de los blancos. Todos los blancos son predichos por herramientas bioinformáticas de MirTarget2 que fue diseñada tras analizar miles de genes y su regulación por medio de microRNAs. El sitio ofrece blancos de miRNAs en cinco especies diferentes: humano, ratón, rata, perro y pollo. Además contiene anotaciones funcionales, hipervínculos para literatura internacional indexada y la secuencia del miRNA de interés (43, 44).

## **Justificación**

El cáncer en edad pediátrica representa una cifra tan importante que se refleja como un problema de salud pública. Razón suficiente para continuar su investigación en todos los aspectos posibles con el fin de contribuir para un mejor manejo médico y pronóstico para esta población. Hoy en día se sabe que el 60% de los miRNAs se expresan en cerebro por lo que son una alternativa de estudio para enriquecer los datos existentes. Además la información disponible proviene de adultos y es necesario saber si el comportamiento es similar en pacientes pediátricos. De tal forma que a través de la búsqueda *in silico* se pueden obtener proteínas blanco y observar su comportamiento en los diferentes estadios tumorales.

## **Preguntas de investigación**

¿Qué proteínas son secuencias blanco de miRNAs que se expresan en astrocitomas pediátricos?

¿La misma proteína se encuentra tanto en astrocitomas de bajo grado como de alto grado?

## **Objetivos**

- 1.- Encontrar *in silico* secuencias blanco específicas de los miRNAs en astrocitomas pediátricos.
- 2.- Confirmar la presencia de la proteína blanco en astrocitomas, mediante su validación por inmunohistoquímica.

## **Hipótesis**

Mediante el análisis *in silico* se encuentra que anexina V está presente en astrocitomas y se confirma su presencia tanto en tumores de alto como de bajo grado.

## **Material y métodos**

### **Recursos Humanos**

La sustentante del presente trabajo recepcional realizó el análisis *in silico* y la técnica de inmunohistoquímica bajo la correspondiente supervisión en cada área.

### **Población de Estudio:**

Las muestras histopatológicas correspondientes a los pacientes menores de 18 años, derechohabientes al Instituto Mexicano del Seguro Social y referidos al Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI provenientes del DF y del interior de la República Mexicana (Chiapas, Guerrero, Morelos y Querétaro) con diagnósticos de astrocitoma, confirmados por el Servicio de Patología y que cuenten con tejido fijado en parafina con suficiente cantidad para realizar la técnica de IHQ, expediente clínico y se les haya incluido en el estudio de determinación de patrones globales de microRNAs en glioblastomas pediátricos (Tesis de doctorado de la MC Ruth Ruiz-Esparza Garrido).

### **Procedimientos:**

Partiendo de los resultados de la Tesis de Doctorado de la MC Ruth Ruiz-Esparza Garrido se realizó una revisión de los siguientes miRNAs: miR-154, miR-133b, miR-29b, miR-149, miR-133a, miR-21, miR-124, miR-506 y miR-323.

### **Búsqueda *in silico***

Se realizó una revisión de los miRNAs sobre-expresados y se buscaron en una de las bases de datos de miRNAs (<http://mirdb.org/miRDB/> version 4, fuente de microRNAs: mirbase V18) en donde se encuentran descritos los miRNAs conocidos y se indican cuántos blancos tiene cada uno (43, 44).

Se introduce el número del miRNA deseado y se espera el resultado.

miRDB - MicroRNA Target Prediction And Functional Study Database

**miRDB**

Target Search  
Target Mining  
Help | FAQ  
Statistics  
Data Download  
Comments  
Links  
Citation | Policy

Choose one of the following search options:

**Search by miRNA name**  
Human

**Search by gene target**  
Human

miRDB is an online database for miRNA target prediction and functional annotations. All the targets were predicted by a bioinformatics tool MirTarget2, which was developed by analyzing thousands of genes impacted by miRNAs with an SVM learning machine. Common features associated with miRNA target binding have been identified and used to predict miRNA targets. miRDB hosts predicted miRNA targets in five species: human, mouse, rat, dog and chicken.

[Click here](#) to contact us with questions or comments about this web site. Last modified: April 03, 2012

La página muestra una lista con los blancos para el miRNA seleccionado.

miRDB Search Result

**miRDB**

There are 382 predicted targets for hsa-miR-21-5p in miRDB.

Target Detail	Target Rank	Target Score	miRNA Name	Gene Symbol	Gene Description
<a href="#">Details</a>	1	97	hsa-miR-21-5p	YOD1	YOD1 OTU deubiquitinating enzyme 1 homolog (S. cerevisiae)
<a href="#">Details</a>	2	96	hsa-miR-21-5p	KBIT1	KBIT1, ankyrin repeat containing
<a href="#">Details</a>	3	96	hsa-miR-21-5p	LCC2B5556	uncharacterized LOC285556
<a href="#">Details</a>	4	94	hsa-miR-21-5p	ZNF367	zinc finger protein 367
<a href="#">Details</a>	5	92	hsa-miR-21-5p	WTH3D1	RAB6C-like
<a href="#">Details</a>	6	92	hsa-miR-21-5p	GATAD2B	GATA zinc finger domain containing 2B
<a href="#">Details</a>	7	92	hsa-miR-21-5p	CBorf45	chromosome 8 open reading frame 45
<a href="#">Details</a>	8	92	hsa-miR-21-5p	SPRGE1	G protein-coupled receptor 64
<a href="#">Details</a>	9	91	hsa-miR-21-5p	FLEKHA1	pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide binding specific) member 1
<a href="#">Details</a>	10	91	hsa-miR-21-5p	SKP2	S-phase kinase-associated protein 2 (p45)
<a href="#">Details</a>	11	91	hsa-miR-21-5p	FRS3D1	F-box protein 11
<a href="#">Details</a>	12	90	hsa-miR-21-5p	MALT1	mucosa associated lymphoid tissue lymphoma translocation gene 1
<a href="#">Details</a>	13	88	hsa-miR-21-5p	PELL1	pellino homolog 1 (Drosophila)
<a href="#">Details</a>	14	88	hsa-miR-21-5p	PBRM1	polybrome 1
<a href="#">Details</a>	15	88	hsa-miR-21-5p	ARHGAP24	Rho GTPase activating protein 24
<a href="#">Details</a>	16	87	hsa-miR-21-5p	MATR3	matrin 3
<a href="#">Details</a>	17	86	hsa-miR-21-5p	LRP6	low density lipoprotein receptor-related protein 6
<a href="#">Details</a>	18	86	hsa-miR-21-5p	SCML2	sex comb on midleg-like 2 (Drosophila)
<a href="#">Details</a>	19	85	hsa-miR-21-5p	LONRF2	LON peptidase N-terminal domain and zinc finger 2
<a href="#">Details</a>	20	85	hsa-miR-21-5p	WWT1	WW domain containing transcription regulator 1
<a href="#">Details</a>	21	85	hsa-miR-21-5p	GTPBP10	GTP-binding protein 10 (putative)
<a href="#">Details</a>	22	84	hsa-miR-21-5p	ZNF99	zinc finger protein 99
<a href="#">Details</a>	23	83	hsa-miR-21-5p	NKIRAS1	NFKB inhibitor interacting Ras-like 1
<a href="#">Details</a>	24	83	hsa-miR-21-5p	GLUC1L	glucocorticoid induced transcript 1
<a href="#">Details</a>	25	83	hsa-miR-21-5p	CASKIN1	CASK interacting protein 1
<a href="#">Details</a>	26	83	hsa-miR-21-5p	UBE2D3	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3
<a href="#">Details</a>	27	82	hsa-miR-21-5p	WWP1	WW domain containing E3 ubiquitin protein ligase 1
<a href="#">Details</a>	28	82	hsa-miR-21-5p	TSMAX	translin-associated factor X
<a href="#">Details</a>	29	82	hsa-miR-21-5p	FRS2	fibroblast growth factor receptor substrate 2
<a href="#">Details</a>	30	82	hsa-miR-21-5p	GABRD2	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, beta 2
<a href="#">Details</a>	31	81	hsa-miR-21-5p	KCNJ10	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 10
<a href="#">Details</a>	32	81	hsa-miR-21-5p	SATB1	SATB homeobox 1
<a href="#">Details</a>	33	81	hsa-miR-21-5p	DNM1L	dynamitin 1-like
<a href="#">Details</a>	34	81	hsa-miR-21-5p	LVRM7	Lym7 homolog (mouse)
<a href="#">Details</a>	35	81	hsa-miR-21-5p	MTMR12	myotubularin related protein 12
<a href="#">Details</a>	36	80	hsa-miR-21-5p	FRS3B-LOC613	FRS3B-LOC613 readthrough
<a href="#">Details</a>	37	80	hsa-miR-21-5p	EXPH5	exophilin 5
<a href="#">Details</a>	38	80	hsa-miR-21-5p	PAIP2B	poly(A) binding protein interacting protein 2B
<a href="#">Details</a>	39	80	hsa-miR-21-5p	PFKM	phosphofructokinase, muscle
<a href="#">Details</a>	40	80	hsa-miR-21-5p	PPP1B3B	protein phosphatase 1, regulatory subunit 3B
<a href="#">Details</a>	41	80	hsa-miR-21-5p	SGK3	serum/glucocorticoid regulated kinase family, member 3
<a href="#">Details</a>	42	80	hsa-miR-21-5p	PLAG1	pleiomorphic adenoma gene 1
<a href="#">Details</a>	43	79	hsa-miR-21-5p	PLA4	phospholipase A2-activating protein
<a href="#">Details</a>	44	79	hsa-miR-21-5p	PTX2	paired-like homeodomain 2
<a href="#">Details</a>	45	78	hsa-miR-21-5p	TGFBI	transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
<a href="#">Details</a>	46	78	hsa-miR-21-5p	VCL	vinculin
<a href="#">Details</a>	47	78	hsa-miR-21-5p	CHIC1	cysteine-rich hydrophobic domain 1
<a href="#">Details</a>	48	78	hsa-miR-21-5p	ARFRP1	ADP-ribosylation factor related protein 1

Se corrobora el registro de la secuencia del microRNA.

mirdb.org/cgi-bin/target\_detail.cgi?targetID=2955

miRDB Search Result Details

## miRDB

**MicroRNA and Target Gene Description:**

<b>miRNA Name</b>	hsa-miR-21-5p	<b>miRNA Sequence</b>	UAGCUUAUCAGACUGAUGUUGA
<b>Previous Name</b>	hsa-miR-21	<b>Seed Location</b>	1422
<b>Target Score</b>	50		
<b>NCBI Gene ID</b>	<a href="#">8500</a>	<b>GenBank Accession</b>	<a href="#">NM_003626</a>
<b>Gene Symbol</b>	PPF1A1	<b>3' UTR Length</b>	1529
<b>Gene Description</b>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin), alpha 1		

**3' UTR Sequence**

```

1  AGTCTCCTGT  TGTTTACCCA  CACTACTTCT  ACAGATGATT  ATGCAGCATT  TGAATCCAAC
61  AAAGACTACA  TTTTGGAAATC  CAGTGGAAATC  TTTAATCTTG  TTAATACTTG  TTATATGGAC
121  CCTAAGATAT  TTTATTACAG  AGTTTTAAAT  TAGTGAAATA  TTCATGAATA  CCTACAGAAA
181  AAIATTTTAG  AATTTAATGT  TTCTTATATT  IATGTAAACT  TATGACTCTT  CATTATATA
241  GTTACTTACT  TTTTCATGTA  TATCCAGGCT  ATAAATATCC  TTTCAAATCA  TGTTCCTATA
301  CCTAATTTTA  GTCTTTCAAA  TGAATGTACT  GTAATGCTTG  TATGTATANA  TCCTATGAAT
361  AGAGGGCTTT  TGTAAATAT  GCATTATTTG  TAAATTCAT  TAAATTTTFA  ATGATAAACC
421  ATGACAAAGG  ATTTTACGTT  TATAAAATTA  TGACAGAAGC  CATGTGCATT  ATCCITTAGG
481  GAGCGAGCCT  AGCTCTACAG  CAATCATCCT  GAAATAAGCA  TACCTAATTT  CAAGCAATTG
541  TTGTATTTC  ATGACTGACC  TTAAGTGTAC  TTTTCTAGC  AAGAGATGCT  TTATCTGCA
601  GCATGAACAG  ATTTAAAATG  GCTGGTGTTA  AATATCAGCT  CCTAATAAGA  TGTGGACTGA
661  AAACACTATC  ACACACTAT  CCTGCAAGTC  GGCACACCA  GTGGATGAG  GCGAGAGACC
721  CTCTGGATT  GGGGAGCTTG  TCTTCAGTGG  CTGAGACTGT  GAGCTGGGAG  CAGTCTCTC
781  AGCTGGAGAG  ACTCGGGATG  GGGTAACCTG  GGGACCAGTC  TAGCCCTGAC  ACCCTCTCC
841  CTGCCCTGAC  TCCTTGGGAG  CGGGTGGAGA  GACACCCATG  TGGCTCCCT  TAGGGCCAGC
901  ACCAAGCAC  ACCCTCTAT  CCTGCAAGTC  GGCACACCA  GTGGATGAG  GCGAGAGACC
961  CAGAAAGCAG  TGCAGTCCAG  CTCTAATAAA  GGCTTATT  TTCTTATGTA  AATCATCTTT
1021  TTACATTTGT  TTGTAAACAT  GTTTAAAGAA  CGAACCTAGT  GGGACATTTT  TAGACTTTGA
1081  TGCTCTAGCC  ATTTTGGATT  GGTAAAGTTG  CAGATGTGGC  TTTTACTTTT  TAAATGGCAT
1141  ATTAACAGCC  CAGCAAGTG  TGTGAGACCA  TGGCTGGTTA  TTTATGTGTC  AGCAGATCCA
1201  GAGACAGAGG  CAGCCTGTCT  TTTAGTTGG  TTTCTGCTTT  TAATTTACTT  GTACAAATCA
1261  TTGTACTGCT  TCTGTTTTTC  TATTAATCTT  TTGTCAACT  CCTGATTATG  TAACAAAGTA
1321  TGTACAGTCT  ACTTTTGAAC  TATTTTATC  ACAGTATTAT  TTATTGCTTT  CTTTCAATAA
1381  AGTACTGAG  CATTTCAC  TGCCAATGAA  GAATACTGAG  AATAAGCTCT  AACTGTTTGG
1441  GAGGGCAGTG  TCAACATATG  GAAATTTGAT  TACAGAGTGC  AATTGACAGA  ATAAAGCAGC
1501  CAGGAGATGA  AAAAAAAAAA  AAAAAAAAAA

```

Se busca el blanco de cada microRNA citado y corroborado en una segunda base de datos exclusiva de SNC (<http://human.brain-map.org/>) (45).

Microarray Data :: Allen Brain Atlas: Human Brain

human.brain-map.org/

Apple Yahoo! Google Maps YouTube Wikipedia Noticias Populares Subtítulos...Películas

ALLEN INSTITUTE for BRAIN SCIENCE  
Fueling Discovery

Publications Contact Us

Home Mouse Brain Developing Mouse Brain **Human Brain** Mouse Connectivity More

Microarray ISH Data MRI Download Brain Explorer Documentation Help

Enter Gene Name, Gene Symbol, NCBI Accession Number or Entrez Gene ID

Gene Search  Search

Differential Search  Show exact matches only

**Browse by Gene Category**

Alzheimer disease Alzheimer disease amyloid secretase pathway Alzheimer disease presenilin pathway Anion channel Autism Cadherin signaling pathway Calcium channel Calcium-mediated signaling Cyclic nucleotide-gated ion channel Depression EGF receptor signaling pathway Epilepsy FGF signaling pathway GABA receptor G-protein coupled receptor Hedgehog signaling pathway Huntington disease Hypoxia response via HIF activation Inflammation mediated by chemokine and cytokine signaling pathway Ion channel activity Ligand-gated ion channel activity MAPKKK cascade Mental retardation Microcephaly Nervous system development Neurological

**Allen Human Brain Atlas**

**Search the data**

Use Gene Search to find microarray data for a specific gene of interest [\[more\]](#)

Browse data by gene category by clicking on a term in the tag cloud

Use Find Correlates to find genes with similar spatial expression profiles to a gene selected from Gene Search or Browse returns [\[more\]](#)

**About the Microarray data**

An "all genes, all structures" gene expression survey in multiple adult control brains.

- > 62,000 gene probes per profile
- ~ 500 samples per hemisphere across cerebrum, cerebellum and brainstem
- Data mapped with histology into unified

Por último, se verifica el registro, detalles y minucias de las proteínas en análisis en la página del Instituto de Ciencias Weizmann (<http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANXA5&search=annexin+>) (46). Se ingresa el gen deseado y aparece un listado de todo lo relacionado con la búsqueda.

The screenshot shows the GeneCards V3 website interface. At the top, there are navigation links for Home, GeneCards Guide, Suite, Terms and Conditions, About Us, User Feedback, and Mirror sites. A search bar is present with the text "Search by (keyword(s)) for". Below the search bar, there are several sections: "GeneCards Suite" with icons for GeneDecks, GeneALaCart, GeneLor, GeneNote, GeneAnnot, and GeneLide; "Explore GeneCards" with a search bar and "Advanced Search" and "About V3 Search" links; "About GeneCards®" describing the database; "View Sample Gene" for ERBB2 (v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) with a "GeneCards Sections" grid; and "View Random Gene" for SNORA78 (small nucleolar RNA, H/ACA box 78). A statistics table at the bottom shows columns for Category, Number of Genes\*, and Example Genes.

La base de datos proporciona los nombres alternos registrados para el mismo gen, su función, locus, información sobre su mRNA, extensión, peso, cantidad de exones e intrones y modificaciones post-traduccionales, así como referencias bibliográficas del gen.

The screenshot shows the detailed view of the ANXA5 gene on GeneCards. The page title is "ANXA5 Gene - GeneCards | Protein | Antibody". It includes several sections: "Aliases & Descriptions" listing various names like annexin A5, ENX2, and ANXA5; "Entrez Gene summary for ANXA5" providing a brief overview of the protein's function; "Regulatory elements" listing transcription factor binding sites; and "Genomic Location" showing the gene's position on chromosome 4. The page also features logos for various databases and services like UniProt, Ensembl, and GeneCards.

## Confirmación *in situ*, inmunohistoquímica.

Se solicitó el anticuerpo (<http://www.abcam.com/Annexin-V-antibody-ab54775.html>) (29).

The screenshot shows the Abcam website product page for Anti-Annexin V antibody (ab54775). The page includes a search bar, navigation menu, product details, and a table of properties.

**Anti-Annexin V antibody (ab54775)**

Code: ab54775 | Size: 100 µg | Availability: In Stock

**PRODUCT PARTNER**

ECL Western Blotting Substrate Kit - 50 Tests (ab55623)

RELATED PRODUCTS

Secondary antibodies

Isotype controls

REASSURANCE, REFUNDS & REPLACEMENTS

If your product does not perform as described on this datasheet, we will refund or replace your product...

Read our guarantee >

Property	Value
<b>Product name</b>	Anti-Annexin V antibody
<b>Description</b>	Mouse monoclonal to Annexin V
<b>Tested applications</b>	IP, WB, ICC/IF, IHC-P, Flow Cyt
<b>Cross reactivity</b>	Reacts with Human
<b>Immunogen</b>	Recombinant full length protein, corresponding to amino acids 1-321 of Human Annexin V
<b>Form</b>	Liquid
<b>Storage instructions</b>	Shipped at 4°C. Upon delivery aliquot and store at -20°C or -80°C. Avoid repeated freeze / thaw cycles.
<b>Storage buffer</b>	Preservative: None PBS, pH 7.2
<b>Concentration</b>	100 µg at 1mg/ml
<b>Purity</b>	Protein G purified
<b>Clonality</b>	Monoclonal
<b>Isotype</b>	IgG1
<b>Light chain type</b>	kappa

**Western blot - Anti-Annexin V antibody (ab54775)**

Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) - Anti-Annexin V antibody (ab54775)

Immunocytochemistry/Immunofluorescence-Annexin V

En las especificaciones del fabricante, se menciona que el tejido control es colon humano.

The screenshot shows the Abcam website product page for Anti-Annexin V antibody (ab54775). The page includes a search bar, navigation menu, product details, and a table of properties.

**Immunohistochemistry (Formalin/PFA-fixed paraffin-embedded sections) - Anti-Annexin V antibody (ab54775)**

Annexin V antibody (ab54775) used in immunohistochemistry at 3µg/ml on formalin fixed and paraffin embedded human colon.

El tejido control para este estudio fue una muestra de colon cadavérico de un individuo masculino de 6 meses de edad en quien se demostró la causa de muerte fue intoxicación por acetaminofen. Se demostró integridad del tejido intestinal por lo que fue susceptible de utilizarse. El tejido se obtuvo gracias a la cooperación del Servicio Médico Forense del DF bajo previa autorización del director, el Dr. Felipe Edmundo Takajashi Medina y aprobación del protocolo en cuestión por la misma institución. Se estandarizó la técnica con tejido control y se procesaron las muestras con la técnica de IHQ para detectar la proteína blanco, siguiendo los lineamientos estándar y bajo estricta supervisión técnica.

Se identifica el tipo de tumor por medio de tinción H&E, se calculó la concordancia intraobservador de las variables que se muestran en la tabla 5.

Una vez hechos los cortes del tejido tumoral en parafina (5micras), se procedió a realizar la técnica de IHQ con el sistema peroxidasa-antiperoxidasa, de acuerdo con las recomendaciones de los proveedores.

Brevemente el tejido se fijó utilizando formol amortiguado al 10%, utilizando porta objetos con poly-L lysina. (0.1% en agua destilada). El tejido fue desparafinado en una estufa de calor seco a 60° C durante 30 minutos o el tiempo que fue necesario y rehidratado con xilol, alcoholes a diferentes concentraciones (5 minutos en cada una de las soluciones). Posteriormente se llevó a cabo la recuperación antigénica mediante DAKO *target retrieval solution* al 10% durante 20 minutos en una olla express. Una vez que se enfrió a temperatura ambiente se retiró del recuperador y se enjuagó con agua destilada ó PBS. Se bloqueó por 10 minutos con DAKO *peroxidase blocking* al 3% cubierto de la luz y se lavó con agua destilada ó PBS.

Los cortes fueron incubados en una cámara húmeda durante 20 minutos con los anticuerpos primarios: Anti-annexina V (1:100 ABCAM, Anticuerpo monoclonal de ratón). El anticuerpo primario fue detectado con un anticuerpo secundario biotinilado. Una vez aplicado, se incubó durante 30 minutos con estreptavidina conjugada (peroxidasa de rábano). Posteriormente se reveló

con el cromógeno diamino-bencidina (DAB) por 5 minutos y finalmente se contrastó con hematoxilina.

El tejido fue deshidratado con alcoholes de menor a mayor concentración (50%, 70% y 100%) y xilol. Las preparaciones se sellaron con resinas.

## **Diseño del estudio**

### **Piloto**

Se investiga por primera vez si los resultados *in silico* de miR-21 se encuentran presentes en astrocitomas infantiles.

### **Descriptivo**

Se describe la presencia de la proteína blanco del microRNA en los astrocitomas analizados.

### **Transversal**

Medición en un determinado momento de la enfermedad.

### **Analítico**

Correlaciona la expresión de la proteína con el miRNA y el estadio tumoral.

### **Ciego**

Los observadores desconocen que hay más de un observador para calificar las mismas variables.

## **Tamaño de muestra**

Serán los pacientes que hayan sido estudiados en la Tesis de Doctorado de la MC Ruth Ruiz-Esparza Garrido que cuenten con previa determinación de patrones globales de microRNAs en glioblastomas pediátricos, con diagnóstico confirmado de astrocitoma por el servicio de patología, con suficiente tejido fijado en parafina y que fuera adecuado para realizar la técnica de IHQ.

## **Criterios de selección**

- **Criterios de Inclusión**

Pacientes con estudio previo de determinación de patrones globales de microRNAs y proteómica.

Ambos sexos

Entre 1-18 años de edad

Casos con tejido en parafina

Expediente clínico completo

Diagnóstico histopatológico de astrocitoma

Carta de consentimiento firmada por los padres antes de la resección del tumor.

- **Criterios de no inclusión**

Muestras de pacientes que hayan presentado otra enfermedad asociada con síndromes de cáncer.

- **Criterios de eliminación o exclusión**

Muestra que posterior a la IHQ sea de una estirpe histológica diferente a pesar de tener microRNA previo.

Muestra que presente cambios por autolisis.

## **Definición y Clasificación de Variables**

- **Variables Independientes**

### **1. microRNA**

Definición conceptual: es una pequeña molécula de hasta 28 nucleótidos, no codificante conservada evolutivamente que regula la expresión génica a nivel post-traducciona al degradar o reprimir a sus blancos.

Definición operacional: actualmente se considera que pueden actuar como oncomir o bien, como mir-supresor de tumor por lo que están involucrados en muchas neoplasias.

Categoría: Cualitativo

Escala: Nominal

1.- Presente (+) 2.- Ausente (-)

## 2. Edad

Definición conceptual: Tiempo de vida en años.

Definición operacional: Edad cumplida en años

Medición: en años.

Categoría: Cuantitativa: continúa.

## 3. Sexo

Definición conceptual: Características fenotípicas que califican al sujeto en género femenino o masculino

Definición operacional: Género fenotípico

Medición: Masculino / Femenino

Categoría: Cualitativa: nominal.

## 4. Histología del Tumor.

- Definición conceptual: de acuerdo con la clasificación de tumores del SNC de la OMS, los astrocitomas dependiendo de su patrón histológico se clasifican en:

Grado (WHO)	Designación	Características
I	Pilocítico	Patrón bifásico con proporciones variables de células bipolares compactas con fibras de Rosenthal y células multipolares sueltas con microquistes y cuerpos granulares. Escasas mitosis, ocasionales núcleos hiper cromáticos, y escasa proliferación microvascular
II	Difuso	Astrocitos neoplásicos con diferenciación fibrilar ó gemistocítica en un fondo microquístico. La celularidad está moderadamente incrementada, es monótona y ocasionalmente presenta atipia nuclear.
III	Anaplásico	Astrocitoma infiltrante con incremento de la celularidad con atipia nuclear y actividad mitótica.
IV	Glioblastoma Multiforme	Astrocitos pleomorfos poco diferenciados con marcada atipia nuclear y actividad mitótica. Proliferación vascular prominente de vasos glomeruloides y festoneados. Abundante necrosis.

(8)

- Definición operacional: Se revisaron las laminillas teñidas de manera rutinaria (H&E), se evaluó el tipo histológico de acuerdo con las características previamente descritas.

Categoría: Cualitativa

Escala: Ordinal

Pilocítico =1

Fibrilar = 2

Anaplásico =3

Glioblastoma Multiforme = 4

- **Variables Dependientes**

**1.- Proteína**

Definición conceptual: Anticuerpo monoclonal que identifica una proteína completamente recombinante, correspondiente a 1.32 amino ácidos de la Annexina V Humana. Esta proteína es un anticoagulante que actúa como inhibidor indirecto del complejo de tromboplastina, involucrado en la cascada de coagulación, localizada en citoplasma y es marcador de células en apoptosis.

Definición operacional: Se valoró la expresión a nivel citoplasmático en tejidos fijados en parafina, en cortes a 5 micras de espesor para su manejo con soluciones químicas y con tinciones de IHQ.

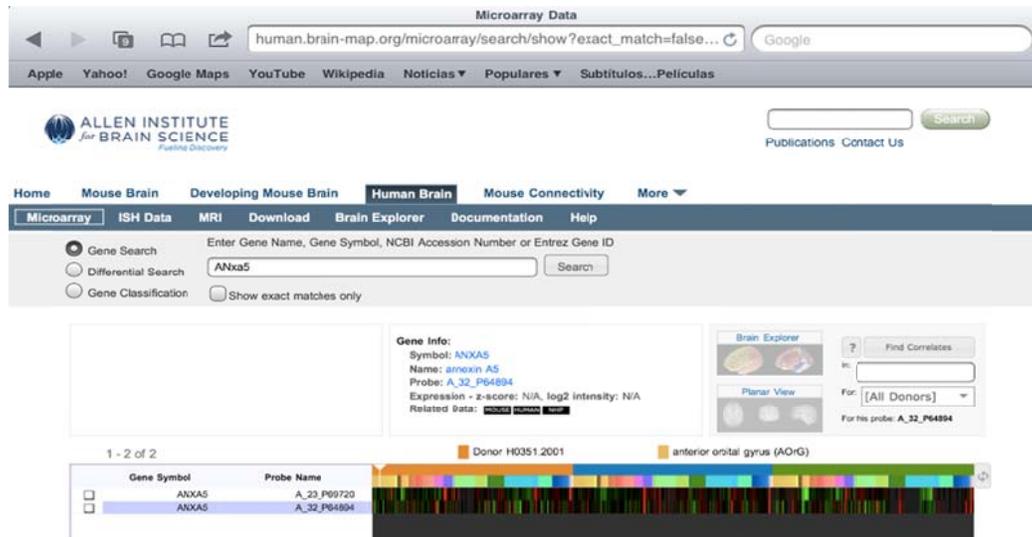
Categoría: Cualitativa

Escala Nominal

1.- Presente (+) 2.- Ausente (-)

## Resultados

Se verificó que el gen predicho por miR-21, es decir ANXA5, se encontrara registrado en esta base de datos de sistema nervioso central tanto en tejido sano como en el microarreglo de glioblastoma.



Se muestra la lista de resultados relacionados con la anexina V.

The screenshot shows the GeneCards website search results for ANXA5. The search results are sorted by relevance score. The table below lists the related genes and their details.

Symbol	Description	Category	GI/FIS	GC id	Score
ANXA5	annexin A5	protein-coding	70	GC04M122589	12.57
ANXA8	annexin A8	protein-coding	55	GC10P048255	2.55
ANXA8L1	annexin A8-like 1	protein-coding	38	GC10M047157	2.42
ANXA2P2	annexin A2 pseudogene 2	pseudogene	34	GC09P033632	2.05
ANXA8L2	annexin A8-like 2	protein-coding	45	GC10P047746	1.84
ANXA9	annexin A9	protein-coding	56	GC01P150954	1.42
ANXA7	annexin A7	protein-coding	62	GC10M075135	1.16
ANXA3	annexin A3	protein-coding	62	GC04P079403	1.16
ANXA13	annexin A13	protein-coding	57	GC08M124762	0.87
ANXA10	annexin A10	protein-coding	49	GC04P169013	0.87
ANXA1	annexin A1	protein-coding	70	GC09P075766	0.84
ANXA4	annexin A4	protein-coding	62	GC02P068947	0.84

En la siguiente tabla (Tabla 5) se ilustran los miRNAs analizados y los resultados de los genes candidatos *in silico*.

Tabla 5 miRNAs y genes

miRNA estudiado en mirdb.org miR-X Total de genes en SNC/Total de genes regulados por el miRNA	Gen blanco candidato
miR-154 17/270	
miR-133b 15/215	<i>EFEMP1</i>
miR-29b 19/371	
miR-149 12/238	
miR-133a 13/214	
miR-124 21/481	<i>ANXA4</i>
miR-323 5/94	
miR-506 3/526	<i>ANXA11</i>
miR-21 10/382	<i>ANXA5</i>
Total de miRNAs analizados =	2,791
miRNAs seleccionados =	100
miRNAs candidatos =	miR-21, miR-124, miR-506
miRNA elegido =	miR-21

Por lo tanto, por medio del análisis *in silico* se evaluaron 2,791 genes para buscar la posible relación con los miRNAs propuestos, sin embargo solamente miR-21 tiene significancia estadística por lo que se eligió como candidato. Aún cuando miR-124 y miR-506 también regulan miembros de la familia de las anexinas, se descartaron por no haber mostrado significancia estadística en estudios previos.

Con esta información se eligió a la anexina V, se seleccionó con base en la frecuencia de aparición, es decir, los tres miRNAs coincidieron con la regulación de la proteína como producto blanco final. Además que actualmente a la anexina se le considera un marcador biológico para apoptosis, por lo que puede ser una herramienta diagnóstica para la identificación de células en apoptosis y en un futuro normal tratamiento.

Se eliminó un paciente, el caso PQ 155-10 debido a que el diagnóstico confirmatorio fue determinado como ependimoma.

La Tabla 6 muestra la base de datos para la obtención de los resultados del análisis con el software SPSS versión 17.

**Tabla 6 Registro de lectura de Inmunohistoquímica para anti-anexina V**

Presencia de anexina V	Evaluación de Intensidad (I): 0, 1, 2 y 3.	Porcentaje (%)	Tipo de Tumor
<b>ANXA5</b>			
+ = positivo	0 = No tiñó	Número aproximado de células que se hibridaron con el anticuerpo.	1 Pilocítico
- = negativo	1 = < que el control		2 Fibrilar
	2 = igual que el control		3 Anaplásico
	3 = > que el control		4 Glioblastoma

**Observadores:**

<u>Observador A Evaluador</u>	<u>Observador B Evaluador</u>	<u>Observador C Revisor</u>
-------------------------------	-------------------------------	-----------------------------

Para asegurar la confidencialidad de la muestra para nuestro estudio se retira el número de PQ y se enumeran las muestras en orden ascendente del 1 al 7 en el siguiente orden y en lo sucesivo se mencionarán conforme al número asignado:

- Control
1. 1405-07
  2. 833-07
  3. 1181-07
  4. 865-07
  5. 234-10
  6. 179-10
  7. 622-10

No. de muestra	Edad actual (años)	Edad al diagnóstico (años)	Género Masculino (M) / Femenino (F)	Localización y tipo de tumor	Sobrevida al momento del estudio Si / No	ANXA5	Intensidad (I)	No. de células
0 Control A, B y C	finado	6meses	M	Colon sano		+	2	20
1	9	4a1m	F	Fosa posterior	Si			
A				1		+	2	7
B				2		+	1	5
C				2		+	2	6
2	7a5m	2	M	Fosa posterior	Si			
A				1		+	2	3
B				1		+	2	3
C				1		+	1	1
3	18	12	F	Fosa posterior	ND			
A				4		+	2	1
B				4		+	2	2
C				4		+	2	1
4	15	10	F	Tallo	Si			
A				2		-	0	0
B				2		+	3	2
C				3		+	2	1
5	4	1a6m	F	Nervio óptico izquierdo	Si			
A				1		+	2	6
B				2		+	1	6
C				1		+	1	1
6	18	15	M	Lóbulo frontal izquierdo	Si			
A				1		+	1	10
B				2		+	2	8
C				2		+	1	2
7	9	2	F	Lóbulo temporal derecho	Si			
A				1		+	2	5
B				1		+	2	8
C				1		+	2	2

Los resultados del análisis *in silico* demuestran que los especímenes sobreexpresan miR-21, por lo que se encontró menor cantidad de anexina V con respecto al control mediante su comprobación por IHQ.

A continuación se muestran algunas fotografías representativas de los casos para ilustrar la positividad de la proteína en las siguientes muestras: muestra control positivo, muestra # 1, # 2, # 3 y # 6 como control negativo interno.









Observamos que el 42% de los tejidos tumorales estudiados tuvieron una expresión de anexina V menor que el control y el resto igual que el control. No encontramos ausencia de la expresión en ninguna laminilla ni expresión mayor al control.

Sin embargo, se observó que el 57% de los casos fueron femeninos y el 42% masculinos. Por rango de edad de aparición se encontró que el 28% tienen menos de 4 años, el 14% 1 año, el 28% 9 años y el 28% 16 años.

En cuanto a la concordancia del observador A vs observador B fue del 60%, del A vs C fue del 70% y del observador B vs el observador C fue del 100%. La correlación en el conteo del número de células por el observador A vs el observador B fue de 0.781 ( $p= 0.03$ ), mientras que entre el observador B vs el observador C fue de 0.6086 ( $p= 0.147$ ). Finalmente la correlación entre el observador A vs el C fue de 0.836 ( $p=0.0189$ ). La asociación en la intensidad del observador A vs el B fue de -0.670 ( $p=0.0990$ ), mientras que entre el observador A vs C fue de 0.180 ( $p=0.699$ ) y del observador C vs B fue de -0.161 ( $p=0.730$ ) lo cual traduce que no hay una correlación estadísticamente significativa.

## Discusión

Si bien miR-21 está sobre expresado es probable que la presencia de anexina V sea menor en tumores de bajo grado con respecto al control, lo cual fue consistente con lo que observamos en las muestras de los pacientes con IHQ. La relación miRNAs y proteínas a nivel de expresión no es necesariamente directa, ya que las proteínas están sujetas a modificaciones postraduccionales que las regulan. De tal forma que no es una constante el encontrar el blanco final del miRNA estudiado en un tejido determinado. Se sabe que la anexina V está presente en glioblastomas de adultos, pero aún no hay reportes de su presencia en astrocitomas pilocíticos o fibrilares y su presencia se considera ya un marcador biológico para apoptosis. En nuestro estudio encontramos que la anexina V está presente en tejido tumoral pediátrico tanto en tumores de bajo grado como en los de alto grado, lo cual al hacer una observación de la muestra estudiada se vió que los pacientes analizados siguen vivos. Esta observación puede llevarnos a la premisa que si hay presencia de anexina V en el tumor, el paciente tendrá sobrevida aún cuando el astrocitoma sea de alto grado.

En esta ocasión logramos comprobar la presencia de la proteína, obtenida a partir del análisis *in silico* y podemos confirmar que no solamente se encuentra en tejido tumoral de adulto sino también en pediátrico, lo que indica que la neoplasia debe tener alguna similitud en cuanto a su comportamiento, puesto que presentan la misma proteína aún en estadíos diferentes.

Se sabe que miR-21 actúa como un oncogen, reprime el crecimiento celular y provoca arresto mitótico. Las células cancerosas sobreviven porque la respuesta a la apoptosis se encuentra alterada o bien, porque evaden los puntos de control del ciclo celular, por lo que hay un crecimiento desmedido de las células neoplásicas y proliferación de las mismas. Sin embargo, miR-21 aparentemente está regulando el mRNA de la anexina V y la encontramos en tejido tumoral, por lo que si hay anexina V y apoptosis presente entonces

habrá mejor pronóstico para los pacientes. Estos resultados podrían verse reflejados en un futuro sobre el manejo clínico que se realiza a los pacientes, ya que si tras la toma de biopsia se realiza inmunohistoquímica para la anexina V y se observa positividad en las muestras habrá que ver la relación con la apoptosis señalada por la anexina V y la mejor respuesta al tratamiento.

Existen estudios donde se ha probado la presencia de anexina V en tumores del SNC, en específico en glioblastomas. Estos estudios han usado como base cultivos celulares de glioblastomas de tejido adulto y se ha empleado citometría de flujo y para determinar a esta proteína. Por lo que, a nuestro saber y tras revisión de la literatura este sería el primer reporte de anexina V en tejido tumoral en fijado en parafina de astrocitomas pediátricos, donde por medio de la técnica de IHQ y partiendo de bases de datos (análisis *in silico*) se ha logrado demostrar su presencia.

### **Perspectivas**

Este proyecto abre líneas de estudio por investigar:

- Realizar el seguimiento a los pacientes de este trabajo para observar la evolución y hacer una nueva medición de anexina v post-tratamiento.
- Evaluar la expresión de anexina V con respect a los diferentes quimioterápicos utilizados.
- Aumentar el nivel de apoptosis a través de la manipulación de miR-21.

## **Conclusiones**

El análisis *in silico* nos indicó que la anexina estaría presente en los glioblastomas sin embargo también se encontró en astrocitonas de bajo grado en mayor cantidad que en los de alto grado. Todos los pacientes de la muestra siguen vivos aún cuando en algunos casos la resección tumoral no fue completa y han presentado progresión tumoral. Sin embargo, no podemos precisar si el tratamiento es correctamente el efectivo o si bien, si se debe a que miR-21 está expresando anexina V en este tejido y por medio de apoptosis hay mejor respuesta al tratamiento.

## Referencias bibliográficas

1. Niculescu CE, et al. Supratentorial pilocytic astrocytoma in children, Romanian. Journal of Morphology and Embryology 2010, 51(3):577-580.
2. López-Aguilar E, et al. Sobreexpresión Bcl-2 como factor pronóstico en niños con astrocitomas, GAMO Vol.10 Núm 1, 2011, 6-12.
3. Sheila R, et al. Signaling in Malignant Astrocytomas: Role of Neural Stem Cells and Its Therapeutic Implications, Clinical Cancer Research 2009: 15(23).
4. Karamchandani J, et al. Brain Tumors; Vogel H. Nervous System. Cambridge Illustrated Surgery Pathology, Stanford University School of Medicine, Cambridge University Press 2009: 24-385.
5. Forsheo T, et al. Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas, J Pathol 2009; 218: 172-181.
6. Emery and Rimoin's, Principles and Practice of MEDICAL GENETICS, Vol. 4, fifth edition.
7. Tonn JC, et al. Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas. Cancer Res 61: 7039-7043.
8. Louis DN, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, 4<sup>th</sup> edition, International Agency for Research on Cancer Lyon, 2007.
9. CBTRUS (2011). CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2004-2007. Source: Central Brain Tumor Registry of the United States, Hinsdale, IL. website: [www.cbtrus.org](http://www.cbtrus.org)
10. Wrensch M, et al. The molecular epidemiology of gliomas in adults, Neurosurg Focus 2005: 19 (5):E5.
11. Aguilar Solano AM, et al. Guía de Práctica Clínica Tratamiento de Astrocitomas y Meduloblastoma en Niños y Adolescentes en Tercer

Nivel de Atención, México Instituto Mexicano del Seguro Social; 2009.

12. Fajardo–Gutiérrez A, et al. Frecuencias de neoplasias malignas en niños atendidos en hospitales del Distrito Federal. Estudio multicéntrico. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 1996; 53: 57–66.
13. Fajardo–Gutiérrez A, et al. El cáncer, un problema de salud que incrementa en los niños mexicanos. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 2001; 58: 721 –42.
14. Mejía JM, et al. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. *Rev Med IMSS* 2005; 43 (1): 25-37.
15. Hu H, et al. MicroRNAs: new players in the DNA damage response, *Journal of Molecular Cell Biology* (2010), 1–9 doi:10.1093/jmcb/mjq042
16. Pukkila JP, et al. *Alberts Biología Molecular* 4ta edición. *Encyclopedia of Life Sciences, central dogma*, 2001.
17. Esteller M. Epigenetics in Cancer, *N ENGL J MED* 2008;358:1148-59.
18. Gomes C, et al. MicroRNA and oral cancer: Future perspectives, *Oral Oncology* 2008; 44: 910-914.
19. Nass D, et al, MiR-92 and miR-9/9 Are Specifically Expressed in Brain Primary Tumors and Can Be Used to Differentiate Primary from Metastatic Brain Tumors, *Brain Pathology* 2009; 19:375-383.
20. Mor E, et al, Species-specific microRNA roles elucidated following astrocyte activation, *Nucleic Acids Research*, 2011; 1-14.
21. Agostini M, et al, miRNAs in colon and rectal cancer: A consensus for their true clinical value, *Clinica Chimica Acta* 2010; 411:1181-1186.
22. Mosser JJ, et al. The MicroRNA and MessengerRNA Profile of the RNA-induced Silencing Complex in Human Primary Astrocyte and Astrocytoma Cells. *Plos ONE* 2010; 5(10):e13445.doi:10.1371/Journal.pome.0013445
23. Jeanteur P, miARNs et cancer, *Bulletin du cancer*, 2010; 97(11): 1231-1239.

24. Calin GA, et al. MicroRNAs and chromosomal abnormalities in cancer cells, *Oncogene* 2006; 25: 6202-6210. doi:10.1038/sj.onc.1209910
25. Zhang Y, et al, MicroRNA 125a and its regulation of the p53 tumor suppressor gene, *FEBS Letters*, 2009; 583: 3725-3730, 2009
26. Niels T. Oskam, et al, A region in common deletion in 22q13.3 in human glioma associated with astrocytoma. *Int. J. Cancer*: 2009; 125:1407-1413.
27. Busch AK, et al. Analysis of microRNA function using miRCURY LNA™ microRNA knockdown probes, *Biochemica* 2006; 2:28-30.
28. [www.genecards.org](http://www.genecards.org) libre acceso
29. [www.abcam.com](http://www.abcam.com) libre acceso
30. Elmore S, et al, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol Pathol* 2007; 35:495.
31. Hiep P.H., et al. Evaluation of cell surface expression of phosphatidylserine in ovarian carcinoma effusions using the annexin-V/7AAD assay. *Am J Clin Pathol* 2009, 132:756-762 2009.
32. Papagiannakopoulos T, et al, MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells, *Cancer Res* 2008; 68:8164-8172.
33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mesh/68015415> libre acceso
34. Rajcevic U, et al, iTRAQ-based proteomics profiling reveals increased metabolic activity and cellular cross-talk in angiogenic compared with invasive glioblastoma phenotype, *Molecular & Cellular Proteomics* 2009; 8:2595-2612.
35. McNeill-Blue C, et al, Apoptosis mediated by p53 in rat neural AF5 cells following treatment with hydrogen peroxide and starusoprine, *Brain Research* 2006; 1112:1-15.
36. Yadav A, et al, Monosomy of chromosome 10 associated with dysregulation of epidermal growth factor signaling in glioblastomas, *JAMA* 2009; (3)302:276-289.

37. Shi KV, et al, Imagin taxane-induced tumor apoptosis using PEGylated, in-labeled annexin the journal of nuclear medicine 2004; 108-115.
38. Nygaard S, et al, Expression of annexin II in glioma cell lines and in brain tumor biopsies, Journal of Neuro-Oncology,1998; 38:11-18.
39. Joel T Dudley, et al Atul J Butte *In silico* research in the era of cloud computing *Nature Biotechnology* 2010; 28: 1181–1185 doi:10.1038/nbt1110-1181.
40. Feist, A.M., et al. Reconstruction of Biochemical Networks in Microbial Organisms, Nature Reviews Microbiology, 2009; 7(2).
41. Lewis NE, et al. Large-scale in silico modeling of metabolic interactions between cell types in the human brain, Nature Biotechnology, 2010; 28 (12):1279–1285.
42. Portnoy, V.A., et al. Aerobic Fermentation of D-Glucose by an Evolved Cytochrome Oxidase Deficient Escherichia coli Strain, Appl Environ Microbiol. 2008;74(24):7561-9.
43. Xiaowei Wang, et al. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. Bioinformatics 2008; 24(3):325-332.
44. Xiaowei Wang. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. RNA 2008;14(6):1012-1017.
45. Allen Brain Atlas Resources [Internet]. Seattle (WA): Allen Institute for Brain Science. ©2009. Available from: <http://www.brain-map.org>.
46. <http://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=ANXA5&search=annexin> libre acceso

Ejemplos de sitios exclusivos para bases de datos *in silico* de libre acceso:

<http://gcrp.ucsd.edu>

<http://cci.emory.edu/cms/projects/ISBTRC.html>

[http://www.5amsolutions.com/resources/featuredprojects/in\\_silico.php](http://www.5amsolutions.com/resources/featuredprojects/in_silico.php)

## **Anexos**

### **Aspectos éticos**

Carta de consentimiento informado firmada por los padres antes del evento quirúrgico, los cuales autorizan la toma de tejidos y el manejo del espécimen por diferentes métodos para un diagnóstico definitivo.

Es un estudio con riesgo menor de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana en materia de Investigación en Salud, dado que las muestras de este proyecto son tejidos que forman parte del banco de tejidos del Dr. J. Enrique López Aguilar.

Las muestras se han obtenido de tejido proveniente de biopsias, lo que forma parte del proceso para el diagnóstico y determinación del tratamiento.

Debido a que se utilizó tejido de especímenes archivados en el servicio Patología, enviados para examen de rutina y que los datos obtenidos del expediente serán manejados en forma confidencial. Para mantener la confidencialidad de los casos se manejó el espécimen por número de pieza quirúrgica. Esto es, al momento de realizar la IHQ, todos los tejidos van enumerados con el número original asignado cuando se recibió en el servicio de patología y para salvaguardar la identidad del individuo en el estudio se enumeraron en orden descendente del 1 al 7.

A continuación se muestra la hoja de consentimiento informado que firman los padres o tutores de los pacientes para la toma de biopsia y manejo de la muestra para estudios posteriores antes de la resección quirúrgica.

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMN SXXI**

**CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA LA CONSERVACIÓN DE MUESTRA DE  
TUMOR CEREBRAL EN EL BANCO DE TEJIDOS PARA ESTUDIOS MOLECULARES**

Nombre del paciente \_\_\_\_\_ Edad \_\_\_\_\_  
No. de afiliación \_\_\_\_\_

Después de haber leído el presente documento y de haber recibido las aclaraciones necesarias. Yo \_\_\_\_\_ padre ( ) madre ( ) tutor ( ) del menor AUTORIZO al personal médico y paramédico del hospital de Pediatría para conservar un fragmento del tumor cerebral de mi paciente para realización de estudios moleculares posteriores.

RIESGOS estoy enterado (a) de que el conservar una muestra del tumor no origina ningún riesgo a mi paciente, ya que se tomará de la pieza que se extrae durante la cirugía.

La conservación del tejido se hará en el banco de tumores del sistema nervioso central para estudios moleculares futuros y el resto de la pieza se enviará al servicio de patología del hospital para la clasificación histológica de la tumoración.

Estoy enterado (a) de la garantía y seguridad del procedimiento y que los riesgos potenciales son derivados de la cirugía per se y del tipo de enfermedad de mi paciente y no de la conservación de tejido para estudios.

CONSENTIMIENTO DEL PADRE O TUTOR: he leído y entendido este formato de consentimiento y comprendo que no debo firmar si todos los párrafos y todas mis dudas han sido explicadas o contestadas a mi entera satisfacción o si no se entiendo el término o palabra contenida en este documento.

**NO FIRME A MENOS QUE LEA Y ENTIENDA POR COMPLETO ESTE DOCUMENTO**

“Conozco las normas del IMSS y la sanción a que nos hacemos acreedores en caso de incumplimiento, por lo que acataremos sus procedimientos de aplicación dentro de las instalaciones, tanto el suscrito como mis familiares o amigos o profesional o similar que visite a mi paciente.

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma de Padre/Madre o tutor

\_\_\_\_\_  
Nombre y firma del testigo

\_\_\_\_\_  
Fecha                  Hora

DECLARACIÓN MÉDICA. He explicado el contenido de este documento al paciente y he respondido todas las preguntas al grado máximo de mi conocimiento.

Dr. J. Enrique López Aguilar  
Nombre y firma del médico

\_\_\_\_\_  
Fecha                  Hora

### **Recursos físicos y humanos**

- Personal: se cuenta con personal especializado, un patólogo pediatra, un patólogo general, un neuro-patólogo y el grupo de investigación capacitado para la realización e interpretación de la técnica de IHQ.
- Recursos materiales: los bloques de tejidos fijados en parafina están disponibles en el archivo del Departamento de Patología del Hospital de Pediatría, CMN SXXI. El equipo y reactivos de la técnica de IHQ se localiza en la Unidad de Investigación de Tumores Cerebrales, UMAE Hospital de Pediatría CMN SXXI.

## Hoja de recolección de datos

Fecha

Lugar de  
trabajo: \_\_\_\_\_

Astrocitoma: \_\_\_\_\_

Número de  
muestra: \_\_\_\_\_

Laminilla: \_\_\_\_\_

MiRNA: \_\_\_\_\_

Anticuerpo: \_\_\_\_\_

Resultado: \_\_\_\_\_

Observaciones:

---

---

---

---

---

Nombre de quien manipula la muestra y realiza la técnica:

Dra. Leyla Soraya Camarillo Blancarte

Nombre del supervisor del laboratorio:

---



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**Registro de lectura de Inmunohistoquímica para anti-anexina V**

Presencia de anexina V	Evaluación de Intensidad (I): 0, 1, 2 y 3.	Porcentaje (%)	Tipo de Tumor
<b>ANX5</b>  + = positivo - = negativo	0 = No tiñó 1 = < que el control 2 = igual que el control 3 = > que el control	Número aproximado de células que se hibridaron con el anticuerpo.	1 pilocítico 2 fibrilar 3 anaplásico 4 glioblastoma

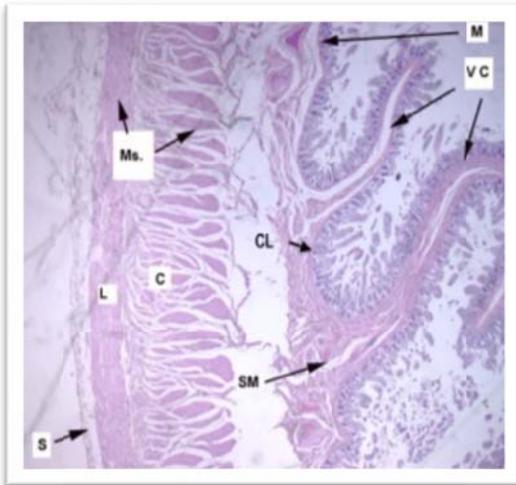
**Observadores y Revisor**

<u>Observador A</u> <u>Evaluador</u>	<u>Observador B</u> <u>Evaluador</u>	<u>Observador C</u> <u>Revisor</u>

PQ	Edad actual	Edad al diagnóstico	Género M / F	Localización y tipo de tumor	Sobrevida al momento del estudio Si / No	ANX 5	(I)	%
Control	finado	6m	M	Colon sano		+	2	20

## 1. A Control con HE

Especie / tejido	Humano / colon
Método de Microscopía	Microscopía óptica de campo claro
Método de inclusión	Parafina
Método de tinción	H&E
Grosor de corte	5 um
Microscopio	Iroscope



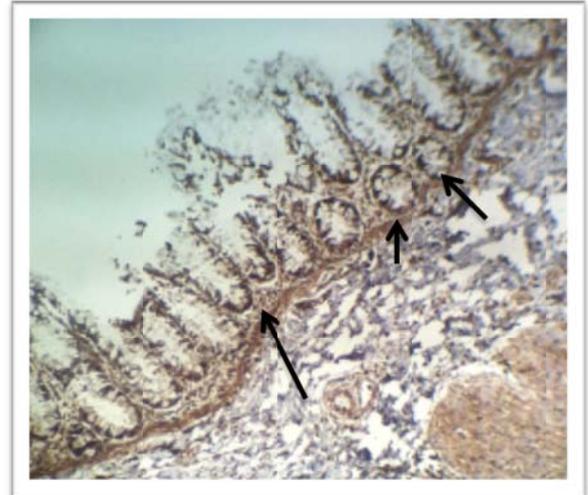
### Descripción A:

Esta preparación muestra un corte de colon de 5um de espesor teñido con H&E. Las flechas indican:

- Mucosa □ M
- Submucosa SM
- Muscular de la mucosa □ Ms
- Vellosidades intestinales □ VC
- Células caliciformes
- Criptas de Lieberkühn CL□□

Cuestiones de interés: Citoplasma de las criptas de Lieberkuhn.

## 1. B Control con Anti-anexina V

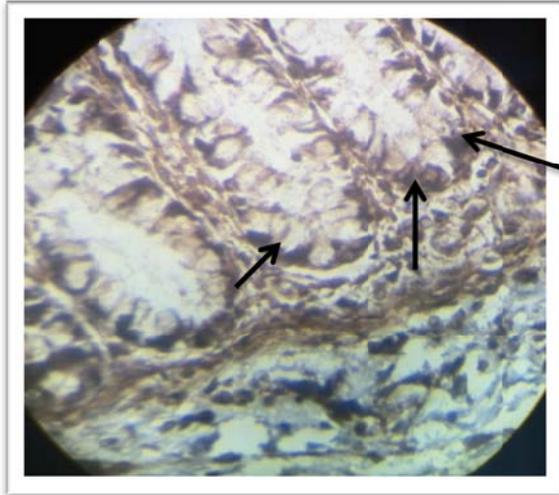


**Descripción B:** Esta preparación muestra una porción de un pliegue de colon en un corte en 5um de espesor teñido con anti-anexina V.

□□

Las flechas indican las siguientes estructuras: □ Citoplasma de las criptas de Lieberkuhn positivo para anexina V.

## 2. Acercamiento del control

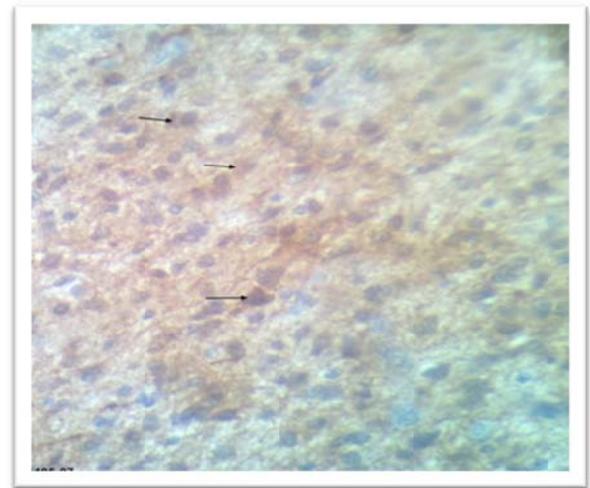


Esta preparación muestra un acercamiento del campo anterior del control positivo de colon donde se observa mucosa colónica.

Las flechas indican las siguientes estructuras: criptas de Lieberkhun revestidas por células caliciformes y columnares mucosecretoras con positividad citoplásmica para anexina V. 40x

## 3. Muestra # 1

<b>Especie / tejido</b>	Humano / astrocitoma fibrilar
<b>Método de Microscopía</b>	Microscopía óptica de campo claro
<b>Método de inclusión</b>	Parafina
<b>Método de tinción</b>	IGHQ, anti-anexina V
<b>Grosor de corte</b>	5 um
<b>Microscopio</b>	Iroscope

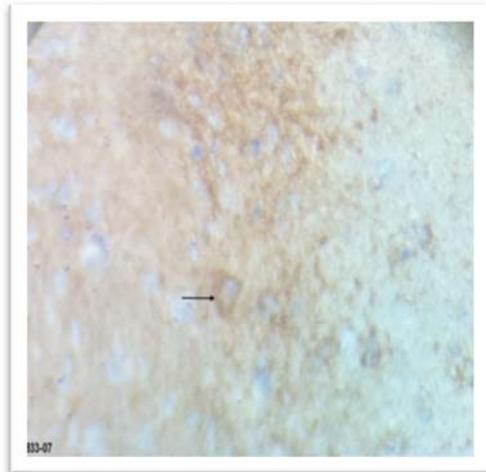


Esta preparación digital muestra un corte de 5um de astrocitoma fibrilar.

Las flechas indican tres células con positividad citoplásmica para anexina V. 40x

#### 4. Muestra # 2

<b>Especie / tejido</b>	Humano / astrocitoma pilocítico
<b>Método de Microscopía</b>	Microscopía óptica de campo claro
<b>Método de inclusión</b>	Parafina
<b>Método de tinción</b>	IGHQ, anti-anexina V
<b>Grosor de corte</b>	5 um
<b>Microscopio</b>	Iroscope

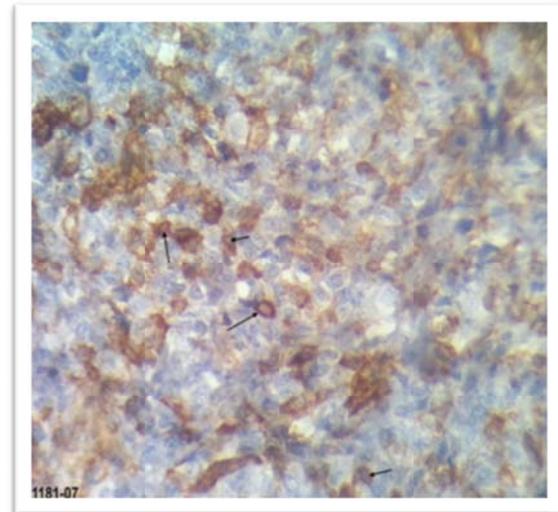


Esta preparación muestra un corte de 5um de astrocitoma pilocítico.

Las flechas indican una célula con positividad citoplásmica para anexina V. 40x

#### 5. Muestra # 3

<b>Especie / tejido</b>	Humano / glioblastoma multiforme
<b>Método de Microscopía</b>	Microscopía óptica de campo claro
<b>Método de inclusión</b>	Parafina
<b>Método de tinción</b>	IGHQ, anti-anexina V
<b>Grosor de corte</b>	5 um
<b>Microscopio</b>	Iroscope



Esta preparación muestra un corte de 5um de glioblastoma multiforme.

Las flechas indican tres células con positividad citoplásmica para anexina V. 40x

## 6. Muestra # 6

<b>Especie / tejido</b>	Humano / astrocitoma fibrilar
<b>Método de Microscopía</b>	Microscopía óptica de campo claro
<b>Método de inclusión</b>	Parafina
<b>Método de tinción</b>	IGHQ, anti-anexina V
<b>Grosor de corte</b>	5 um
<b>Microscopio</b>	Iroscope



La preparación muestra un corte astrocitoma fibrilar donde se observa una diferencia de color en la tinción. El lado derecho de la fotografía muestra el tejido tumoral con hiper celularidad, fibras gliales y tinción positiva para el anticuerpo. El lado izquierdo de la fotografía muestra tejido sano con pocas células y sin tinción al anticuerpo por lo que esta muestra fue el control negativo interno para el estudio.