



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**ESTUDIO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y PATRÓN DE METILACIÓN EN TUMORES
DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE FOSA POSTERIOR, EN PACIENTES PEDIÁTRICOS**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

PRESENTA:

MONSERRAT PÉREZ RAMÍREZ

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
FACULTAD DE MEDICINA**

**COMITÉ TUTOR: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
INSTITUTO DE GEOLOGÍA**

**DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

MÉXICO, D.F. MAYO, 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 24 de marzo de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **PÉREZ RAMÍREZ MONSERRAT** con número de cuenta **512027261** con la tesis titulada **"ESTUDIO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS Y PATRÓN DE METILACIÓN EN TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE FOSA POSTERIOR, EN PACIENTES PEDIÁTRICOS"**, realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**:

Presidente: DR. JAIME BERUMEN CAMPOS
Vocal: DRA. ROSENDA ISABEL PEÑALOZA ESPINOSA
Secretario: DRA. SANDRA LUZ GÓMEZ ARROYO
Suplente: DR. ALEJANDRO MANUEL GARCÍA CARRANCÁ
Suplente: DRA. SARA FRÍAS VÁZQUEZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 02 de mayo de 2014

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Al posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la realización de mis estudios de maestría.

Al personal del posgrado en Ciencias Biológicas por la ayuda recibida durante el presente trabajo.

Al Conacyt por el apoyo otorgado, con número de CVU: 404762.

Al Instituto Mexicano de Seguro Social por el apoyo durante el desarrollo del proyecto.

Al Dr. Diego Julio Arenas Aranda, tutor principal del proyecto por haberme abierto las puertas de su laboratorio, así como el apoyo recibido durante la tesis, por todas las aportaciones brindadas que han ayudado a mi formación.

A las Dra Sara Frías Vázquez y a la Dra. Sandra Luz Gómez Arroyo, miembros del comité tutor por todos los aportes para la elaboración del presente trabajo.

A los miembros del jurado Dr. Jaime Berumen Campos, Dra. Rosenda Isabel Peñaloza Espinoza y Dr. Alejandro Manuel García Carrancá.

Agradecimientos a título personal

Al Dr. Normand García Hernández por su apoyo y orientación para la realización de la presente tesis.

A los Neurocirujanos Dr. Antonio García, Dr. Alejo. J. Hernández, Dr. Armando Guerrero, Dr. Israel Del Ángel, Dr. Germán Ballesteros, Dr. Fernando Chico, Dr. Eduardo Benadón, por su disposición durante la colecta de muestras, así como su enseñanza para un mejor entendimiento de los TSNC.

A los patólogos Dra. A. Georgina Siordia, Dr. Marío Pérezpeña por ayudarme con el diagnóstico y brindarme su orientación.

A las instituciones dentro de las cuales se realizó la colecta de muestras: Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza” y el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

A mis compañeros del laboratorio por su compañía y amistad; en especial a Araceli por haber colaborando conmigo.

A la QFB Sandra Campos por su orientación sobre las colaboraciones para la colecta de muestras y por su amistad.

A todos mis amigos que me han escuchado y me han apoyado durante la maestría y que he podido contar con ellos a pesar de la distancia.

Y a todas las personas que no he mencionado pero que en algún momento estuvieron brindándome su ayuda.

Dedicatoria

En memoria de mi padre Gustavo Pérez Valencia, porque su recuerdo siempre ha estado conmigo.

A mi madre Cecilia Ramírez González por su amor, entrega, dedicación, apoyo incondicional, por escucharme, por sus enseñanzas, su orientación, por estar conmigo en todo momento compartiendo mis alegrías y mis tristezas, triunfos y fracasos, porque le debo toda mi formación académica y humana.

A mi tío Gustavo Ramírez porque ya no pudo leer este trabajo, como nos hubiera gustado.

Índice

1. Introducción	1
1.1. Tumores de Sistema Nervioso Central (TSNC)	3
1.1.1. Ependimoma	3
1.1.2. Astrocitoma	6
1.1.3. Oligodendroglioma	7
1.1.4. Glioblastoma Multiforme	9
1.1.5. Meduloblastoma	11
1.1.6. Germinoma	13
1.2. Metilación	16
1.3. Metilación de TSNC	18
1.4. Cambios cromosómicos en TSNC	19
1.5. MicroRNAs y Cáncer	20
2. Objetivos	21
2.1 General	21
2.2 Particulares	21
3. Antecedentes	22
4. Justificación	23
5. Hipótesis	24
6. Metodología	26
6.1. Diseño Experimental	26
6.2. Colección de muestras	26
6.3. Criterios de Selección	27
6.4. Obtención de ácidos nucleicos	27
6.5. Hibridación Genómica Comparada	28
6.5.1. Marcaje con “ <i>Nick Translation Kit</i> ”	28
6.5.2. Marcaje con “ <i>Random Primer</i> ”	28
6.5.3. Preparación de la sonda	28
6.5.4. Hibridación de la sonda sobre cromosomas en metafase	29
6.5.5. Lavado de laminillas	29

6.5.6. Visualización y análisis de laminillas	29
6.6. Análisis del patrón de metilación	30
6.6.1. Corte enzimático	30
6.6.2. Unión de adaptadores	30
6.6.3. PCR	31
6.7. Análisis de regiones modificadas	31
7. Resultados	32
7.1. Extracción de DNA	32
7.2. Hibridación Genómica Comparada	32
7.3. Evaluación del funcionamiento enzimático para AIMS	40
7.4. Amplificación de Sitios Intermetilados	40
7.5. Comparación entre patrón de metilación y alteraciones cromosómicas	48
8. Discusión	56
9. Conclusiones	60
10. Literatura Citada	61
Anexo I	73
Anexo II	74
Anexo III	75
Anexo IV	88

Lista de figuras y tablas

Figuras

Figura 1. Incidencia de tumores cerebrales infantiles	1
Figura 2. Regionalización cerebral	2
Figura 3. IRM de ependimoma del piso del IV ventrículo	3
Figura 4. Localización de tumor ependimario.	
Figura 5. Histología del ependimoma	5
Figura 6. Histología de los astrocitomas	7
Figura 7. Ubicación de astrocitomas	7
Figura 8. Ubicación de oligodendroglioma	9
Figura 9. Histología de los oligodendrogliomas	9
Figura 10. Histología de Glioblastoma Multiforme	11
Figura 11. Localización de Glioblastoma	11
Figura 12. Localización del meduloblastoma	12
Figura 13. Histología del meduloblastoma	13
Figura 14. Localización de germinoma	14
Figura 15. Histología del germinoma	15
Figura 16. Integridad del DNA	32
Figura 17. Sondas marcadas con CGH	32
Figura 18. Procesamiento de imágenes de CGH	33
Figura 19. Alteraciones cromosómicas en Ependimoma 1 encontradas mediante CGH	34
Figura 20. Alteraciones cromosómicas en Ependimoma 2 (CGH)	34
Figura 21. Alteraciones cromosómicas en Astrocitoma 1 (CGH)	35
Figura 22. Alteraciones cromosómicas en Astrocitoma 2 (CGH)	35
Figura 23. Alteraciones cromosómicas en Oligodendroglioma 1 (CGH)	36
Figura 24. Alteraciones cromosómicas en Glioblastoma Multiforme 1 (CGH)	36

Figura 25. Alteraciones cromosómicas en Meduloblastoma 1 (CGH)	37
Figura 26. Alteraciones cromosómicas en Meduloblastoma 2 (CGH)	37
Figura 27. Alteraciones cromosómicas en Meduloblastoma 3 (CGH)	38
Figura 28. Alteraciones cromosómicas en Germinoma 1 (CGH)	38
Figura 29. Alteraciones cromosómicas en Germinoma 2 (CGH)	39
Figura 30. Alteraciones cromosómicas en Teratoma 1 (CGH)	39
Figura 31. Control de funcionamiento de enzimas y DNA ligasa	40
Figura 32. Amplificación de Sitios Intermetilados	41
Figura 33. Sondas marcadas con <i>“Random Primer”</i> .	41
Figura 34. Patrón de metilación de Ependimoma 1 (AIMS-CGH)	42
Figura 35. Patrón de metilación de Ependimoma 2 (AIMS-CGH)	42
Figura 36. Patrón de metilación de Astrocitoma 1 (AIMS-CGH)	43
Figura 37. Patrón de metilación de Astrocitoma 2 (AIMS-CGH)	43
Figura 38. Patrón de metilación de Oigodendroglioma 1 (AIMS-CGH)	44
Figura 39. Patrón de metilación de Glioblastoma Multiforme 1 (AIMS-CGH)	44
Figura 40. Patrón de metilación de Meduloblastoma 1 (AIMS-CGH)	45
Figura 41. Patrón de metilación de Meduloblastoma 2 (AIMS-CGH)	45
Figura 42. Patrón de metilación de Meduloblastoma 3 (AIMS-CGH)	46
Figura 43. Patrón de metilación de Germinoma 1 (AIMS-CGH)	46
Figura 44. Patrón de metilación de Germinoma 2 (AIMS-CGH)	47
Figura 44. Patrón de metilación de Teratoma 1 (AIMS-CGH)	47

Tablas

Tabla 1. Muestras colectadas	27
Tabla 2. Patrón de metilación y alteraciones cromosómicas	48
Tabla 3. Regiones compartidas entre diferentes tumores	49
Tabla 4. Regiones ganadas compartidas entre diferentes tumores	49
Tabla 5. Regiones perdidas que se comparten entre diferentes tumores	50
Tabla 6. Regiones hipermetiladas compartidas entre diferentes tumores	50
Tabla 7. Regiones hipometiladas compartidas entre diferentes tumores	50
Tabla 8. Regiones reportadas en la literatura y regiones encontradas en el estudio	51
Tabla 9. Genes localizados en regiones cromosómicas modificadas	52
Tabla 10. miRNAs localizados en regiones con alteraciones cromosómicas	53
Tabla 11. miRNAs localizados en regiones con patrón de metilación modificado.	53
Tabla 12. miRNAs localizados en regiones compartidas entre tumores con modificación del patrón de metilación y alteraciones cromosómicas	54
Tabla 13. miRNAs reportados en cáncer	54
Tabla 14. Genes y miRNAs involucrados en procesos oncogénicos localizados en la región 1p36.3-p36.2	55

Anexo III

Tabla 1. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-126	75
Tabla 2. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-920	75
Tabla 3. Vías y procesos celulares en las que participa hsa-miR-1185	75
Tabla 4. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-let-7b	76
Tabla 5. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-27b	77
Tabla 6. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-23a	78

Tabla 7. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-200c	79
Tabla 8. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-23b	80
Tabla 9. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-494	81
Tabla 10. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-1322	81
Tabla 11. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-134	82
Tabla 12. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-376c	82
Tabla 13. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-203	83
Tabla 14. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-215	83
Tabla 15. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-202	84
Tabla 16. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-30b	85
Tabla 17. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-30d	86
Tabla 18. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-132	87

Anexo IV

Tabla 1. Alteraciones asociadas a TP53 en varios tipos de neoplasias	88
Tabla 2. Alteraciones asociadas a CCND1 en varios tipos de neoplasias	88
Tabla 3. Alteraciones asociadas a KRAS en varios tipos de neoplasias	88
Tabla 4. Alteraciones asociadas a JUN en varios tipos de neoplasias	88
Tabla 5. Alteraciones asociadas a AKT2 en varios tipos de neoplasias	88
Tabla 6. Alteraciones asociadas a APC en varios tipos de neoplasias	89
Tabla 7. Alteraciones asociadas a CDK6 en varios tipos de neoplasias	89
Tabla 8. Alteraciones asociadas a RAR-B en varios tipos de neoplasias	89
Tabla 9. Alteraciones asociadas a SMAD 2 en varios tipos de neoplasias	89
Tabla 10. Alteraciones asociadas a RB1 en varios tipos de neoplasias	89

Resumen

Los Tumores de Sistema Nervioso Central (TSNC) comprenden entre el 15 al 20% de todas las neoplasias ocurridas en la niñez y la adolescencia. En México se ha reportado que los tumores intracraneanos pediátricos son las neoplasias solidas más frecuentes durante la infancia que se originan principalmente en fosa posterior entre los que se encuentra el meduloblastoma, gliomas (astrocitoma, ependimoma, oligodendroglioma) y germinomas. Actualmente se desconocen los motivos del desarrollo de cáncer infantil pero con base en los conocimientos teóricos se puede afirmar como posibles causas a los factores ambientales, genéticos y epigenéticos como la metilación del DNA que conduce a un cambio fenotípico de las células originando consecuencias funcionales. En algunos TSNC se han encontrado genes metilados como *MGMT*, *IDHI*, *EGFR*, *TP53*, *WNT*, *SHH*, etc. además de la metilación existen las alteraciones cromosómicas que juegan un papel importante para el desarrollo tumoral, asociándose con la localización anatómica. Estas alteraciones pueden ser de ganancia y/o pérdida cromosómica, algunas de las más frecuentes en TSNC son ganancias en 1q, 7p, 9q, 12, 15q y pérdidas en 6q, 14q.

Los cambios de expresión genética en procesos oncogénicos son los encargados de grandes cambios celulares como la metilación que ha sido propuesta como uno de los factores importantes para el silenciamiento de genes supresores de tumores en procesos oncogénicos dando origen a las diversas patologías, por lo que es de interés analizar los patrones de metilación correlacionándolos con las alteraciones cromosómicas en TSNC, en fosa posterior.

En el presente trabajo se colectaron muestras de TSNC ubicados en fosa posterior para analizar mediante CGH y AIMS-CGH las alteraciones cromosómicas y el patrón de metilación, respectivamente y realizar una correlación de los cambios genéticos y epigenéticos entre e intra-tumores de SNC ubicados en fosa posterior en pacientes pediátricos. Igualmente se realizó el análisis bioinformático de los genes que se localizan en las regiones alteradas.

Se encontraron regiones compartidas en las alteraciones cromosómicas y el patrón de metilación en los diferentes tumores analizados, principalmente se observaron modificaciones en los cromosomas 1p, 5q, 7q, 17q y 22.

Abstract

Tumors of Central Nervous System (TCNS) comprise between 15 to 20% of all cancers occurring in childhood and adolescence. In Mexico it has been reported that pediatric intracranial tumors are the most common solid tumors during the childhood, originating mainly in posterior fossa, as medulloblastoma, gliomas (astrocytoma, ependymoma, oligodendroglioma) and germinomas. Currently the reasons for the development of childhood cancer are unknown but based on theoretical knowledge can be stated as possible causes to for the environmental, genetic and epigenetic factors such as DNA methylation leading to a phenotypic change of the cells causing functional consequences. In some TCNS were found genes methylated as *MGMT*, *IDH*, *EGFR*, *TP53*, *WNT*, *SHH*, etc. besides the chromosomal alterations, the methylation also play an important for tumor development; some chromosomal alteration are gains in 1q, 7p, 9q, 12, 15q and losses on 6q, 14q .

Changes in gene expression in oncogenic processes are responsible for large cellular changes such as methylation that were been proposed as one of the important factors for the silencing of tumor suppressor genes in oncogenic processes, so it is of interest analyze methylation patterns correlating with chromosomal abnormalities in TSNC of posterior fossa .

The samples of TSNC located in posterior fossa were analyzed by CGH and AIMS-CGH for observation the chromosomal alterations and the methylation pattern respectively for a correlation between genetic and epigenetic changes in patients during pediatric age. Were bioinformatic analysis of genes that are found in the altered regions was performed. Shared regions of chromosomal alterations and the pattern of methylation in different tumors analyzed were found, the mainly modifications are in the chromosomes 1p, 5q, 7q, 17q and 22.

1.- Introducción

Los Tumores de Sistema Nervioso Central (TSNC) comprenden entre el 15 al 20% de todas las neoplasias ocurridas en la niñez y la adolescencia (Packer *et al.*, 2008), en los que predominan los tumores infratentoriales (55%) sobre los tumores supratentoriales (45%). Para cada población infantil se manifiesta una preferencia para determinados tipos tumorales, muestran diferencias raciales y geográficas en la distribución de neoplasias del Sistema Nervioso Central (SNC). En Europa y Norteamérica, predomina el astrocitoma y el meduloblastoma, mientras que en África y Japón hay una mayor incidencia de craneofaringiomas y tumores de la región pineal; en cambio, el ependimoma es más frecuente en la India que en cualquier otro país (Villarejo y Martínez., 2008). Para el caso de México se ha reportado que los tumores intracraneanos pediátricos son las neoplasias solidas más frecuentes durante la infancia (Figura 1), de los cuales el 32% son astrocitomas, 19% meduloblastomas, 11% craneofaringiomas, 10% ependimomas y 4% germinomas (Chico *et al.*, 2006).

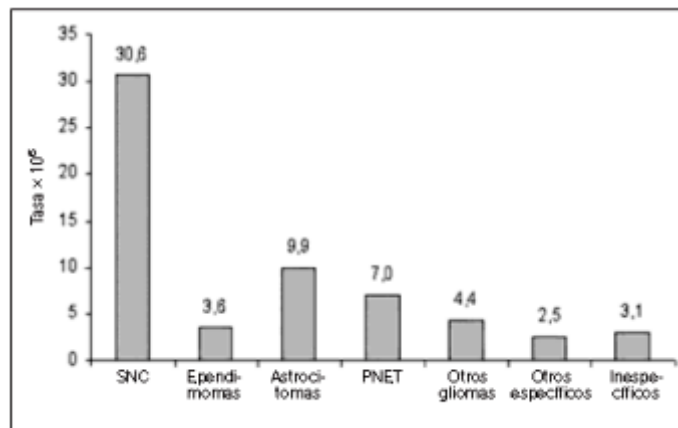


Figura 1. Incidencia de tumores cerebrales infantiles. SNC: Sistema Nervioso Central, PNET: Tumores ectodérmicos primitivos (Chico *et al.*, 2006).

Se ha reportado que aproximadamente la mitad de todos los tumores encefálicos durante la niñez se originan en la fosa posterior ubicada cerca del tronco

encefálico (Figura 2), entre estos tumores son el meduloblastoma, los gliomas (astrocitoma, ependimoma, oligodendroglioma, glioblastoma multiforme) y en algunas ocasiones germinomas (Packer *et al.*, 2008).

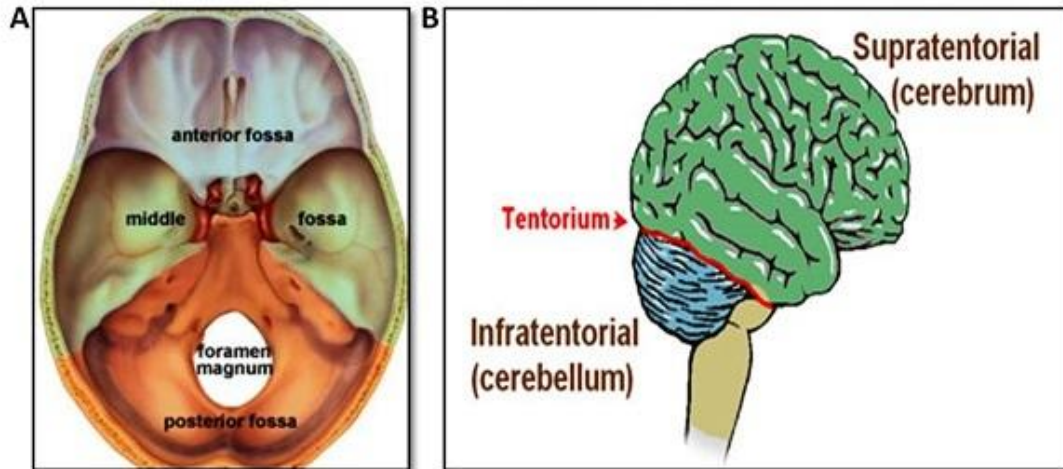


Figura 2. Regionalización cerebral. A) Ubicación de la fosa posterior. **B)** Región supratentorial e infratentorial.

Actualmente, se desconocen los motivos del desarrollo de cáncer infantil pero existe el conocimiento teórico suficiente, para poder afirmar que dentro de las posibles causas se encuentran el fumar, la alimentación (de Bont *et al.*, 2008), los factores ambientales como la exposición a compuestos derivados del benceno (Fajardo *et al.*, 1999), algunas causas virales propuestas como el virus Epstein-Barr (Chico *et al.*, 2006) y en una pequeña proporción causas genéticas (de Bont *et al.*, 2008).

Los TSNC se clasifican de acuerdo a su origen, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2007 clasificó los tumores en: tumores de tejido neuroepitelial, tumores de nervios periféricos, tumores de meninges, linfomas y neoplasias hematopoyéticas, tumores de células germinales y tumores de la región selar.

1.1 Tumores de Sistema Nervioso Central

1.1.1 Ependimoma

El ependimoma (EP) es un tumor de crecimiento lento, se origina a partir de líneas celulares ependimarias del sistema ventricular, plexos coroides, del canal central de la médula espinal (Alcaraz *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2011), todos ubicados en regiones dentro del SNC (Waha *et al.*, 2004; Vega-Orozco *et al.*, 2011), se forman principalmente en el cuarto ventrículo (Figuras 3 y 4) (Zornic *et al.*, 2011) y con menor frecuencia a partir del parénquima cerebral como resultado de la migración de las células ependimarias durante la embriogénesis (Maeda *et al.*, 2011).

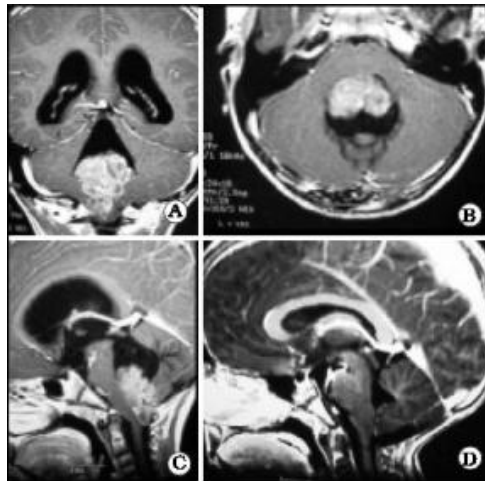


Figura 3. IRM de ependimoma del piso del IV ventrículo. A) Corte coronal, B) Corte axial que muestra adherencia al piso del IV ventrículo, C) Corte sagital que muestra el tumor a través del orificio de Magendi, D) Control postoperatorio que muestra resección subtotal (Zuccaro, 2008).

Los EP pueden ser de dos tipos: infratentorial o supratentorial con una incidencia del 50.9% y 49.1% de los casos, respectivamente (Chico *et al.*, 2006, Forbes *et al.*, 2012) presentan un índice de supervivencia del 43 a 55% de los casos (Milde *et al.*, 2011) afectan preferentemente a niños y adultos jóvenes (Lee *et al.*, 2011). Se sabe que dentro de las neoplasias en niños comprenden aproximadamente el 20% de los tumores malignos (Schmidt *et al.*, 2010), el EP es el tercer tumor en SNC más común (Waha *et al.*, 2004, Fangusaro *et al.*, 2011) y presenta una

mayor incidencia en grupos menores de 5 años, a esta edad ocurre más de la mitad de los casos reportados (López-Aguilar *et al.*, 2009) para después disminuir en el grupo de 5 a 9 años y aumentando nuevamente en el grupo de 10 a 14 años (Fajardo *et al.*, 1999).

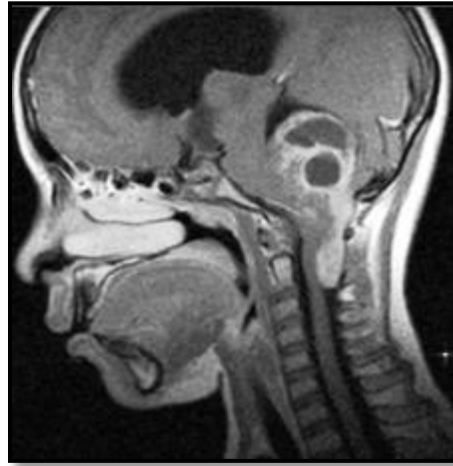


Figura 4. Localización de tumor endocráneo. La resonancia magnética indica que el endocrinoma se localiza en el tercer y cuarto ventrículo. Imagen proporcionada por servicio de neurocirugía del Centro Médico Nacional “La Raza”.

La característica histológica de los EP es la formación de rosetas o pseudorosetas (Ertan *et al.*, 2010), apariencia adquirida por la formación de células apiladas alrededor de vasos sanguíneos (Figura 5), a menudo se observa mitosis dentro de la histología del tumor (Alcaraz *et al.*, 2010, Zornic *et al.*, 2011) regularmente no presentan infiltración en el tejido circundante del parénquima, pero se han reportado hallazgos patológicos del EP en donde se encuentran infiltraciones a lo largo de los tractos axonales, además en algunos casos se ha observado infiltración de las células tumorales individuales en el parénquima (Lee *et al.*, 2011).

Es importante mencionar que la OMS (WHO, por sus siglas en inglés) clasifica a los EP por variantes histopatológicas, para la edad pediátrica en: endocrinoma clásico (WHO grado II) y anaplásico (WHO grado III), se identificó a cada grado histopatológico mediante factores de anaplasia como el incremento en la densidad celular, actividad mitótica, proliferación microvascular y necrosis (Ellison *et al.*, 2011).

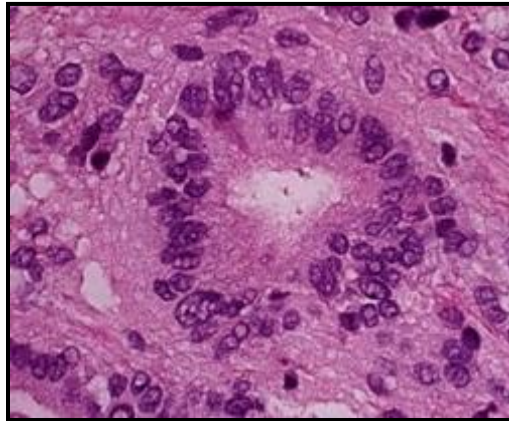


Figura 5. Histología del ependimoma. Se muestra la formación de una roseta característica de los ependimomas. Imagen proporcionada por el Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

Se conoce que los EP pueden proceder de células derivadas de la transformación de células madre neuronales y sus progenitores (Hadjipanayiu *et al.*, 2008), pueden contribuir a la iniciación y el desarrollo de los tumores cerebrales; estas células comparten características similares a las del SNC normal, incluyen la auto-renovación y la capacidad de proliferación para la generación de descendientes (Hadjipanayiu *et al.*, 2009), una de las células que ha sido propuesta como célula madre en el desarrollo del EP es la célula glía radial (Kurian *et al.*, 2008) que se desarrolla a partir de los ventrículos y del canal central (Xie *et al.*, 2010).

De acuerdo a la literatura se han reportado casos esporádicos de metástasis en huesos, hígado (Vega-Orozco *et al.*, 2011), nódulos linfáticos cervicales (Khinoshita *et al.*, 2004), pulmones, pleura, nódulos linfáticos abdominales (Graff *et al.*, 1999), sin embargo la mayoría de las metástasis del tumor llega a ser intracraneal y muy pocas se localizan en la médula espinal (Graf *et al.*, 1999).

1.1.2. Astrocitoma

Los astrocitomas son tumores intracerebrales primarios (Figura 6), los tumores de alto grado tienen el peor pronóstico (Martínez *et al.*, 2012); representan aproximadamente el 40% de todas las neoplasias del SNC, durante la edad pediátrica, aproximadamente del 15 al 25% son astrocitomas de bajo grado y del 10 a 15% de astrocitomas de alto grado, siendo del 10 a 20% astrocitomas del tallo cerebral (Figura 7) y 10 a 20% astrocitomas cerebrales, los tumores gliales representan alrededor del 70% de los casos reportados. Los astrocitomas son considerados tumores infiltrantes, se sugiere que los otros gliomas tienen un origen neuronal en la célula madre, carecen de marcadores biológicos que indiquen sobre el riesgo de transformación maligna; sin embargo, se conocen como tumores capaces de sufrir transformación anaplásica en el 79% de los casos (Prat *et al.*, 2008). Estas neoplasias tienen como alteración genética la mutación en *TP53* en un 60%, mutación en *IDH1* en un 70% de los tumores; mientras que para los tumores grado II presentan hipermetilación en el promotor del gen *MGMT* y del supresor de tumores *EMMP3*. Interesantemente en los gliomas grado II tiene una mutación en *TP53*, con regulación baja de *CDKN2A* y regulación de *MDM2* asociado a la degradación de *p53*, que frecuentemente se observa en astrocitomas de grado III, mientras que las mutaciones en *TP53* e *IDH1* se han encontrado en la misma frecuencia en astrocitomas grado II (Martínez *et al.*, 2012). Los astrocitomas muestran ganancias del cromosoma 7 y/o delección del cromosoma 10, mutaciones de *RB1* o *PTEN*, así como la amplificación de *EGFR*, *CDK4* o *MDM2* (Ichimura *et al.*, 2008).

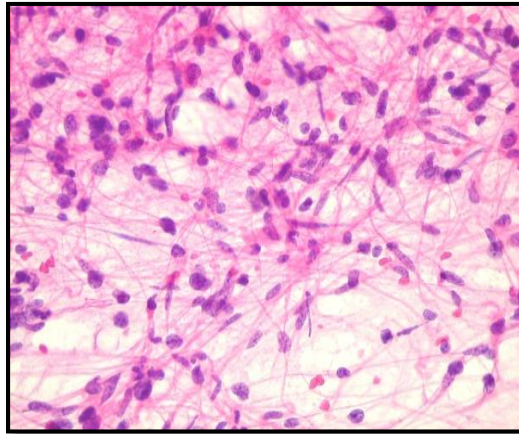


Figura 6. Histología de astrocitomas. Se muestran a las células elongadas hipercrotámicas características de estas neoplasias. Imagen proporcionada por el servicio de patología del Hospital de pediatría del CMN Siglo XXI.

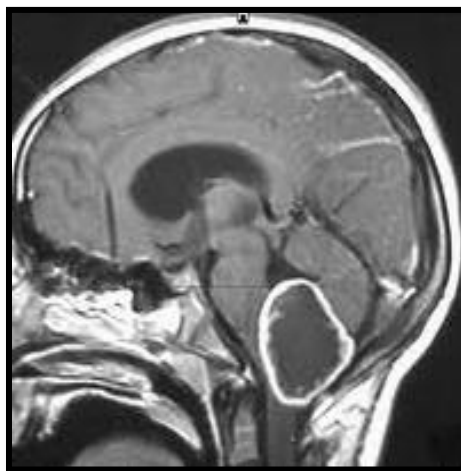


Figura 7. Ubicación de astrocitomas. Se muestra por IRM la ubicación de esta neoplasia en fosa posterior.

1.1.3. Oligodendroglioma

El oligodendroglioma es el tercer tumor glial más común de los gliomas entre la edad de 2 a 5 años, comprenden menos del 1% de los TSNC pediátricos, muestra una presentación clínica frecuentemente de más de 5 años. Se evidencian comúnmente en la quinta y sexta década de la vida, siendo durante la edad pediátrica poco probables. Estos tumores son mayormente observados en el lóbulo frontal, occipital, parietal (Figura 8) y en pocas ocasiones en el lóbulo temporal (Velar *et al.*, 2010). Este tumor se puede diferenciar a anaplásico, pero

responde favorablemente a la quimioterapia, se caracteriza por envolver la materia gris y presentar calcificaciones (Koeller *et al.*, 2005), posee células con núcleos redondos y ovalados, cuyo núcleo es ligeramente prominente (Figura 9). Las prolongaciones citoplásmicas son escasas y cortas; presentan pleomorfismo, anaplasia, necrosis y gran prominencia de células endoteliales. Algunos oligodendrogliomas tienen evidencia de neoplasia astrocítica, originando a los “tumores mixtos” (Koellar *et al.*, 2005). La gran mayoría de los oligodendrogliomas tienen pérdidas homocigóticas de todo el cromosoma 1p (deleción total 1p), en muchos de los casos tienen pérdida total del cromosoma 19q, estas modificaciones se relacionan con factores pronósticos o respuesta del paciente al tratamiento, característica de la región 1p36.22-p36.23 perdida en la mayoría de estos tumores (Ichimura *et al.*, 2008).

Los análisis moleculares han contribuido al reconocimiento de importante de alteraciones genéticas importantes durante la tumorigénesis en cerebro, algunas relacionadas al pronóstico del paciente; los marcadores moleculares identificados para el daño neurológico y neuropatológico son los brazos 1p y 19q por su alta sensibilidad de estrés genotóxico (Senetta *et al.*, 2013). Se presentan pérdidas de 1p y 19q en un 40 al 80% de estos tumores, juega un rol crucial en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico en adultos (Suri *et al.*, 2011). Algunas veces invaden las meninges y puede en ocasiones hacer metástasis a otros órganos como el hígado, pulmón, hueso y nódulos linfáticos cervicales. En adultos las anomalías cromosómicas 1p y 19q se pierden alrededor del 80% al 90% del grado II y del 50 al 70% en los tumores grado III, sin embargo en la edad pediátrica es raro observar estas alteraciones cromosómicas (Velar *et al.*, 2010). El gen *MGMT* ha sido clasificado como un predictor independiente para la respuesta terapéutica a la quimioterapia en astrocitomas de alto grado y oligodendrogliomas tratados con temozolamida, ha sido reportada como una correlación positiva con la pérdida de 1p/19q (Suri *et al.*, 2011).

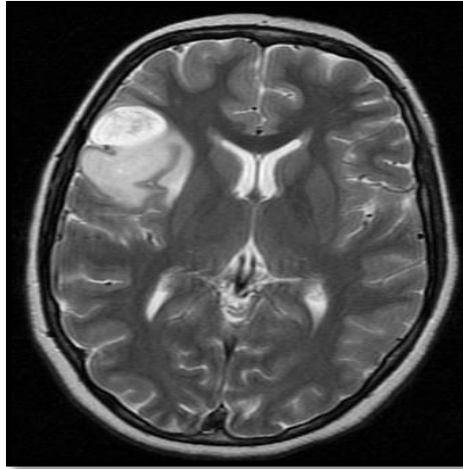


Figura 8. Ubicación de oligodendroglioma. Se muestra imagen obtenida mediante IRM, donde se observa al tumor localizado en lóbulo temporal.

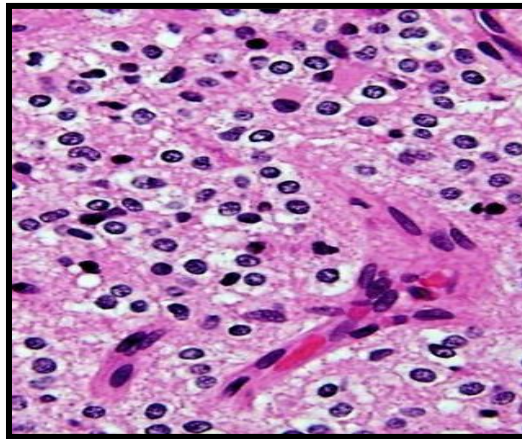


Figura 9. Histología de los oligodendrogliomas. Se muestran formaciones celulares con núcleos redondeados heterocromáticos rodeados por citoplasma.

1.1.4. Glioblastoma Multiforme

El Glioblastoma Multiforme (GBM) es un tumor de SNC considerado como primera causa de tumores cerebrales (Figuras 10 y 11) durante la edad adulta y en menor proporción en niños (Zinn *et al.*, 2012), debido a la existencia de pocos tratamientos eficaces presentan un índice de mortalidad alto. El GBM de acuerdo a sus características clínicas, histológicas, genéticas y el pronóstico heterogéneo, dependiendo de sus características han sido divididos en subtipos primarios y secundarios. Se ha demostrado alta variabilidad genética y molecular de los GBM, por lo que se complica la identificación de los elementos fundamentales dentro de

la red de señalización celular de los GBM originando limitaciones para el desarrollo de terapias dirigidas a un tumor específico (Baysan *et al.*, 2012). Los GBM se dividen en dos tipos de tumores: primarios y secundarios; los primeros pueden rápidamente desarrollarse a partir de un tumor de bajo grado de malignidad y son diagnosticados desde el inicio de la patología como GBM, mientras que los segundos se consideran como el final del estado de progresión de los tumores astrocíticos de bajo grado (Gömori *et al.*, 2012), por lo tanto se dice que el GBM es el más común y agresivo de los astrocitomas, se caracteriza por presentar varias alteraciones genéticas, afectando genes que controlan el crecimiento celular, apoptosis, angiogénesis e invasión además se identifica por varias alteraciones cromosómicas que afectan genes de control celular. Las alteraciones epigenéticas por sí solas o en combinación con mecanismos genéticos que afectan a la expresión de genes oncogénicos (Skiriute *et al.*, 2012). Dentro de la clasificación de los GBM, se tienen cuatro categorías que consideran la delección cromosómica en el tumor o amplificación, es un evento pronóstico relacionado a baja frecuencia de expresión donde se incluyen genes como: *IGF1R*, *PDGFRB*, *PIK3CA*, *CDK6*, *CCND1*, *CCNE1*, además delecciones en 5q35, 10q25, 22q13; así como las ganancias en los cromosomas 1q, 7 y pérdidas en 10q y 16q que se presentan en estos tumores (Bax *et al.*, 2010). Se han identificado 3 genes epigenéticamente desregulados en más del 50% de glioblastomas: *MGMT*, *GATA6* y *CASP8*, que se han considerado factores de predicción para la sobrevivencia de pacientes jóvenes (Skiriute *et al.*, 2012). Mientras que los glioblastomas primarios se caracterizan por múltiples alteraciones genéticas, comúnmente incluyen pérdida de heterocigosis del cromosoma 10, la amplificación y sobreexpresión de *EGFR*, delección de *CDKN2A* y mutación de *PTEN*; se sabe que sólo el 5% de glioblastomas se desarrollan a partir de la progresión de un astrocitoma preexistente grado II o grado III, estos GBM secundarios tienen amplificación de *EGFR* pero presentan con frecuencia la mutación de TP53 (von dem Knesebeck *et al.*, 2012).

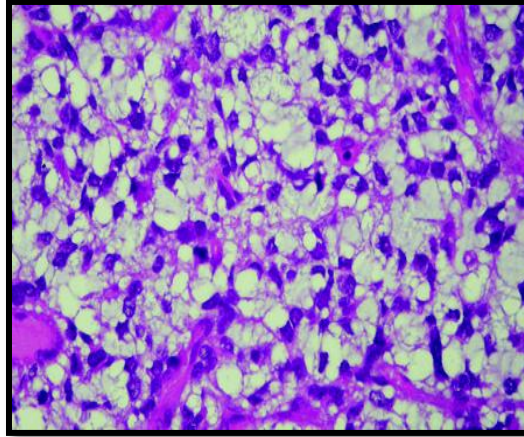


Figura 10. Histología de Glioblastoma Multiforme. Se muestra tinción H&E del tumor donde se observan células en mitosis, pleomorfismos y citoplasma.

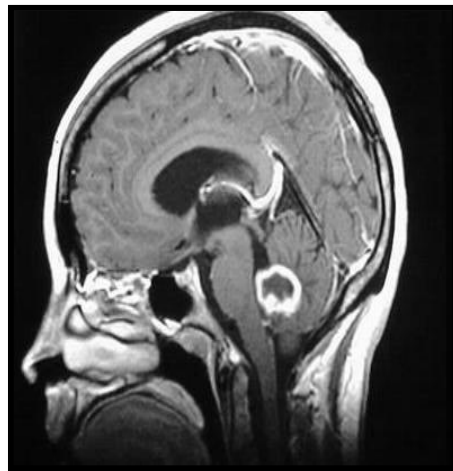


Figura 11. Localización de Glioblastoma. Se muestra por medio de IRM que la localización de la neoplasia en fosa posterior.

1.1.5. Meduloblastoma

El meduloblastoma, por definición nace en la fosa posterior (Figura 12) y se difunde por medio del Líquido Cefaloraquideo (LCR), es el tumor maligno encefálico más común de la niñez (Wu *et al.*, 2012), se suele diagnosticar en niños menores de 15 años de edad, con un pico entre los 3 y 4 años de y otro pico entre los 8 y los 9 años. Entre el 10 y el 15% de los pacientes son diagnosticados durante la lactancia. Los pacientes afectados son tratados con radiación en cerebro y médula espinal seguida de quimioterapia de alta dosis con los

consiguientes efectos deletéreos en el desarrollo del SNC (Wu *et al.*, 2012; Fernández *et al.*, 2013).

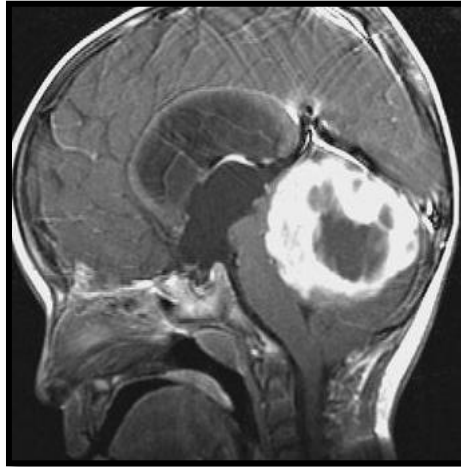


Figura 12. Localización del meduloblastoma. Se muestra por medio de IRM al tumor ubicado en fosa posterior

El meduloblastoma de tipo clásico o indiferenciado, comprende el 70% o más de estos tumores, está compuesto por células apiladas de modo denso, con núcleos hipercromáticos redondos, ovales o en forma de zanahoria y citoplasma mínimo (Figura 13). La variante de células grandes o anaplásica, que tiene núcleos pleomórficos, nucléolos prominentes y citoplasma más abundante (Packer *et al.*, 2008), se origina a partir de células primitivas dentro de zonas germinales cerebelosas, por lo que es considerado un tumor neuroectodérmico (Schwalbe *et al.*, 2011). La patología incluye cuatro subgrupos: Sonic hedgehog (*SHH*), subgrupo *WNT*, los subgrupos 3 y 4 que muestran diferencias en cariotipo, histología y pronóstico, el gen *EZH2* se muestra ganado y sobreexpresado, así como ganancias en el cromosoma 7q. En el cromosoma X se encuentra la mutación del gen *DDX3X* característica del subgrupo *WNT* (Robison *et al.*, 2012). La activación de diferentes vías de señalización en diversos subtipos sugiere que tienen distinto origen. Algunas anomalías en el meduloblastomas son las pérdidas en 6q, 8p, 9q, 10q, 11, 16q, 20, X; ganancias en 1q, 2p, 4q, 6q, 9p, 13q, 14q y 18 (de Bont *et al.*, 2008), siendo la más común el isocromosoma 17q, con la

pérdida de los brazos cortos, produciendo un cromosoma con 2 centrómeros pequeños. Las técnicas citogenéticas permitieron observar el isocromosoma en un 30 a 50% de los casos, además se han identificado pérdidas del cromosoma 10q (35%) (Collins., 2004). La metilación diferencial en el meduloblastoma pediátrico comprende la identificación de genes con metilación específica de promotor de *PTCH-1C*, un regulador negativo de la vía *SHH*; el gen *PTCH1* se ha descrito en el meduloblastoma con silenciamiento epigenético por la metilación del DNA que contribuye al desarrollo del cáncer, sugiere el uso de desmetilantes del DNA como estrategia potencial para terapia génica (Diede *et al.*, 2010).

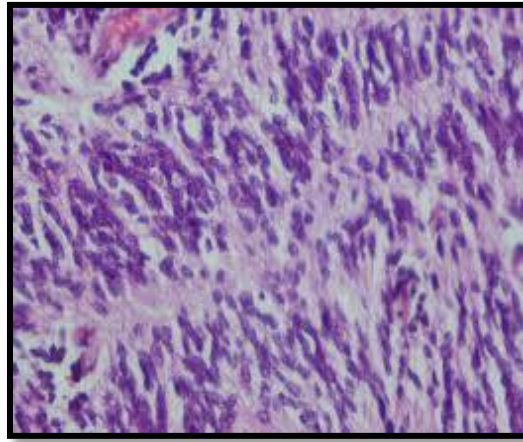


Figura 13. Histología del meduloblastoma. Se muestra la tinción H&E donde se muestran células alargadas en forma de zanahoria con núcleos hipercromáticos.

1.1.6. Germinoma

Los tumores de células germinales, comprenden alrededor del 2 al 5% de todos los TSNC pediátricos, nace predominantemente en la región pineal (Figura 14 y 15) y supraselar (Packer *et al.*, 2008); son considerados como las neoplasias más frecuentes de la región pineal (45-50%), constituyen el 75% de todos los tumores derivados de células germinales (Navas-García *et al.*, 2011). Estos tumores de células germinales intracraneales (CGT), se dividen en los siguientes tipos histológicos: germinoma, teratoma, carcinoma embrionario, tumor de saco vitelino y los tumores de células germinales malignos (Parwani *et al.*, 2005; Mufti *et al.*, 2012), aunque cabe mencionar que otros tipos de tumores pueden desarrollarse

en la región pineal como son gangliogliomas y ependimomas, con una frecuencia muy inferior a los tumores germinales (Navas-García *et al.*, 2011). Los pacientes con estos tumores presentan un incremento de la presión intracraneal, hidrocefalia obstructiva y/o síndrome de Parinaud, los pacientes con tumor suprasellar muestran diabetes insípida, síntomas de hipopituitarismo y desviación visual (Mabbot *et al.*, 2011). Se ha visto que los CGT ocasionalmente se diseminan al sistema ventricular y espacio subaracnoideo espinal, presentan rara vez metástasis, ocurriendo sólo del 3 al 5% de los casos (Asanuma *et al.*, 2012). Mientras que las células germinales cancerosas extragonadales son diagnosticados frecuentemente como germinoma (61.5%), teratoma (27.8%) y tumores germinales mixtos (8.5%) (Lee *et al.*, 2009).



Figura 14. Localización de germinoma. Los tumores germinales se localizan en fosa posterior, se muestra IRM donde se observa la ubicación del germinoma.

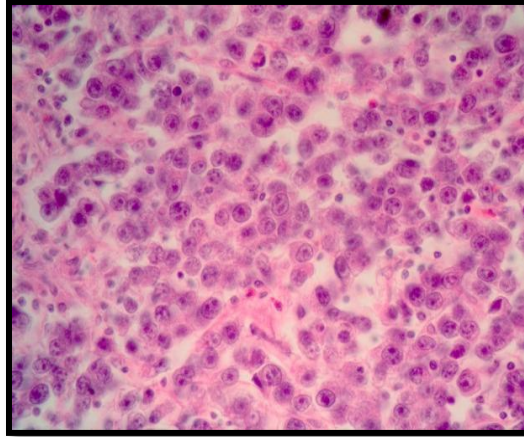


Figura 15. Histología del germinoma. Se muestra tinción de H&E donde se observa células largas redondeadas con núcleos vesiculares y citoplasma claro.

Los CGT se originan a partir de células germinales (Phi *et al.*, 2013) procedentes de residuos embrionarios (Parwani *et al.*, 2005), comparten características histológicas con células germinales gonadales (Lee *et al.*, 2009), motivo por el cual se ha tratado de dilucidar cómo es que estas células germinales (GC) llegan a la región pineal dando origen a una neoplasia con ubicación específica alrededor del tercer ventrículo (Phi *et al.*, 2013). Actualmente hay dos teorías dominantes sobre el desarrollo de las GC: la primera teoría de las células germinales propone que estas células primordiales están fuera de lugar en la migración debido a una migración aberrante durante la tercera y cuarta semana de gestación para localizarse en la línea media cerebral; mientras que la segunda teoría propone una distribución generalizada de las células germinales durante embriogénesis normal en el cerebro, timo, hígado y médula ósea; proporcionan funciones reguladoras en los diferentes sitios (Lee *et al.*, 2009). En los CGT se han encontrado alteraciones cromosómicas como ganancias en 12p, 8q, 13q, 18q y 9q32-qter, pérdidas en 13q, 18q y 9q (Rickert *et al.*, 2000). La metilación aberrante de DNA ha sido implicada en la etiología de múltiples tipos de cáncer y tiene una potencial relevancia en GCTs permitiendo la reprogramación epigenética sucedida durante el desarrollo normal (Amatruda *et al.*, 2013).

1.2. Metilación

La Metilación del DNA es un proceso único y notable porque implica la modificación covalente del material genético de una célula en promotores de genes, la metilación generalmente conduce al silenciamiento de la transcripción. Después de cada replicación, una DNA metiltransferasa permite el mantenimiento de los patrones de metilación a través de múltiples generaciones (Ziberman *et al.*, 2007); la metilación es una alteración epigenética que hereda un cambio fenotípico a las células con consecuencias funcionales; este cambio es importante durante procesos biológicos como el desarrollo embrionario temprano, diferenciación de células madre, expresión de genes tejido-específicos. En células normales, las islas CpG asociadas a promotores están generalmente no-metiladas con excepción de la inactivación del cromosoma X o impronta genómica (Lok-HayYim *et al.*, 2012).

El DNA al ser modificado químicamente puede ocasionar daños en sí mismo, lo cual activa varios mecanismos de reparación para prevenir la acumulación de mutaciones, dentro de estas alteraciones se encuentra la metilación que a diferencia de las otras alteraciones perjudiciales no activan a los mecanismos de reparación, a pesar de que la metilación del DNA es esencial para el desarrollo (Watanka *et al.*, 2011) y es un prerequisite para la expresión de genes o diferenciación de tejido (Volpe, 2005); se ha mostrado su participación como un importante mecanismo de silenciamiento de genes en cáncer (Roger *et al.*, 2012), la hipermetilación de islas CpG es de gran importancia en el desarrollo tumoral (Alonso *et al.*, 2004). La pérdida global de metilación de DNA es conocida como una aberración epigenómica asociada con carcinogénesis y progresión de cáncer, afectan predominantemente a elementos repetitivos (Xie *et al.*, 2010). La metilación de dinucleótidos CpG puede resultar en la represión génica por cambio en la unión de los factores de transcripción y mediante la inducción de cambios en la estructura de la cromatina que forma un DNA más compacto (Wantaka *et al.*, 2011), representa una alternativa para la inactivación de genes (González *et al.*, 2003). La metilación como inestabilidad genómica puede ser sugerida como una fuerza impulsora de la tumorigénesis, inducida por los cambios genéticos y

epigenéticos; mientras que las características de auto-renovación en células madre se comparte con las células tumorales y la función anormal de las redes de regulación celular contribuyen de manera compleja a la transformación maligna y al establecimiento de una célula madre oncogénica (Tysnes, 2010). Igualmente la metilación de histonas tiene un rol importante en la regulación de la transcripción, por ejemplo la histona H3K1me-3 está asociada con represión y la histona H3K4me-3 se conoce como un marcador de activación de genes (Li *et al.*, 2011).

La metilación de la región del promotor es el mecanismo que más afecta la expresión de genes en tumores. Estudios recientes de metiloma en tumores cerebrales revela una lista de modificaciones epigenéticas; donde se ha demostrado que estas alteraciones epigenéticas afectan múltiples genes de regulación celular como reparación del DNA, migración celular y apoptosis (Skiriute *et al.*, 2012). Además en estudios epigenéticos se ha evidencia que la hipermetilación del promotor de islas CpG se considera como un mecanismo de inactividad de genes supresores de tumores, la metilación juega un rol importante en la recurrencia de gliomas. El orden de la estabilidad de la transformación histológica y progresión clínica se asocia con la inactivación epigenética (Gömori *et al.*, 2012). Actualmente se ha descrito que la hipometilación del DNA en gliomas, afecta a 10 millones de dinucleótidos de islas CpG del genoma en GBM. Este fenómeno aparece asociado con la evolución de la malignidad celular a través de la activación de oncogenes, promoción de la inestabilidad genómica y pérdida de la impronta génica (Martínez *et al.*, 2012). A través de estas islas CpG el DNA es metilado usualmente en tejidos normales, algunos procesos fisiológicos requieren de la metilación del DNA, por lo cual a través de estos mecanismos se regula la expresión de genes en SNC y otros órganos; en particular se sabe que el cerebro humano es una compleja estructura con una conexión epigenética anatómica. Los procesos que envuelven los cambios genéticos y epigenéticos que distribuyen la función normal de las vías de señalización de la traducción para la regulación de procesos celulares como la proliferación, adhesión, migración y diferenciación (Alelú-Paz *et al.*, 2012); promueven la iniciación o progresión del tumor (Muñoz *et al.*, 2012).

1.3. Metilación en TSNC

La metilación como modificación química en citosina que enzimáticamente se adiciona un grupo metilo, de tal manera que pueden presentarse un estado metilado o no metilado, se encuentran generalmente las Islas CpG no metiladas en los tejidos normales, pero con frecuencia hipermetiladas en cáncer; se asocia con el silenciamiento de genes y desempeña un papel importante en la inactivación de supresores de tumores en la carcinogénesis (Zhang *et al.*, 2012). Durante el desarrollo y progresión tumoral las anormalidades epigenéticas que ocurren son: hipermetilación (afecta islas CpG) e hipometilación global (puede ocurrir predominantemente); se sabe que en el humano la mayoría de islas CpG se encuentran hipometiladas, lo que provoca el silenciamiento de los genes encargados de la regulación del ciclo celular (Waha *et al.*, 2004; Otsuka *et al.*, 2009). En los tumores ependimarios se muestra una evidencia de metilación (Lindsey *et al.*, 2006) que sugiere la subexpresión y el silenciamiento de genes supresores de tumores (Otsuka *et al.*, 2009) es un mecanismo importante en el desarrollo de los EP (Rogers *et al.*, 2012) porque en algunos estudios se encontró la metilación de uno o más genes relacionada al desarrollo tumoral en aproximadamente el 89% de los casos estudiados (Alonso *et al.*, 2004).

Los cambios en la metilación se han reportado en EP supratentoriales y de médula espinal al encontrarse genes significativamente hipermetilados, este perfil se asocia con un aumento en la expresión de genes que codifican para proteínas implicadas en la metilación del DNA, sugiriéndose al silenciamiento epigenético de supresores de tumores como un mecanismo importante en el desarrollo tumoral (Roger *et al.*, 2012). Además se ha demostrado que estos tumores tienen distintos patrones de expresión génica, ganancias y pérdidas cromosómicas dependiendo de la localización anatómica del tumor (López- Aguilar *et al.*, 2009).

En los GBM se reportaron genes metilados como *MGMT*, *IDHI*, considerándolos como criterios de pronóstico y predicción de respuesta a terapia, mientras que *EGFR* sobreexpresado es el responsable de la angiogénesis de estos tumores, además se encuentra asociado a la mutación de *TP53* (Zinn *et al.*, 2012). Por otra parte, en los astrocitomas grado II se han asociado alteraciones genéticas en el

gen *TP53* en el 60% de los casos, *IDH1* en el 70%, igualmente se encontró hipermetilado el promotor de *MGMT*, el supresor de tumores *EMMP3*, y baja regulación de *MDM2* asociado a la degradación de *p53* (Martínez, 2012). En general los gliomas comparten, dependiendo del grado histopatológico, factores genéticos tumorales como la presencia de co-supresión de *IDH1*, metilación del promotor *MGMT* (Havik *et al.*, 2012), silenciamiento de *TP53* en los gliomas incluyendo oligodendrogliomas (Koeller *et al.*, 2005). Por otra parte, en los meduloblastomas se encuentra silenciada la vía del receptor *SHH* (sonic hedgehog), *WNT* y el gen *MYCC* metilado es considerado para pronóstico de la respuesta a tratamiento en pacientes (Packer *et al.*, 2008).

1.4. Cambios cromosómicos en TSNC

Las aberraciones cromosómicas son importantes para el desarrollo del EP, se relacionan frecuentemente en eventos del desarrollo tumoral y se han visto asociadas con la localización anatómica (Milde *et al.*, 2011). Estas aberraciones pueden ser de ganancia y/o de pérdida de cromosomas, algunas de las encontradas frecuentemente en los EP es la ganancia en el cromosoma 1q, asociado a un peor pronóstico (Costa *et al.*, 2011), también las ganancias en los cromosomas 7p, 9q (Milde *et al.*, 2011), 12 (Rousseau *et al.*, 2010), 15q y las pérdidas encontradas son en los cromosomas 6q y 14q (Costa *et al.*, 2011; Shonka, 2011). Estas aberraciones en algunos estudios se relacionan como causantes de la pérdida de expresión de genes como *EGFR* (Moreno *et al.*, 2009; Costa *et al.*, 2011), *CDKN2A*, *p16INK4A*, *p14ARF* (Asmoniene *et al.*, 2011). En GBM se encuentra correlación entre la pérdida del cromosoma 10q26 con la baja expresión y/o metilación de *MGMT* en estos tipos de tumores (Havik *et al.*, 2012), en oligodendrogliomas reportan pérdidas en los cromosomas 1p, 1p32 y 19q en un porcentaje del 40 a 80% de los casos; mientras que en meduloblastomas se ha reportado pérdida en el cromosoma 6, 9q22.3 y 17p13.2 (Schwalbe *et al.* 2011). Para la población mexicana se encontró un alto grado de desbalance genómico, elevado número de aberraciones que correlacionan con la agresividad del tumor y están asociadas a determinados tipos (López-Aguilar *et al.*, 2009).

1.5 MicroRNAs y Cáncer

Los MicroRNAs (miRNA) se encuentran involucrados en diversos procesos biológicos como el crecimiento celular, regulación del ciclo celular, apoptosis, diferenciación, proliferación, invasión y metástasis en cáncer mediante la regulación activa de la transcripción de genes, además algunos miRNAs pueden regular genes blanco ya sea post-transcripcionalmente y modificaciones epigenéticas al afectar la expresión del gen Diana específico (Li *et al.*, 2014). Se sabe que debido a sus funciones juegan un rol crítico en la patogénesis del cáncer, resistencia al tratamiento (quimio y/o radioterapia) y metástasis. Estos miRNAs intervienen durante el desarrollo tumoral mediante la regulación de vías de señalización (Cheng *et al.*, 2013), además de su rol esencial en la malignidad del tumor como supresores de tumores y oncogenes al participar en la progresión del tumor mediante la inhibición de la apoptosis y represión tumoral; estos miRNAs están implicados en la patogénesis del cáncer por regulación transcripcional de la expresión la cual se ve disminuida con frecuencia en las neoplasias, por lo tanto muchos miRNAs pueden tener el potencial de supresores de tumores. Diferentes miRNAs pueden ser asignados en diversos tipos de tumores, sirven como fenotipo característico para los distintos tipos de cáncer así como diagnóstico, pronóstico y posible terapia. Los miRNA supresores de tumores usualmente previenen el desarrollo del tumor pero inhiben negativamente oncogenes y/o genes que controlan la diferenciación celular y apoptosis, por lo que al identificar el rol de los miRNAs en el cáncer, y conocer la secuencia de su sobreexpresión y subexpresión pueden ayudar a dilucidar la iniciación y desarrollo de los varios tipos de neoplasias (Ahmad *et al.*, 2013).

Actualmente se conocen cientos de miRNAs mapeados en el genoma humano que son alterados en cáncer, algunos de los cuales son: miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92, miR-106a y miR-155 (Raisch *et al.*, 2013).

2. Objetivos

4.1 General

- Relacionar los cambios del patrón de metilación con las alteraciones cromosómicas en TSNC, ubicados en fosa posterior en pacientes pediátricos.

4.2 Particulares

- Determinar los perfiles de metilación en TSNC, ubicados en fosa posterior.
- Determinar las alteraciones cromosómicas (pérdidas o ganancias) en TSNC ubicados en fosa posterior.
- Identificar por bioinformática los genes que tuvieron cambios en la metilación.
- Identificar por bioinformática los genes con duplicaciones o deleciones.
- Identificar por bioinformática los genes y los miRNAs que se encuentran en las regiones con alteraciones cromosómicas.

3. Antecedentes

En EP se encuentran genes hipermetilados considerados genes supresores de tumores como *CDKN2A* (encontrada en un 25% de los EP), *CDKN2B*, *HIC1*, *RASSF11*, *CASP8*, *MGMT*, *TP73* (Rosseau *et al.*, 2007 Milde *et al.*, 2011 y *et al.*, 2012) y *RB1* (González *et al.*, 2003), genes asociados con la progresión del ciclo celular: *CDKN2/ p16/ MTS1*; reparación de DNA: *MLH1*, adhesión celular: *CDH1*, *E-Cadherina*, supervivencia celular: *DAPK1*, factores de transcripción: *GATA4*, receptores mediados por vías de señalización: *ESP1* (Wantaka *et al.*, 2011), regulación de proliferación de células madre, pluripotenciales y diferenciación neuronal por ejemplo: *THAPII*, *PSPH*, *EPHB2*, genes en el grupo de *PCDH*, *KCNN9*, *RAB3A*, *PTPRN2*, miembros de las vías Sonic Hedgehog y Notch (Wani *et al.*, 2012), este último es el único candidato oncogén de EP identificado hasta el momento (Johnson *et al.*, 2010) y es considerado como una “llave reguladora” de oncogenes de EP (Peyre *et al.*, 2010). Los genes reportados con alta frecuencia de metilación en más del 20% son *TP73*, *TIMP3*, *MGMT*, en tumores de bajo grado se encuentran metilados *RB1*, *DAPK*, *Caspasa 8* (Alonso *et al.*, 2004). Igualmente se han descrito genes hipometilados como *PEG3* que tiene un rol importante en la tumorigénesis mediante proliferación celular por activación de *BF-KB2* y en apoptosis mediado por *p53* (Otsuka *et al.*, 2009).

Finalmente existen informes de algunos genes que pueden ser considerados como factores pronósticos como metalotioneina (*MT*) al encontrarse con baja regulación en un 80% de las recurrencias en pacientes, mientras que *Ki-67* puede ser un factor pronóstico negativo y característico de la diseminación del tumor a la médula espinal (López *et al.*, 2009).

Como se mencionó anteriormente se ha propuesto a la metilación como uno de los cambios epigenéticos de gran importancia para el desarrollo del tumor con el silenciamiento de algunos genes como son los supresores de tumores.

Generalmente la hipometilación del DNA en gliomas afecta más de 10 millones de islas CpG, fenómeno asociado a la evolución genómica celular a través de la activación de oncogenes, promoción de inestabilidad genómica y pérdida de

impronta génica. En GBM, se encontraron genes inactivados mediante hipermetilación relacionados con la baja expresión de los genes relacionados a supresión de tumores (*RB1*, *VHL*, *EMP3*, *RASSF1A*, *BLU*), regulación del ciclo celular (*CDKN2A/CDKN2B*), reparación de DNA (*MGMT hMLH1*), y apoptosis (*DAPK1*, *TIMP3*, *CDH1*), en este contexto el gen *MGMT* se encuentra metilado en un 75% de los glioblastomas (Martínez, 2012).

4. Justificación

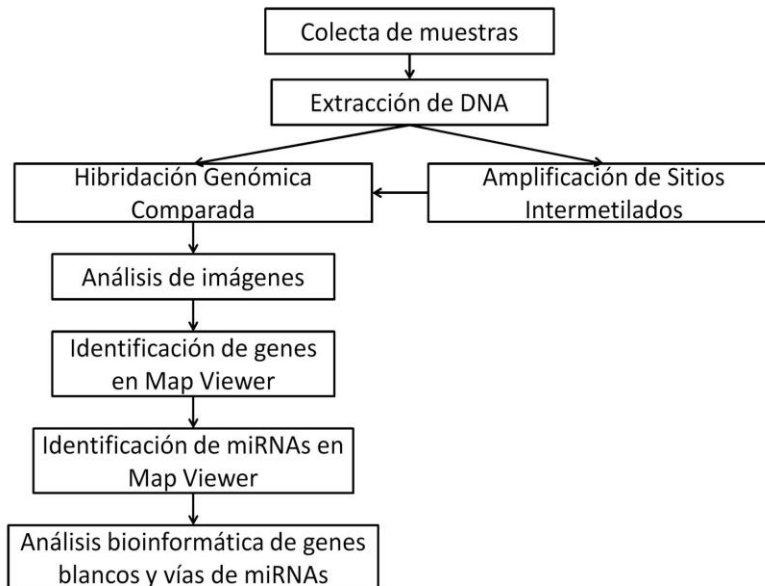
Los cambios de expresión genética en procesos oncogénicos son los encargados de los grandes cambios celulares como la metilación, que ha sido propuesta como uno de los factores importantes para el silenciamiento de genes supresores de tumores en procesos oncogénicos, lo que hace importante analizar los patrones de metilación y las alteraciones cromosómicas en TSNC de fosa posterior, así como analizar si comparten entre sí un patrón de metilación y alteraciones cromosómicas específicas los TSNC.

5. Hipótesis

Los genes supresores de tumor y los genes relacionados con apoptosis de los tumores de sistema nervioso central ubicados en fosa posterior, se encuentran hipermetilados mientras que los genes relacionados con proliferación celular y oncogenes están hipometilados. Además, existen alteraciones cromosómicas semejantes en los diferentes tumores.

6. Metodología.

6.1.- Diseño experimental



6.2. Colección de muestras

Las muestras de TSNC fueron obtenidas a partir de tejido tumoral de pacientes pediátricos entre 0 y 16 años de edad, se obtuvo una N=12 (Tabla 1); este tejido fue extraído quirúrgicamente como parte del tratamiento e identificadas mediante el análisis histopatológico. Posteriormente, las muestras de tejido fueron almacenadas a -80°C para su uso durante los experimentos planeados en este proyecto. Como grupo testigo se utilizó tejido no afectado de la misma región, cuando fue posible obtenerlo o biopsias de cerebro de paciente con epilepsia (como parte del tratamiento). Las muestras fueron obtenidas del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” y del Hospital General “Dr. Gaudencio González Garza” del Centro Médico Nacional “La Raza”, IMSS.

Tabla 1. Muestras colectadas

Muestra	Edad del paciente (años)	Sexo del paciente
Ependimoma 1	1	Masculino
Ependimoma 2	9	Femenino
Astrocitoma 1	6	Femenino
Astrocitoma 2	4	Masculino
Oligodendroglioma 1	9	Masculino
Glioblastoma 1	11	Masculino
Meduloblastoma 1	1	Femenino
Meduloblastoma 2	4	Masculino
Meduloblastoma 3	15	Masculino
Germinoma 1	13	Masculino
Germinoma 2	13	Masculino
Teratoma 1	11	Masculino

6.3. Criterio de selección

Criterios de inclusión

- Pacientes entre 0-16 años de edad
- Pacientes masculinos o femeninos con diagnóstico confirmado por servicio de patología.
- Consentimiento para la realización del estudio.

Criterio de exclusión

- Muestra insuficiente o dañada

6.4. Obtención de ácido nucleicos

El DNA fue obtenido mediante la maceración del tejido con el TissueLyser de la marca Quiagen, utilizando un motor con frecuencia de 30 Htz por dos minutos, el tejido para su disgregación fue colocado en amortiguador de lisis y posteriormente se realizó la extracción del DNA por el método orgánico de Fenol-Cloroformo-Isoamílico que consiste en una precipitación de las proteínas y una serie de

lavados para la purificación del DNA (Anexo 1). El ácido nucleico obtenido fue cuantificado por espectrofotometría utilizando el Nanodrop 1000 de marca Thermo Scientific y su integridad fue analizada mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8%.

6.5. Hibridación Genómica Comparada

El análisis de alteraciones cromosómicas se evaluó mediante la técnica de Hibridación Genómica Comparativa (CGH) que es un método citogenético molecular para detectar el desbalance cromosómico entre genomas (Schubert et al., 2005). Con este fin se crearon sondas mediante el método de “*Nick Translation*” (Invitrogen) o “*Random Primer*” (Abbott molecular), siguiendo el protocolo establecido por la marca.

6.5.1. Marcaje con “*Nick Translation Kit*”

En un tubo para PCR se adiciono, 1 µg de DNA genómico, 0.2 mM de “*Spectrum Green*” dUTP (para el DNA tumoral) o “*Spectrum Red*” dUTP (para el DNA testigo), 0.1 mM de dTTP, 0.3 mM de dNTPs, 5X de amortiguador “*nick translation*”, 25 unidades de la enzima “*nick translation*”, se incubó por 1 hora a 15 °C seguido 10 min. a 70 °C. El tamaño de las sondas fue verificado mediante un gel de agarosa al 1%, esperándose bandas de 200 a 2000 pb.

6.5.2. Marcaje con “*Random Primer*”

El macaje fue realizado con el Kit “*Random Primer*” de la marca Invitrogen, posterior al corte y a la preparación de sondas mediante el ensayo de Amplificación de Sitios Intermetilados, siguiendo el protocolo establecido por la marca (Ver Anexo II).

6.5.3. Preparación de la sonda

Para la preparación de la sonda se realizó una mezcla, agregando 200 ng de DNA tumoral marcado con “*Spectrum Green*”, 200 ng del DNA testigo marcado con “*Spectrum Red*”, 10 µg de *human Cot 1-1*, 0.5 volúmenes de acetato de sodio 3 M,

2.5 volúmenes de etanol absoluto; se incubó durante 24 horas a -20 °C, al término de los cuales se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min. a 4 °C para obtener la pastilla de DNA, el sobrenadante fue removido y se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente. La pastilla fue resuspendida en 20 µl de amortiguador de hibridación para CGH, posteriormente se desnaturalizó en baño maría a 73 °C durante 5 min.

6.5.4. Hibridación de las sondas sobre cromosomas en metafase

La hibridación se realizó en laminillas con cromosomas en metafase de individuos sanos de sexo masculino, de la marca Vysis. Las laminillas fueron sumergidas en solución desnaturalizante (49 ml de formamida, 7 ml de SSC 20 X, y 14 ml de agua purificada) durante 5 min a 72 a 73 °C; continuando con la deshidratación de las laminillas durante 2 min en etanol al 70 %, 2 min en etanol al 85 % y 2 min en etanol al 100 %, se dejó secar la laminilla; posteriormente se agregó 10 µl de la mezcla de las sondas desnaturalizada a las laminillas en metafase y se colocó en un cubre objetos sellándolo con cemento de goma; para su hibridación las laminillas fueron colocadas dentro de una cámara húmeda para ser incubadas a 37 °C durante 72 horas.

6.5.5. Lavado de laminillas hibridadas

Se retiró el sello de cemento de goma a las laminillas y se colocaron en una solución de lavado (0.4 X SSC / 0.3 % NP-40) a 75 °C, las laminillas se agitaron por algunos segundos y dejaron reposar en la solución durante 2 min. Posteriormente se incubó en nueva solución de lavado a temperatura ambiente y se agitaron nuevamente de 3 a 5 seg dejándolas reposar por 1 min, por último se le agregó DAPI-II para obtener el patrón de bandeo.

6.5.6. Visualización y análisis de laminillas

Para la visualización de las laminillas hibridadas se utilizó el microscopio de fluorescencia marca Olympus BX60 acoplado al sistema de cómputo para procesar el análisis de resolución de imágenes en el programa Case Date Manager 6.0 (Applied Spectral Imaging); programa que permite llevar a cabo el

acoplamiento de las imágenes obtenidas con cada uno de los fluoróforos así como la obtenida del DAPI-II a partir de la cual se identificaron los cromosomas. El análisis de las alteraciones cromosómicas fue realizado a partir del promedio de ganancias y/o pérdidas de por lo menos 15 cromosomas, basándose en la proporción de intervalos 1.20 y 0.75 (Weiss et al., 1999).

6.6. Análisis del patrón de metilación

El patrón de metilación se analizó mediante la técnica de Amplificación de Sitios Inter-metilados (AIMS) siguiendo el procedimiento reportado por Frigola *et al.* (2002) el cual se basa en el corte de dos enzimas de restricción siendo una de ellas sensible a metilación, el corte se realizó en las islas CpG; después se hizo la ligación del DNA cortado a adaptadores que funcionaran como regiones flanqueadas a partir de las cuales se amplificó el DNA metilado mediante una Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), posteriormente se realizó un CGH, marcando las sondas con el método de “*Random Primer*”.

6.6.1 Corte enzimático

El DNA fue cortado con la enzima no sensible a metilación “*SmaI*” (New England BioLabs) con las siguientes concentraciones: amortiguador al 1X, 100 mg/ml de BSA y 20 unidades de la enzima, la reacción se incubó durante 22 horas a 25 °C; se realizó un segundo corte con la enzima sensible a metilación “*XmaI*” (New England BioLabs) se mantuvieron las mismas concentraciones de la anterior con 4 unidades de la enzima, incubándola a 37 °C durante 22 horas.

6.6.2 Unión de adaptadores

El DNA cortado fue unido a las secuencias de adaptadores: MCF (5'-CCGGTCAGAGCTTTGCGAAT-3') y Azul (5'-ATTCGCAAGCTCTGA-3'), que permitieron la amplificación de los fragmentos metilados. El DNA fue ligado mediante la enzima T4 DNA Ligasa (New England BioLabs) a 16 °C durante 16 horas con las siguientes concentraciones: amortiguador 1X, 0.1 µl de DNA T4 Liagasa, 2 nmol de adaptador.

6.6.3 PCR

Finalmente se realizó la PCR que se indica en el protocolo, a partir de las secuencias de adaptadores con las siguientes concentraciones: amortiguador 10 mM, Mg 2 mM, Oligos 1.1 μ M, dNTPs 125 μ M, Taq polimerasa 2 U, H₂O a 25 μ l y con las siguientes condiciones: temperatura de inicio 95 °C por 1 min, 30 ciclos de 94 °C 15 seg, 40.9 °C 45 seg, 72 °C 1 min y una temperatura de extensión de 72 °C por 5 min.

6.7 Análisis de regiones modificadas.

Después de conocer las regiones metiladas y las alteraciones cromosómicas se identificaron los genes que se encuentran en estas regiones mediante la base de datos NCBI - Map Viewer, poniendo especial interés sobre los genes que participan en la regulación del ciclo celular, supresores de tumores, sistema inmune y en funciones relacionadas con el Sistema Nervioso Central. Igualmente se consideraron los micro RNAs (miRNA) que se encuentran en las regiones alteradas y/o presentaron cambio en el patrón de metilación, con respecto al testigo. Posteriormente, se analizaron los genes que se encuentran regulados por los miRNA relacionados con procesos oncogénicos, ubicados dentro de las regiones analizadas, en las bases de datos miRBase, GeneCards, para identificar las vías donde se encuentran los miRNAs de interés involucrado se hizo un análisis bioinformático mediante la base de datos DIANA LAB (DNA Intelligent Analysis).

7. Resultados

7.1 Extracción de DNA

El DNA fue extraído a partir de TSNC frescos, colectados durante las cirugías realizadas como parte del tratamiento. Se observó la integridad del DNA (Figura 16).

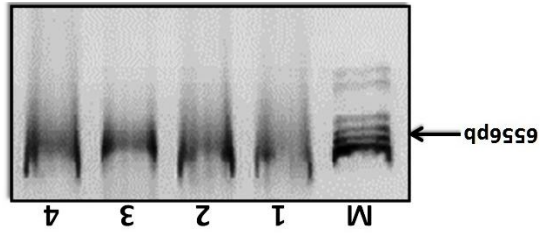


Figura 16. Integridad del DNA extraído. 1. Marcador λ -Hind-III, 1- 4 DNA extraído de TSNC en fresco.

7.2 Hibridación Genómica Comparada.

Se llevó a cabo el CGH para cada uno de los tumores colectados, para lo cual se marcaron las sondas con "Nick Translation" (Figura 17). Se escogieron las muestras que cumplían con el tamaño de las sondas óptimas para la hibridación sobre los cromosomas en metafase.

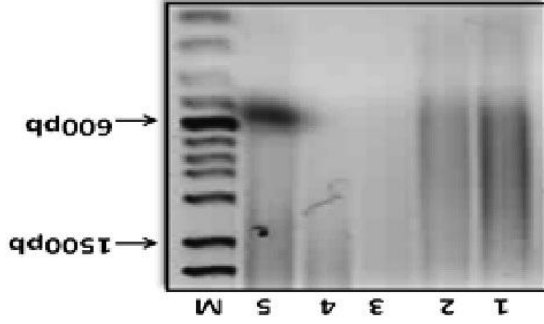


Figura 17. Sondas marcadas con CGH. 1 – 5.- Se muestra el barrido de las sondas obtenidas, de acuerdo a lo esperado de 200 a 2000pb. M.- Marcador de 100 pb.

Posteriormente se hibridaron los cromosomas, así como la visualización e interpretación de las laminillas. Los cromosomas en metafase fueron por lo menos

15 de cada uno para que el programa realizara la sumatoria de las regiones pérdidas o ganadas de los cromosomas analizados (Figura 18).

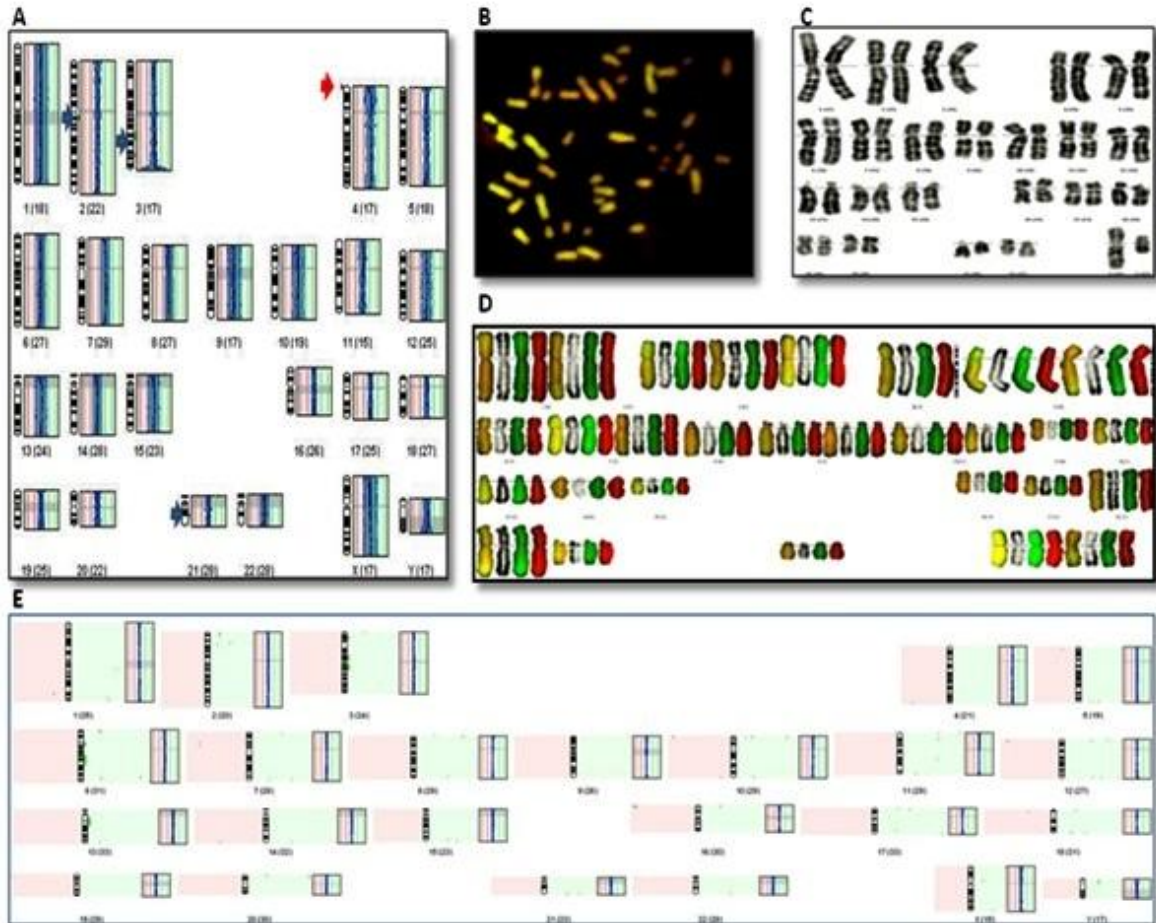


Figura 18. Procesamiento de imágenes de CGH. Se muestra las imágenes obtenidas con el programa de análisis, permitiendo hacer la sumatoria de las regiones alteradas. **A)** Histograma generado por el programa. **B)** Cromosomas en metafases con fluorocromos acoplados. **C)** Cromosomas en metafase con patrón de bandeado. **D)** Cromosomas teñidos con cada uno de los fluorocromos. **E)** Sumatorias de las regiones alteradas por cada par de cromosomas.

Se analizaron las regiones pérdidas o ganadas en cada uno de los tumores estudiados (Figura 19 - 30).

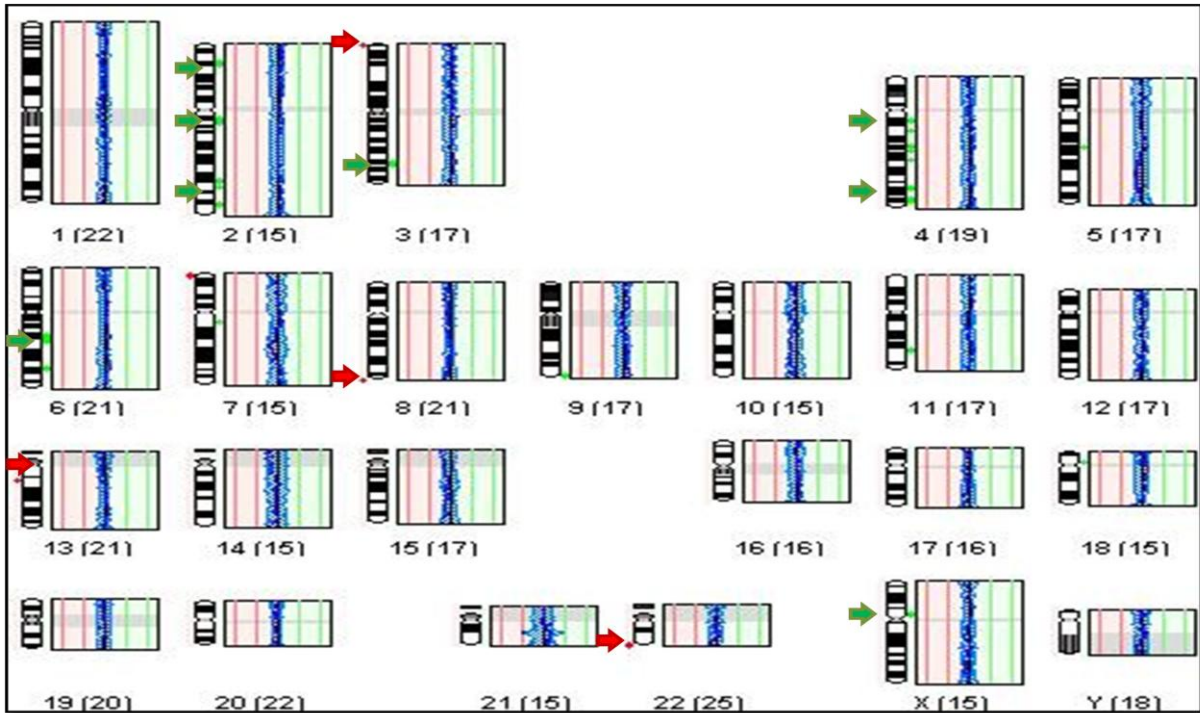


Figura 19. Alteraciones cromosómicas en Ependimoma 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

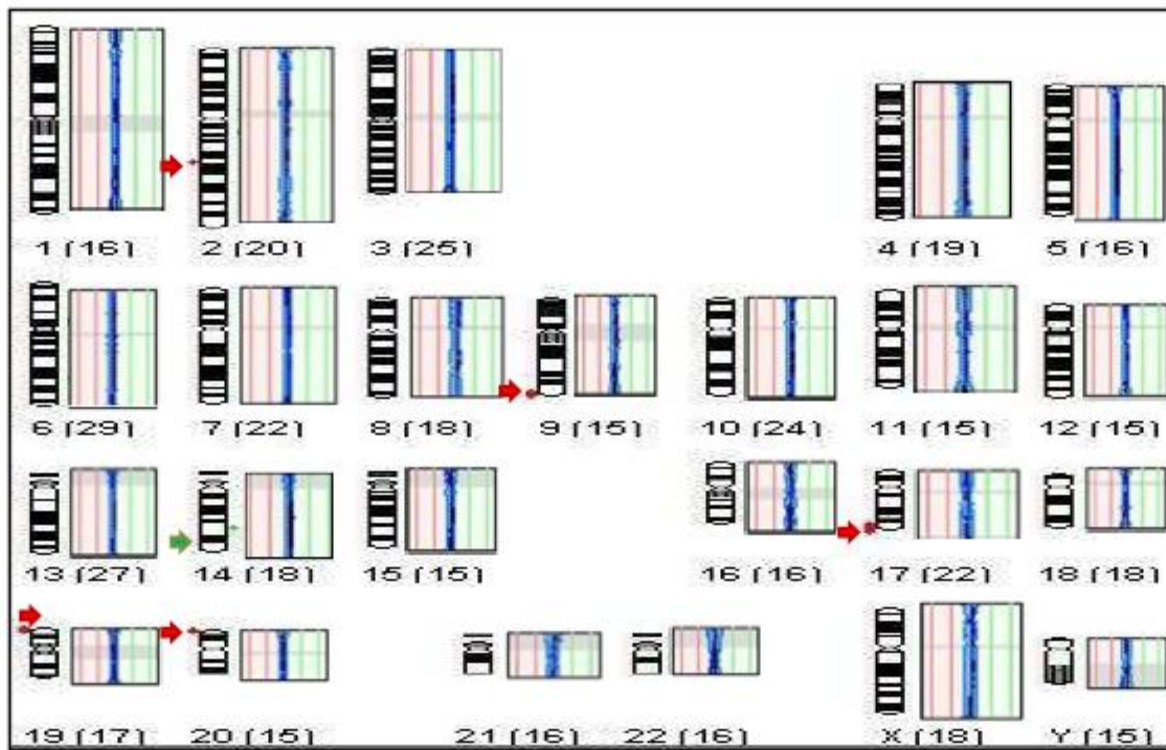


Figura 20. Alteraciones cromosómicas en Ependimoma 2 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

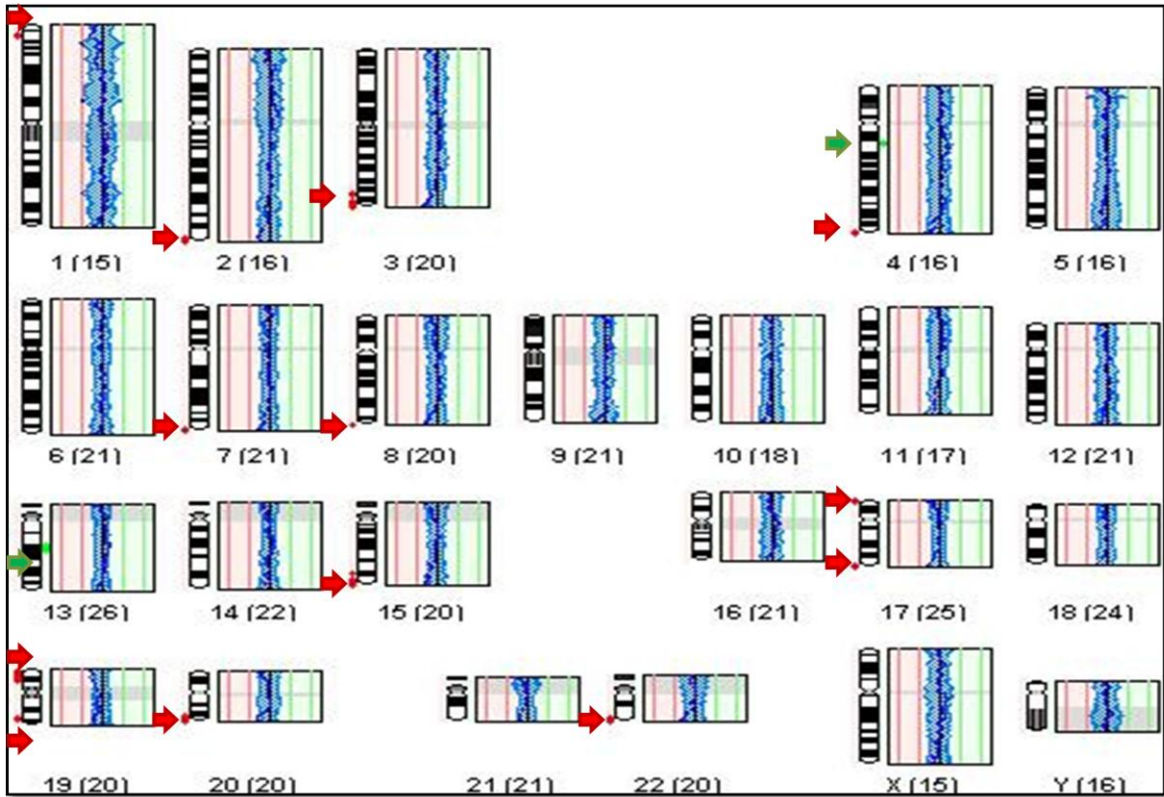


Figura 21. Alteraciones cromosómicas en Astrocitoma 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

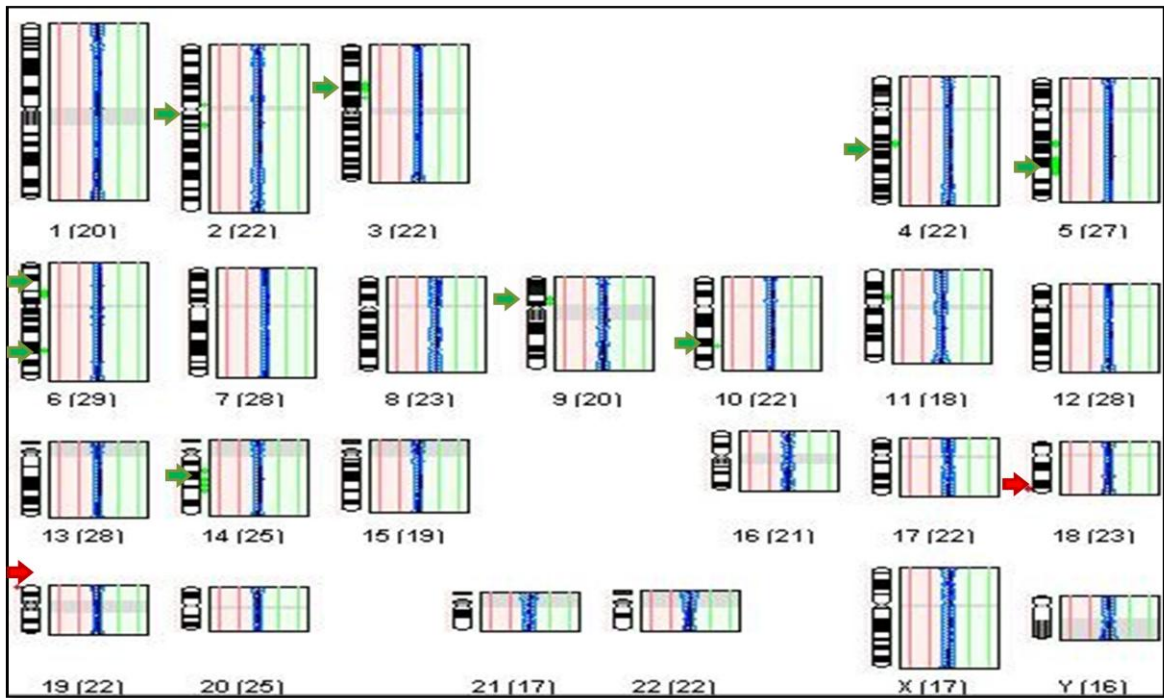


Figura 22. Alteraciones cromosómicas en Astrocitoma 2 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

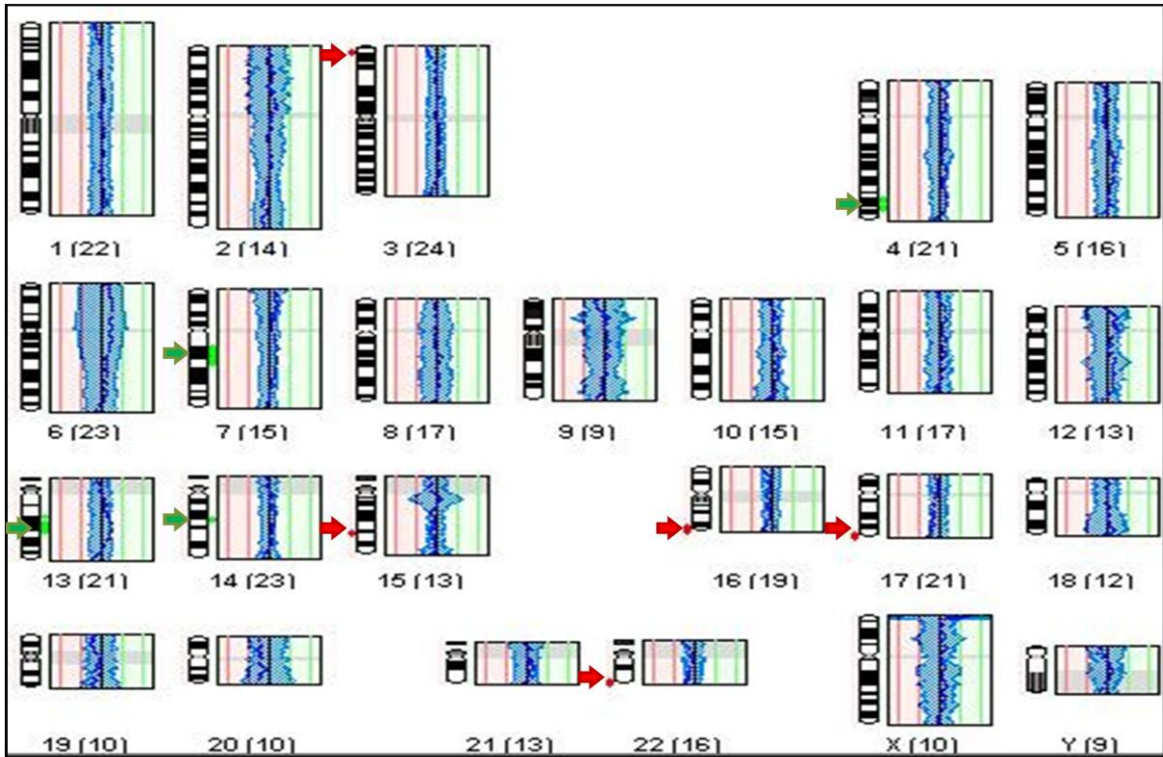


Figura 23. Alteraciones cromosómicas en Oligodendroglioma 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

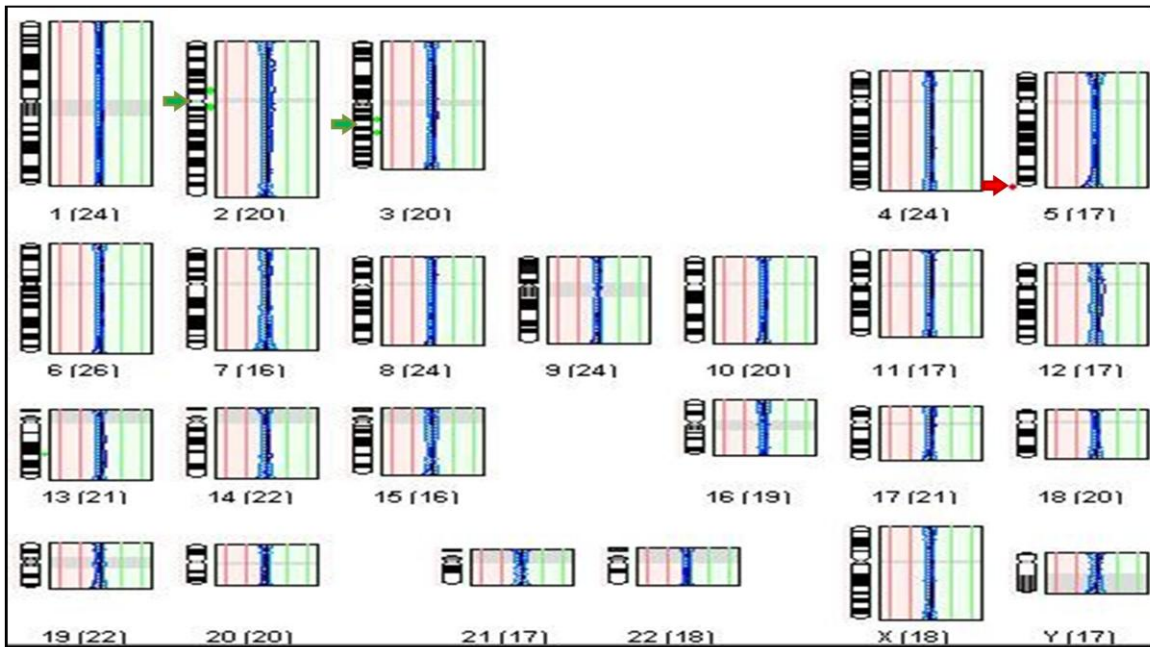


Figura 24. Alteraciones cromosómicas en Glioblastoma Multiforme 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

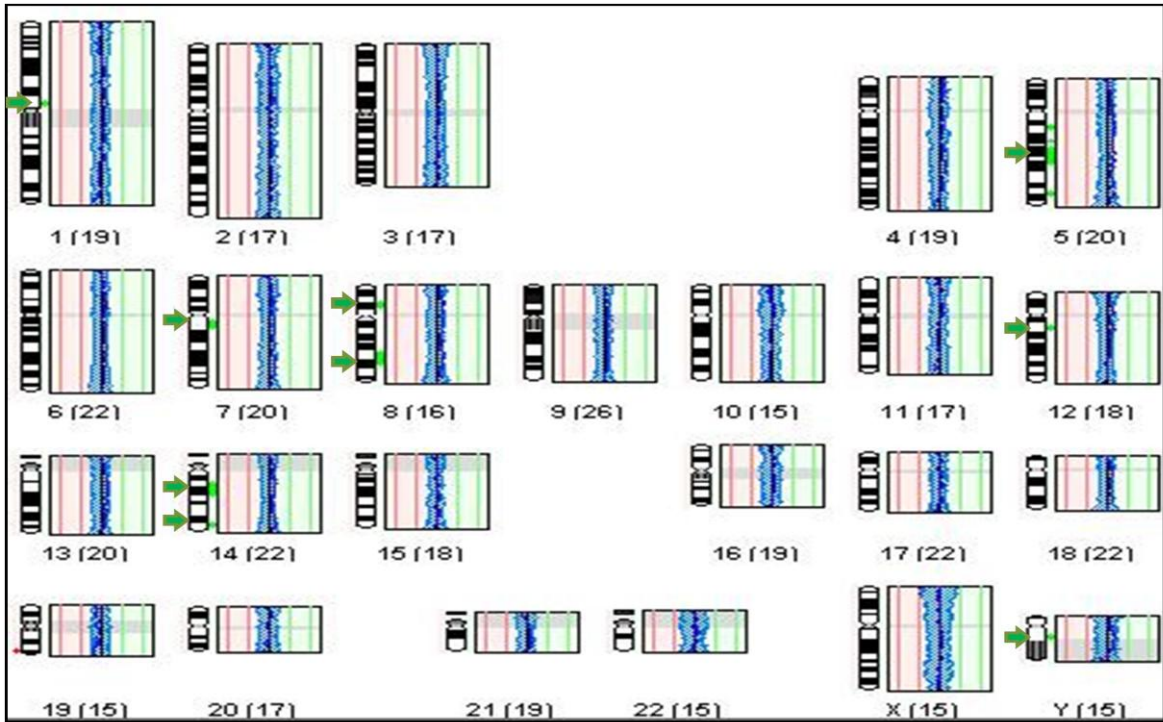


Figura 25. Alteraciones cromosómicas en Meduloblastoma 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

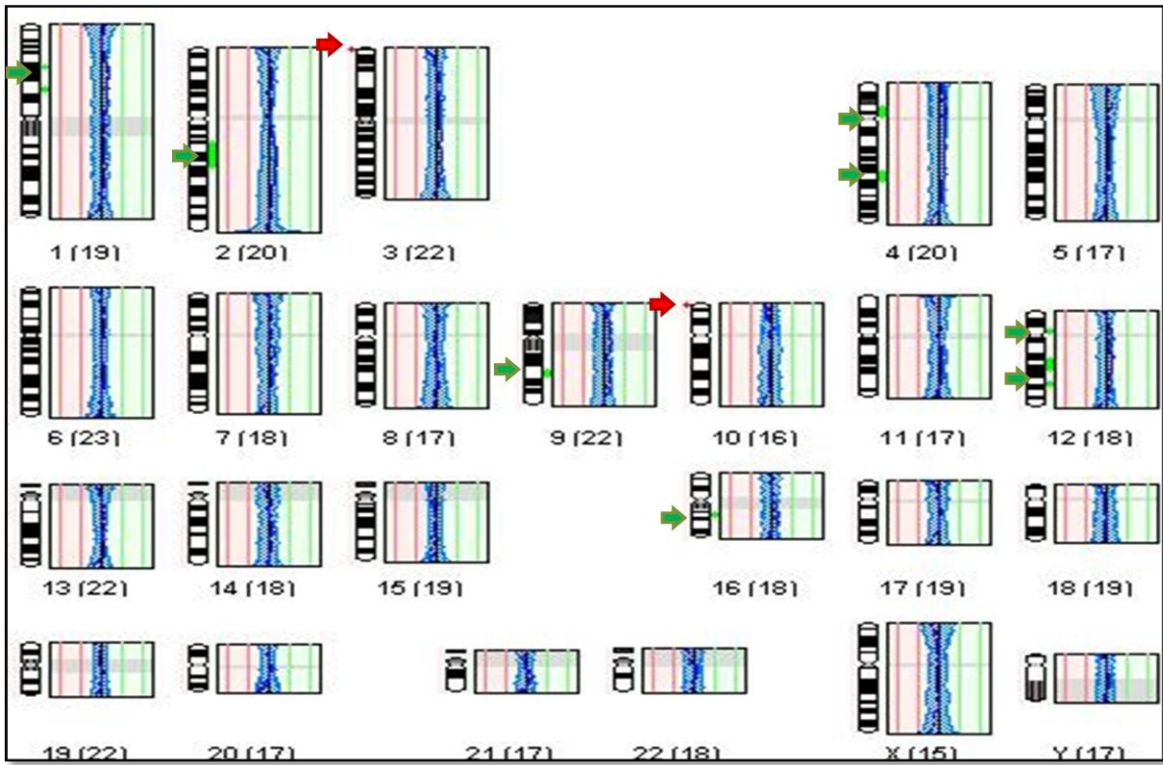


Figura 26. Alteraciones cromosómicas en Meduloblastoma 2 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

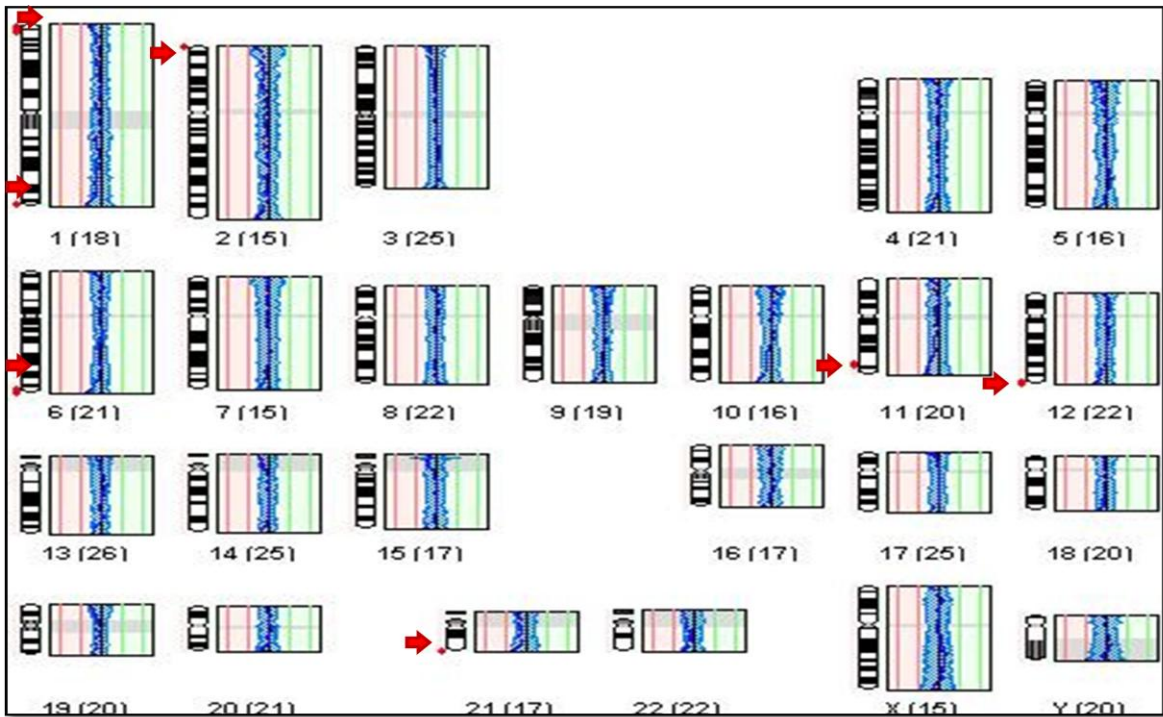


Figura 27. Alteraciones cromosómicas en Medulloblastoma 3 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

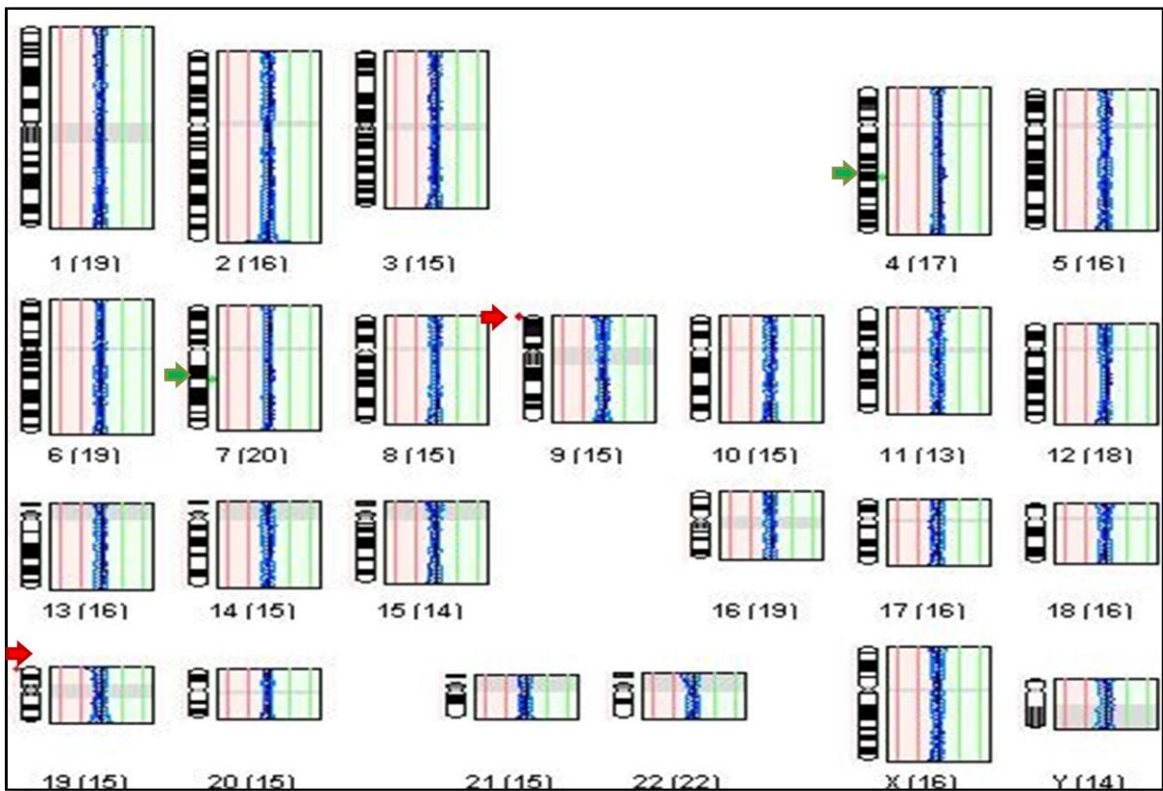


Figura 28. Alteraciones cromosómicas en Germinoma 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

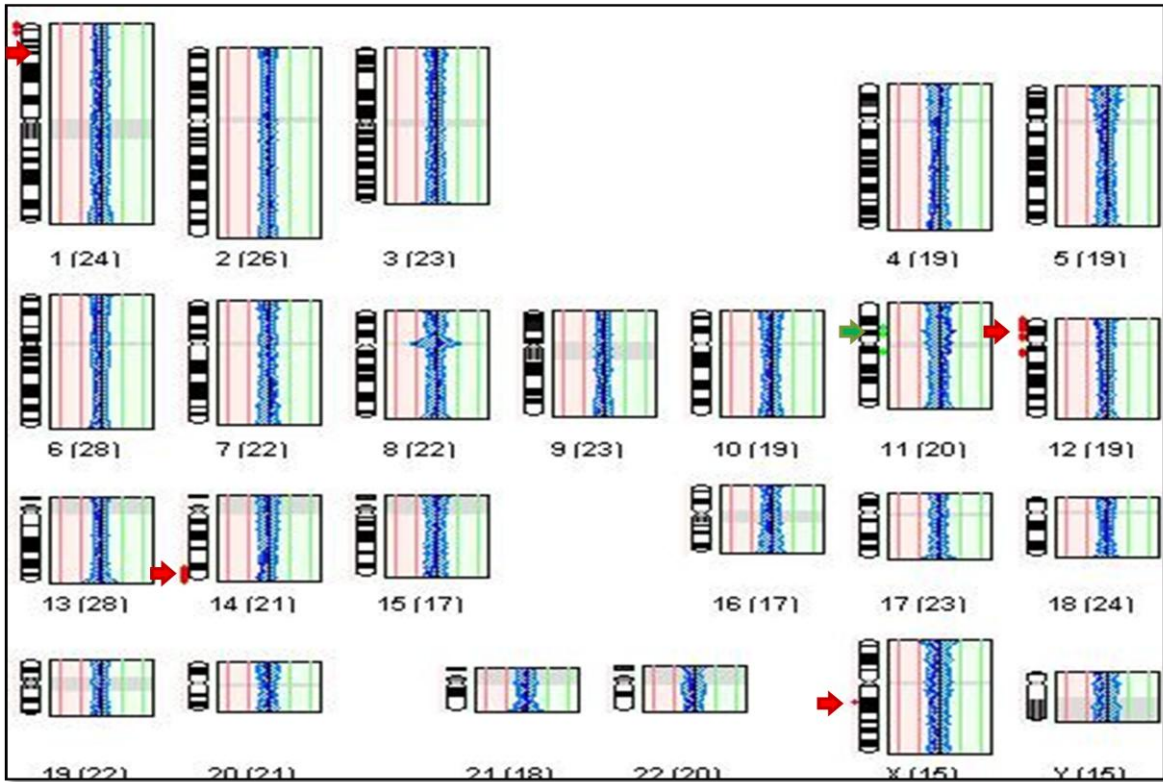


Figura 29. Alteraciones cromosómicas en Germinoma 2 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

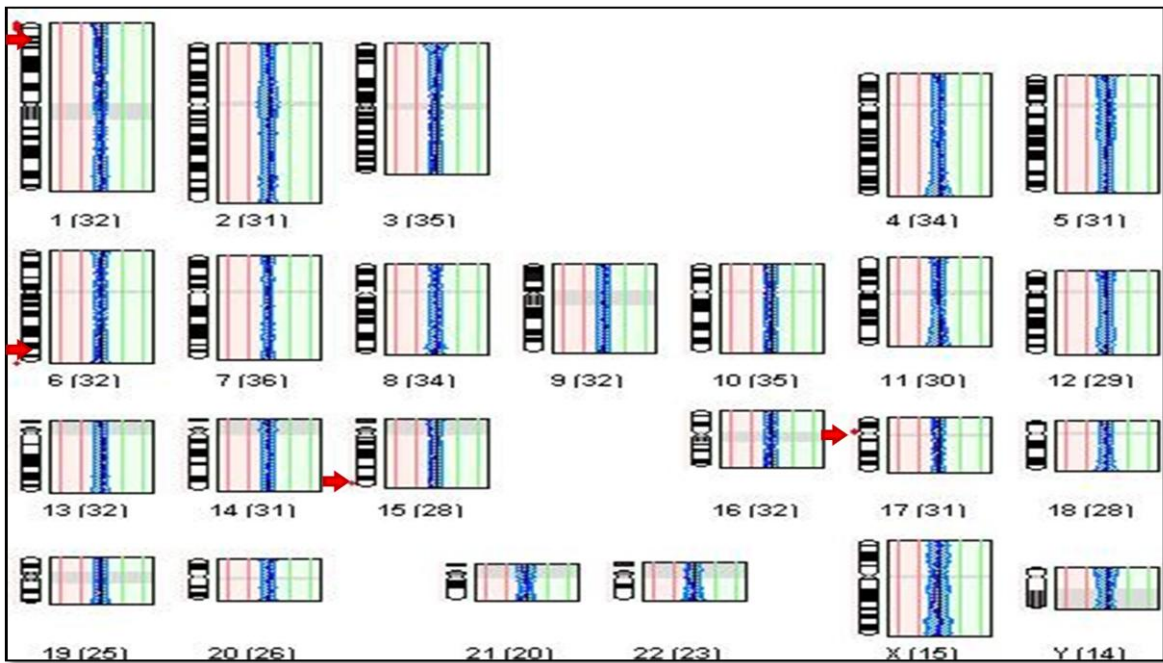


Figura 30. Alteraciones cromosómicas en Teratoma 1 (CGH). Se muestran las pérdidas (rojo) y ganancias (verde) cromosómicas.

7.3 Evaluación de funcionamiento enzimático para AIMS

Se comprobaron las condiciones y funcionamiento de las enzimas a utilizar durante el ensayo de AIMS, para asegurarse que las imágenes observadas durante el proceso fueran originadas mediante el ensayo (Figura 31).

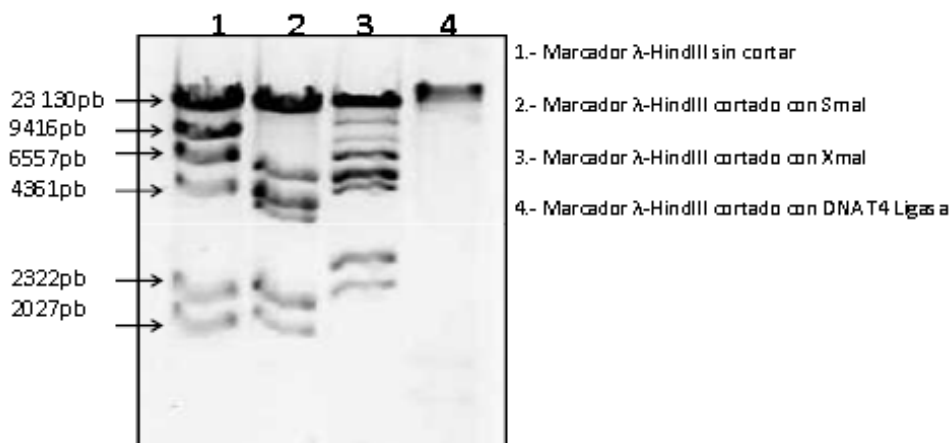


Figura 31. Control de funcionamiento de enzimas y DNA ligasa.- Se muestra la actividad de las enzimas: SmaI, XmaI y DNA T4 ligasa utilizando el DNA del fago λ cortado con HindIII

7.4 Amplificación de Sitios Intermetilados

Se elaboró la técnica de AIMS de acuerdo al protocolo propuesto por Frigola et al. (2002), a partir de 1 μ g de DNA, el cual fue cortado enzimáticamente, ligado con DNA T4 Ligasa y fue hecha la PCR a partir de la cual se obtuvieron las sondas para el marcaje (Figura 32).

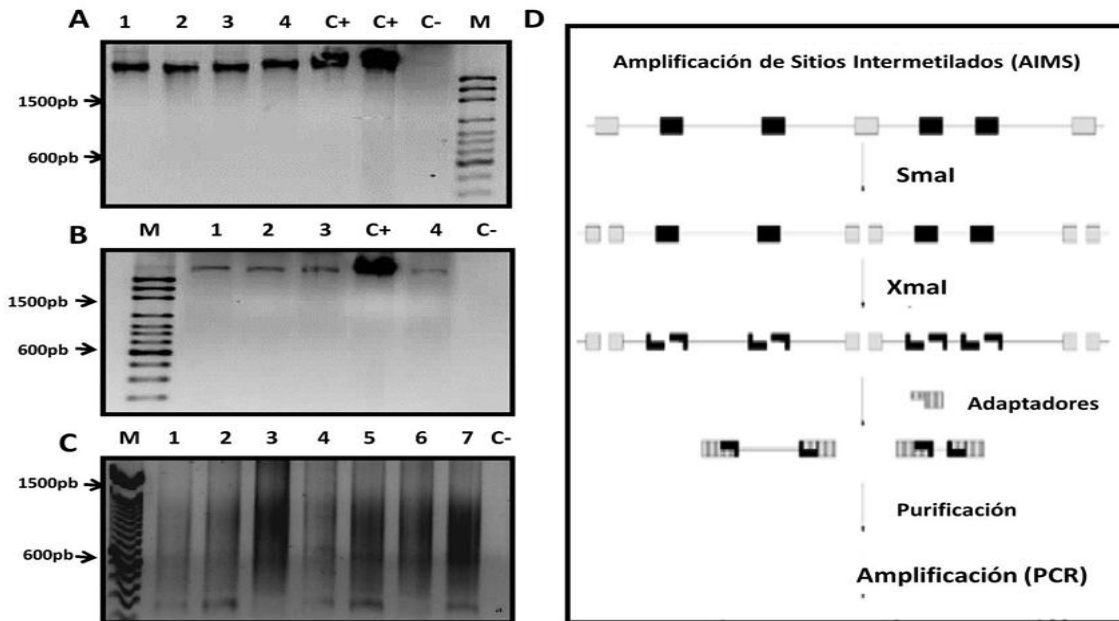


Figura 32. Amplificación de Sitios Intermetilados. Se muestra el proceso para la generación de sondas para el análisis de patrones de metilación. **A)** Restricción enzimática, **B)** Ligación, **C)** PCR, **D)** Esquema de proceso del ensayo. 1-7. Muestras, C+. Control positivo, C-. Control negativo.

Se realizó el marcaje de sondas con “*Random Primer*” (Figura 33), se escogieron las muestras que cumplían con el tamaño de las bandas óptimas para el ensayo de CGH de 200 a 2000 pb.

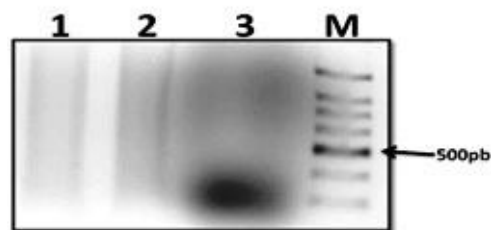


Figura 33. Sondas marcadas con “*Random Primer*”. Se muestra el barrido de sondas a utilizar en el AIMS-CGH, esperándose de 200 a 2000pb.

La realización del CGH permitió analizar del patrón de metilación en cada uno de los tumores (Figura 34 - 45)

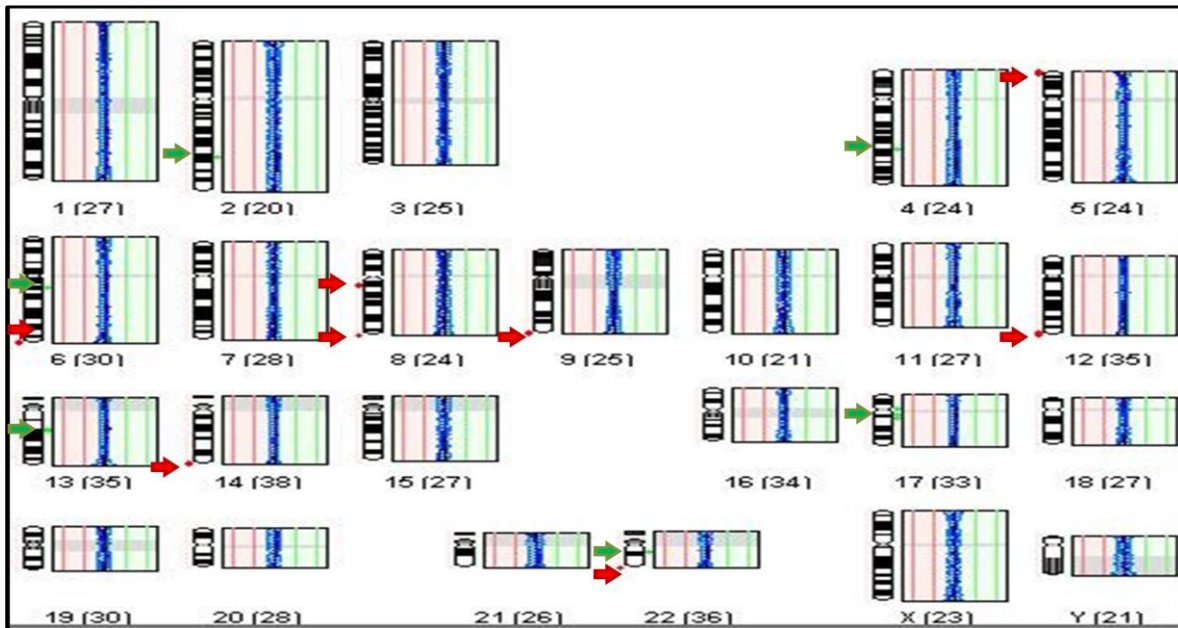


Figura 34. Patrón de metilación de Ependimoma 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

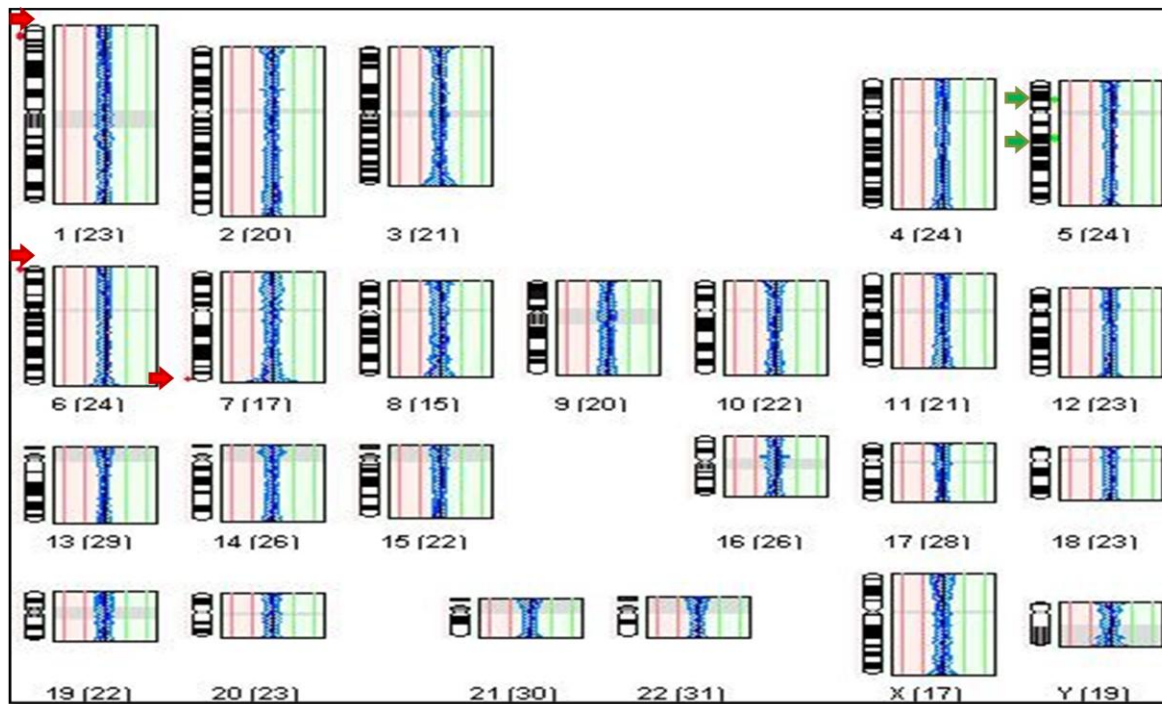


Figura 35. Patrón de metilación de Ependimoma 2 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

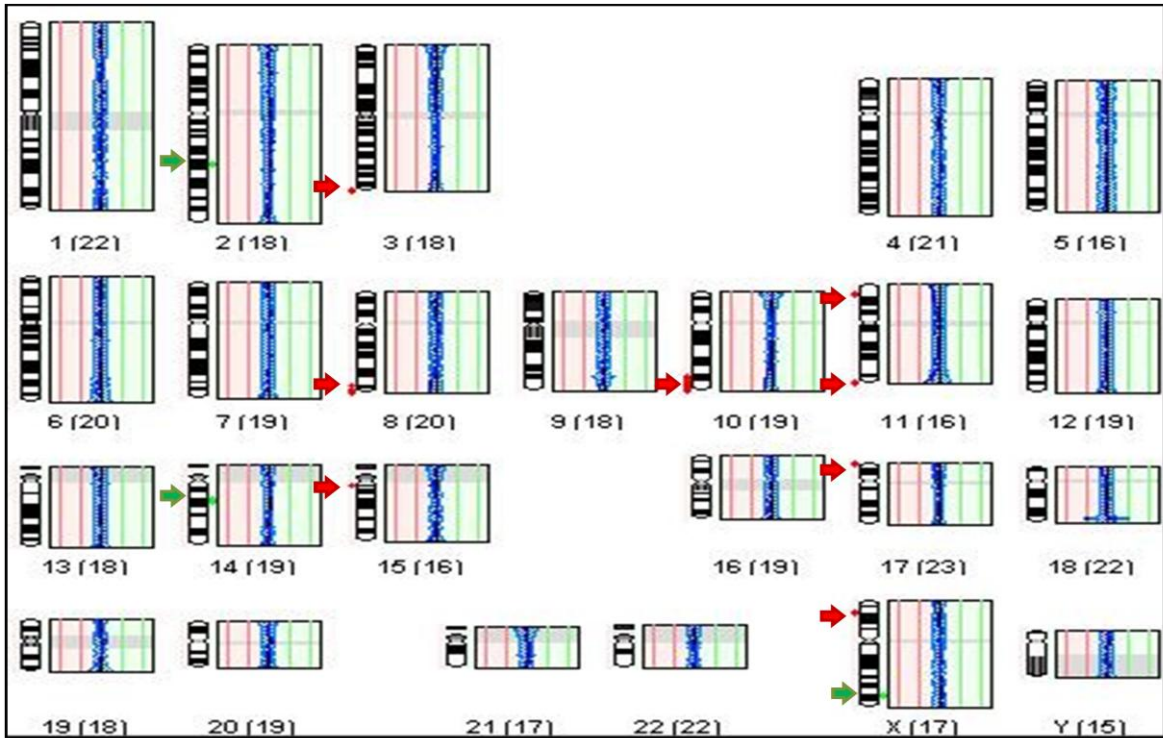


Figura 36. Patrón de metilación de Astrocitoma 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

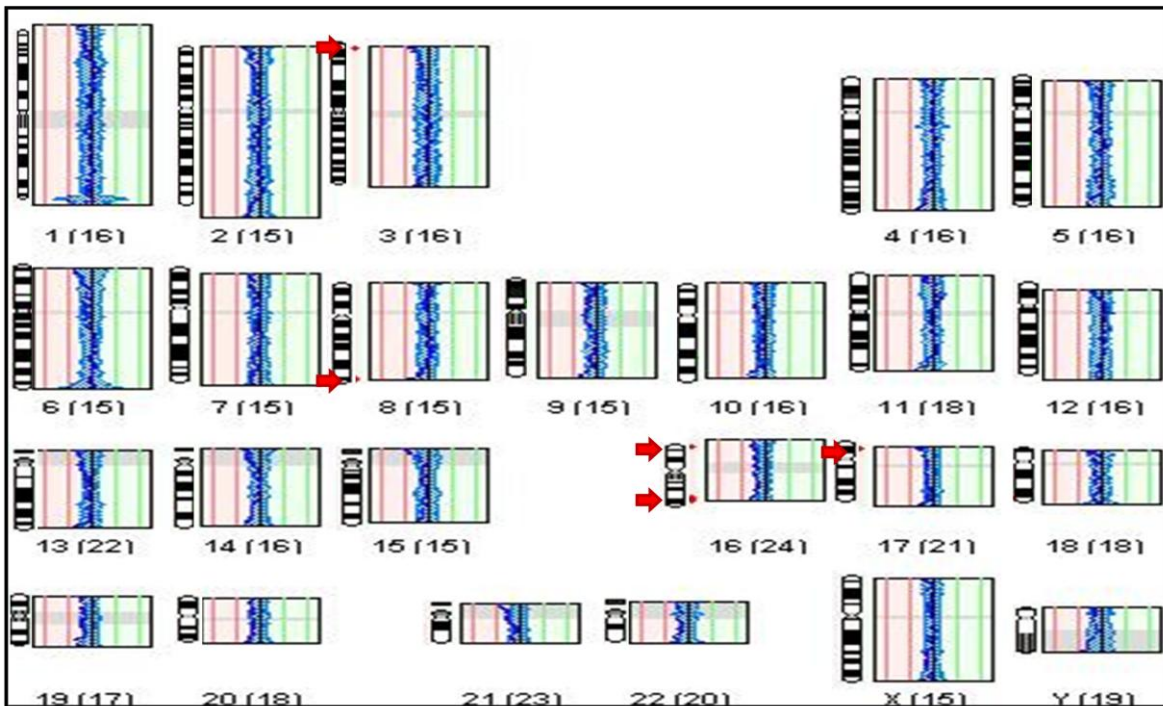


Figura 37. Patrón de metilación de Astrocitoma 2 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

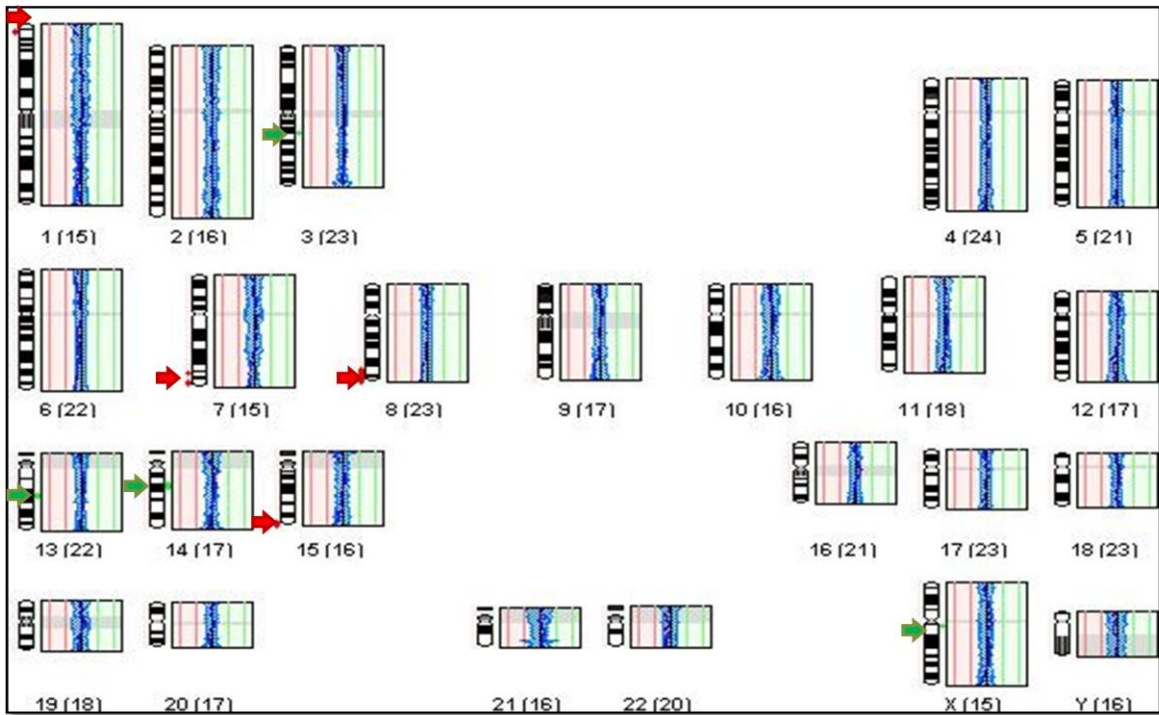


Figura 38. Patrón de metilación de Oligodendroglioma 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

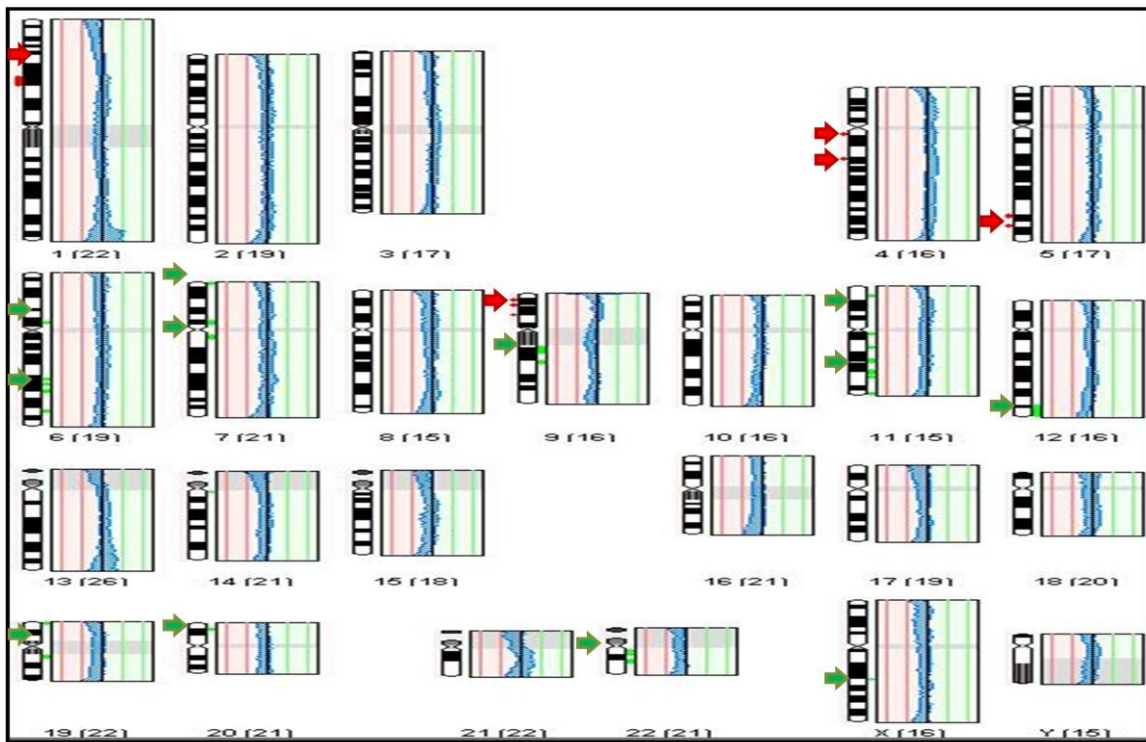


Figura 39. Patrón de metilación de Glioblastoma Multiforme 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

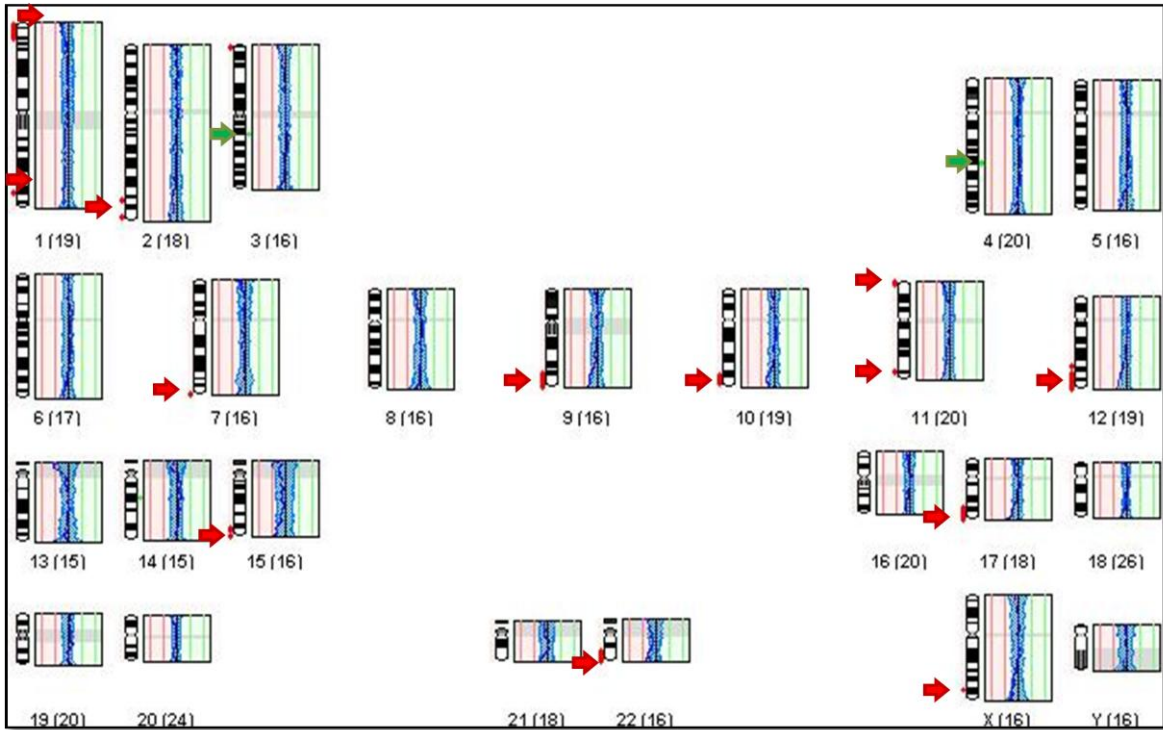


Figura 40. Patrón de metilación de Medulloblastoma 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

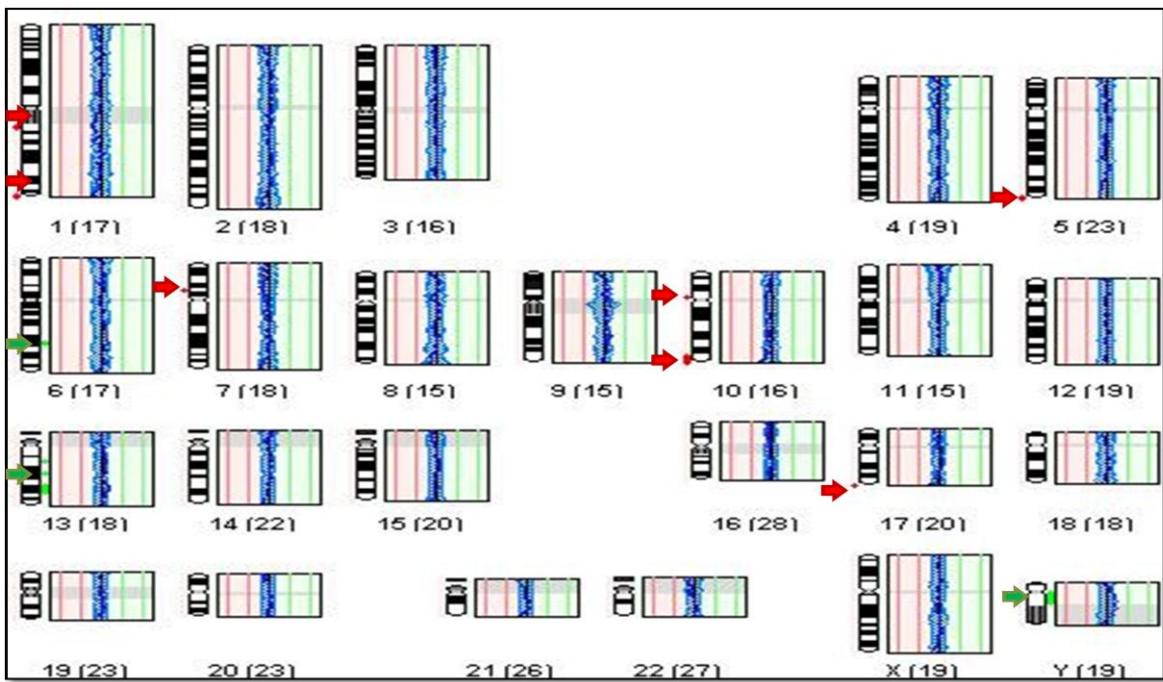


Figura 41. Patrón de metilación de Medulloblastoma 2 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

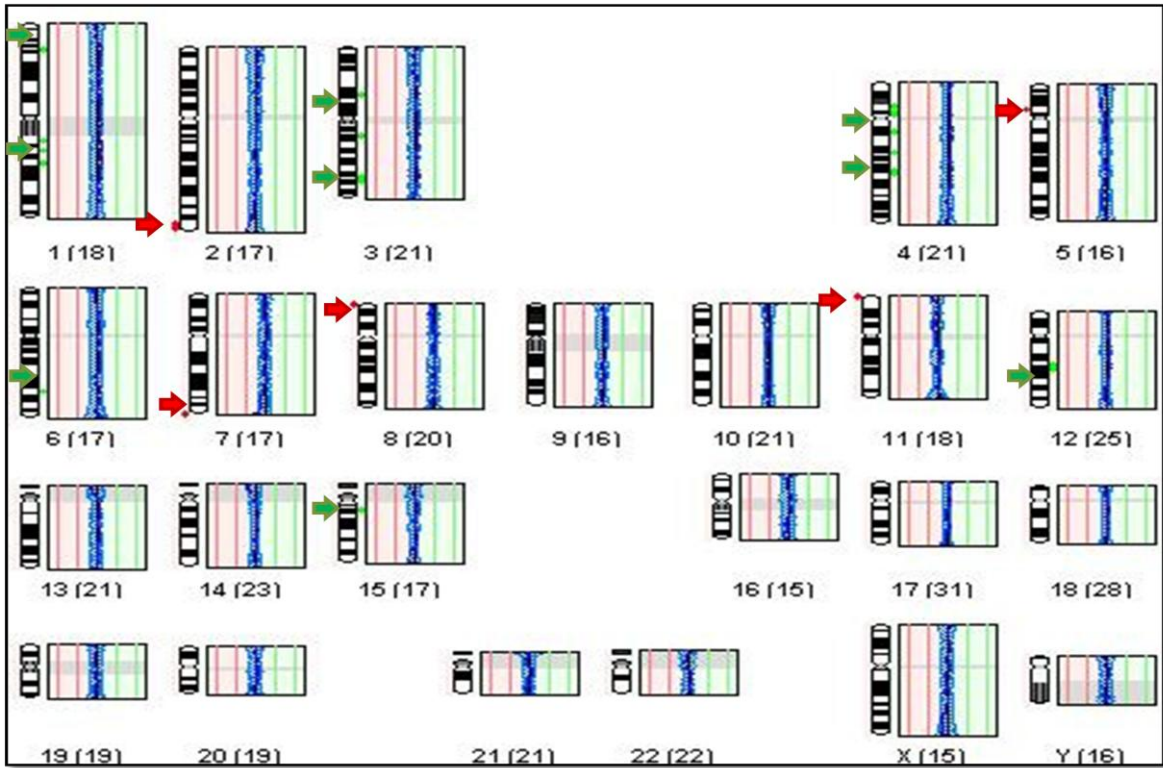


Figura 42. Patrón de metilación de Meduloblastoma 3 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

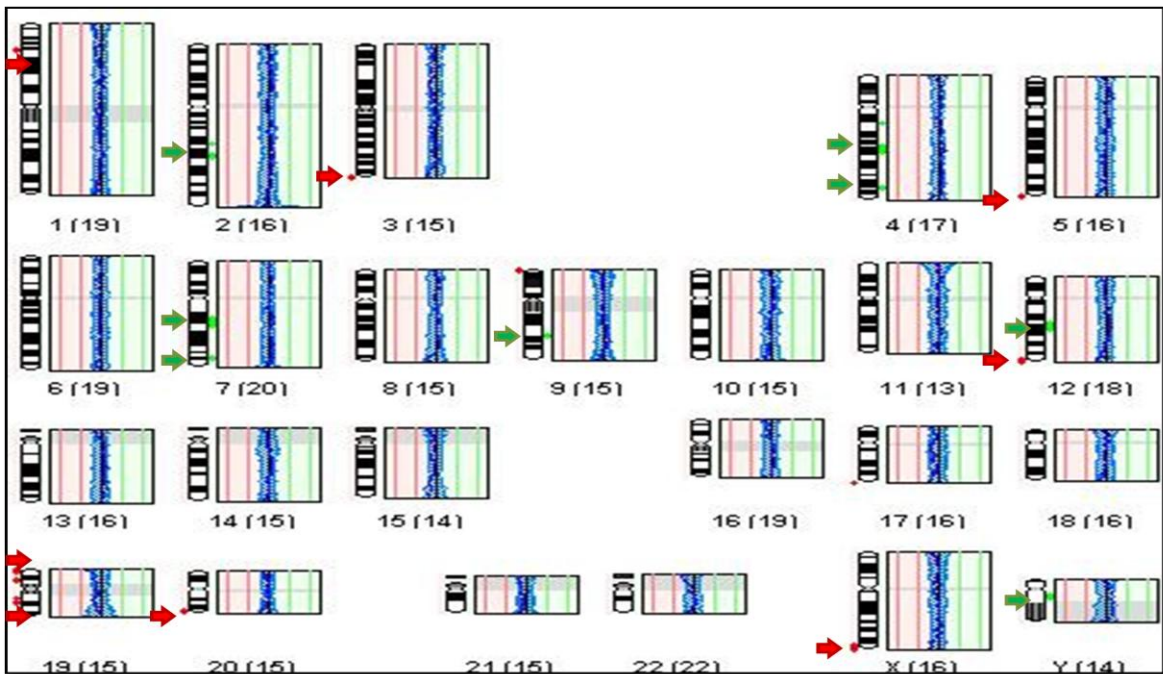


Figura 43. Patrón de metilación de Germinoma 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

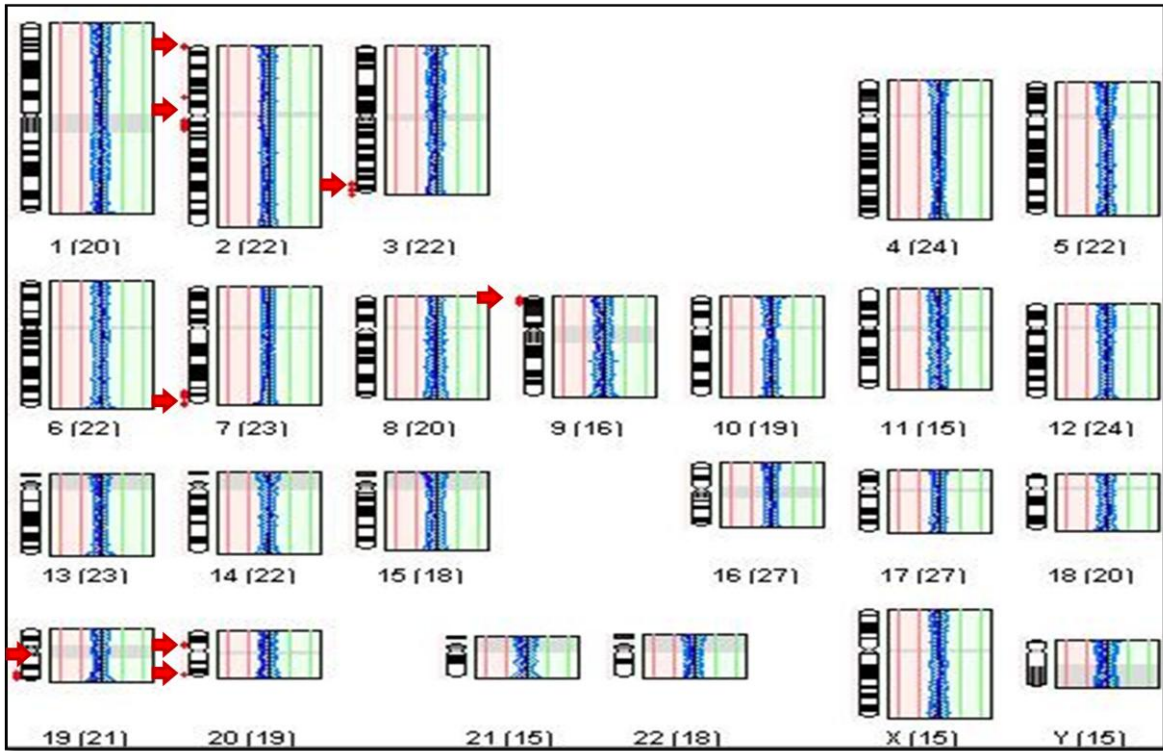


Figura 44. Patrón de metilación de Germinoma 2 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

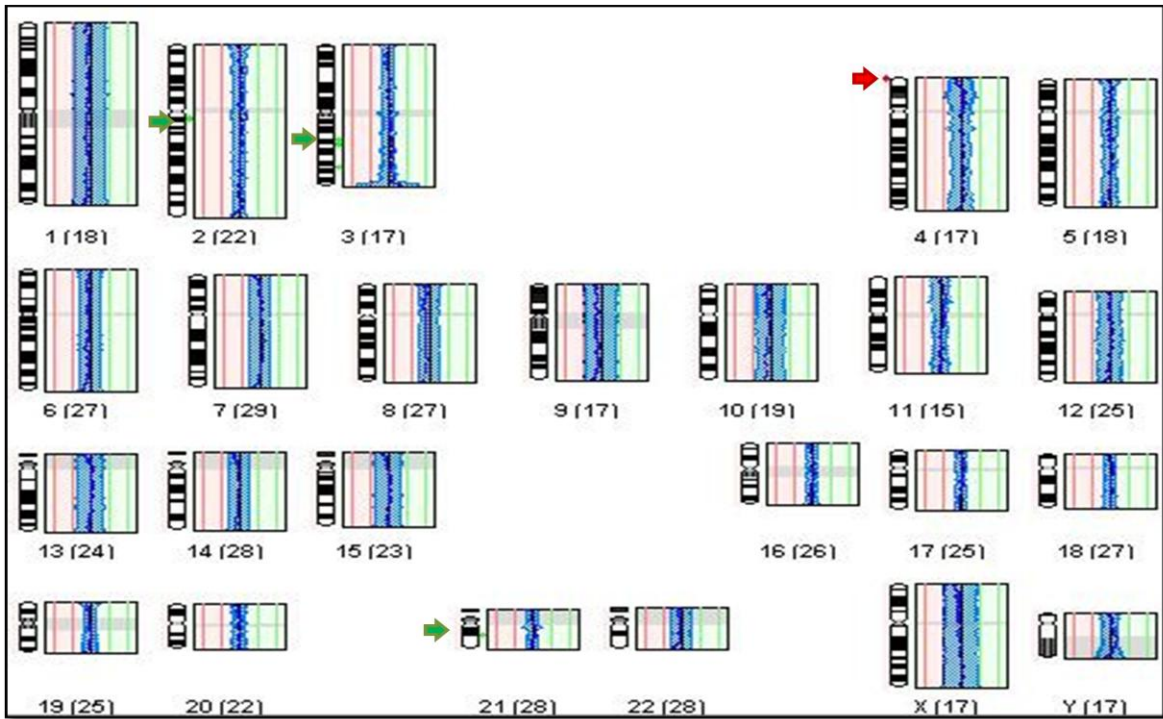


Figura 44. Patrón de metilación de Teratoma 1 (AIMS-CGH). Se muestra las regiones hipermetiladas (verde) y las regiones hipometiladas (Rojo).

7.5 Comparación entre patrón de metilación y alteraciones cromosómicas

Se analizó cada uno de los tumores tanto por CGH y AIMS-CGH (Tabla 2).

Tabla 2. Patrón de metilación y alteraciones cromosómicas.

Tumor	Ganancias	Pérdidas	Hipermetilación	Hipometilación
EP 1	2p22, 2q13, 2q34, 2q37, 4q13, 4q21, 4q24, 4q26, 4q34, 4q36, 5q21, 6q23, 6q21-16, 7q11.2, 9q34, 11q23, 18p11.2, Xp11.2	3p26, 7p22, 13q14, 22q13	2q32, 4q27, 6q14, 13q21, 17q12-11.2, 17p11.2, 22q11.2	5p15.3, 6q27, 8q12, 8q24.3, 9q34, 12q24.3, 14q32, 22q13
EP 2	14q24	2q23, 9q34, 17q25, 19p13.3, 20p13	5p14, 5q14	1p36.1, 6p25, 7q36
AST 1	4q21, 13q21	1p36.1, 2q37, 3q27-29, 4q35, 7q36, 8q24.3, 15q25-26, 17p13, 17q25, 19p13.3-13.2, 19q13.4, 22q13	2q24, 14q21, Xq27	3p28, 8q24, 10q25-26, 11p15, 11q25, 15q12, 17p13, Xp22.1
AST 2	2p12, 2q14.1, 3p14, 3p12, 4q24, 5q21, 5q23-31, 6p21.1, 6q22, 9p13, 10q23, 11p22, 14q13, 14q21-23	18q23, 19p13.3		5p26, 8q24, 16p13.2, 16q24, 17p13
OLI 1	4q32-34, 7q21-22, 13q21, 14q22	3p25, 15q23, 18q24, 17q25, 22q13	13q21, 14q21, 3q13.3, Xq12	1p36.1, 7q33, 7q36, 8q24.1-24.3, 15q26
GBM 1	2p12, 2q11.2, 3q13.5, 3q21	5q35	5q14, 5q23, 6q22, 7q11.2, 7q21	1p35-36, 3q29, 5q35, 17p13
MED 1	1p13, 5q12, 5q14-23, 5q33, 7q11.2, 8p12, 8q22, 12q13, 14q13-21, 14q32, Yq11.2		3q13.3, 4q27, 14q21	1p36.3, 1q41, 2q35, 2q37, 9q33-34, 10q26, 11p15, 11q24, 12q22-24.3, 15q26, 17q24-25, 22q13
MED 2	1p31, 1p22, 2q14.3-24, 4p14-13, 4q26, 9q22, 12p11.2, 12q14, 12q21, 12q22, 16q13	3p26, 10p15	6q22, Yq11.2	1q21, 1q44, 5q35, 7p13, 10p11.2, 10q26, 17q25
MED 3		1p36.3-36.2, 1q44, 2p25, 6q27, 11q23, 12q24.3, 21q22	1p34.1, 1q21, 1q22, 1q25, 3p14, 3q13.3, 3q26.2, 4p14, 4p13, 4q22, 4q26, 6q23, 12q15, 15q13	2q37, 5p14, 7q36, 8p23, 11p15
GER 1	4q26, 7q22	9p24, 19p13.3	2q24, 2q22, 4q33, 4q24, 4q21, 7q35, 7q21, 9q31, 12q21, Yq11.2	1p32, 3q29, 5q35, 9p24, 12q24.3, 17q25, 19p13.3, 19p13.1, 19q13.1, 19q13.2, 20q13.3, Xq28
GER 2	11q12, 11p11.2, 11p13	1p36.3-36.2, 12p13, 12p12, 12q12, 14q32, Xq21		2p25, 2p13, 2q11.2, 2q12, 3q27, 3q29, 7q35, 7q36, 9p24-23, 19q13.3-14, 20p11.2, 20q13.3
TER 3		1p36.3-36.2, 6q27, 5q26, 17p16.2	2q12, 3q26.3, 3q23, 3q21, 21q21	4p16

Se muestran las regiones alteradas encontradas en cada uno de los tumores analizados. Ependimoma (EP), Astrocitoma (AST), Oligodendroglioma (OLG), Glioblastoma multiforme (GBM), Meduloblastoma (MED), Germinoma (GER), Teratoma (TER).

Posteriormente, se llevó a cabo el análisis de relación existente entre las alteraciones cromosómicas y el patrón de metilación, así como las regiones que se comparten intra-tumores (Tabla 3).

Tabla 3. Regiones compartidas entre diferentes tumores.

Astrocitoma:	Geminales
Pérdida:	Pérdidas
19p13.3 (2/2)	1p36.6-36.2 (2/3)
Hipometilación	Hipometilación
8q24 (2/2)	3q29 (2/3)
17p13 (2/2)	20q13.3 (2/3)
Meduloblastoma	
Hipermetilación	
3q13.3 (2/3)	
Hipometilación	
2q37 (2/3)	
10q26 (2/3)	
11p15 (2/3)	
17q25 (2/3)	

Además se identificaron las regiones ganadas, perdidas, hipermetiladas e hipometiladas compartidas entre los diferentes tumores analizados (Tablas 4 – 7).

Tabla 4. Regiones ganadas compartidas entre diferentes tumores.

Región Ganada	Tumores
4q34	Ependimoma, oligodendroglioma
5q21	Ependimoma, astrocitoma, meduloblastoma
7q11.2	Ependimoma, meduloblastoma
14q13 y 14 q21	Astrocitoma, meduloblastoma
2p12	Oligodendroglioma y Glioblastoma Multiforme

Tabla 5. Regiones perdidas que se comparten entre diferentes tumores.

Región Pérdida	Tumores
3p26	Ependimoma, meduloblastoma
22q13	Ependimoma, Oligodendroglioma, Astrocitoma
19p13.3	Ependimoma, Astrocitoma, Germinoma
17q25	Ependimoma, Astrocitoma, Oligodendroglioma
1p36.3-p36.2	Meduloblastoma, Germinoma, Teratoma
6q27	Meduloblastoma, Teratoma

Tabla 6. Regiones hipermetiladas compartidas entre diferentes tumores.

Región Hipermetilada	Tumores
4q27	Ependimoma, Meduloblastoma
13q21	Ependimoma, Oligodendroglioma
5q14	Ependimoma, Glioblastoma
2q24	Astrocitoma, Germinoma
14q21	Astrocitoma, Oligodendroglioma
3q13.3	Oligodendroglioma, Meduloblastoma
3q26.2	Teratoma, Meduloblastoma

Tabla 7. Regiones hipometiladas compartidas entre diferentes tumores.

Región Hipometilada	Tumores
8q24.3	Ependimoma, Astrocitoma, Oligodendroglioma
9q34-33 y 22q13	Ependimoma, Meduloblastoma
12q24.3	Ependimoma, Meduloblastoma, Germinoma
1p36.1-35	Ependimoma, Oligodendroglioma, Glioblastoma, Meduloblastoma
7q36	Ependimoma, Oligodendroglioma, Germinoma
11p15	Astrocitoma, Meduloblastoma
17p13	Astrocitoma (2), Glioblastoma
3q29	Glioblastoma, Germinoma (2)
5q35	Glioblastoma, Meduloblastoma, Germinoma
17q24-25	Meduloblastoma (2), Germinoma

El número entre paréntesis indica cuántos tumores del mismo tipo comparten la misma región.

Se buscó si existen coincidencias y/o diferencias entre las alteraciones cromosómicas observadas en el presente estudio con respecto a la literatura así como con el patrón de metilación que actualmente no ha sido reportado en regiones cromosómicas (Tabla 8).

Tabla 8. Regiones reportadas en la literatura y regiones encontradas en el estudio.

TUMOR	REPORTADO		ENCONTRADO EN ESTUDIO			
	GANANCIA	PÉRDIDA	GANANCIA	PÉRDIDA	HIPERMETILACIÓN	HIPOMETILACIÓN
EPENDIMOMA	9q 12	6q 14q 22q	9q34 6q23 6q21-q16 14q	22q13	6q14	12q24.3 6q27 14q32
ASTROCITOMA/GBM	7q36 9p12/p13	1p 19q 10	9p13	1p36.1 19q13.4 7q36		1p35-p36 10q25-q26
OLIGODENDROGLIOMA		1p 22q13.4		22q13		1p36.1
MEDULOBLASTOMA	1q 3q 17q	6 9q22.3 8p 10q 16q	9q22.3 8p12 16q13 8q24	6q27	6q22 6q23 3q13.3	8p25 10q26 17q24-q25 1q41
GERMINALES	2p 12p	9q 11q	11q12	12p12 12q13	9q31	2p25

A partir de las regiones con alteraciones cromosómicas y con patrón de metilación modificado se realizó el análisis bioinformático de genes (Tabla 9) y miRNAs (Tablas 10 y 11), poniendo especial interés sobre los relacionados a cáncer.

Tabla 9. Genes localizados en regiones cromosómicas modificadas.

REGIÓN	GENES
19q13.3	BSG, ELANE, TCF3, C3, ICAM1, CALR, PAK3, LRG1, CD70, PSPN
8q24	ENPDZ, TAF2, DSCC1, TAF2, CASC8, MYC, TMEM75, ZFAT, BAI1, WISP1
17p13	GEMIN4, SERPNF2, HIC1, GSG2, CXCL16, TRPN3, CLDN7, TP53, GAS7, CD86
3q13.3	DRD3, TIGIT, GAP43, CD80, LSAMP, IGSF11, ARHGAP31, ILDR1, CD86
2q24	TANK, DPP4, SCN2A, SCN3A, IF1H1, SCN9A, ITGB6, G6PC2, PSMD14, GRB14
11p15	CD151, TOLL1P, NP98, TAF10, ST5, NR1P3, SWAP10, RRAS2, E2F2
17q25	SDK2, CD300, RAB37, GPRC5C, H3F3B, TEN1, CDK3, RAC3, CD7
1p36.3-p36.2	ERRF1, TNFRSF4, DVL1, DFFA, MAD2L2, CASP9, CHD5, TNFRSF1B, ASAP1, ENO1
3q29	CPN2, LRRC15, GP5, ATP13A3, FGF12, HRASLCS, TFRC, TNK2, RNF168, DLG1
20q13.3	RAB22A, GNAS, ADCDDK, TUBB1, SXCP2, CDH26, CDH4, TAF4, GATA5, DIDO1
4q34	SAP30, SGRG1, WDR17, VEGFC, CASP3, IRF2, CEP44, HPGD, GLRA3, FBXO8
5q21	RPS9P3, SLCO4C1, RAB9BP1, EFNA5, FBYL17, WDR36, CAMK4, DJA2, FER
7q11.2	GABPAP, ZNF717, CRCP, TPST1, RABGEF1, TMEM298, NCF1B, BCL7B, CLDN3, LAT2
14q13	GERMIN2, MIA2, SAV1, BRMS1L, ILFLP2, NPAS3, EAPP, DPPA3P2, CTAGE5, RALGAPA1
2p12	HTRAS, GCFC2, CTNNA2, GGCX, CD8A, IGR, ZAP70, MGAT4A, IL1R1, TMEM182
3p26	ITPR1, OGG1, CNTN4, IL5RA, CRBN, EDEM1, CHL1
22q13	CAR10, H1FO, DDX17, DMC1, NPTNR, TDMM2, CBX6, TAB1, GRAP2, PPAR A
6q27	PRR18, MPC1, CCR6, DACT2, WDR24, PDCD2, TBP, PHF10, SMOC2, FGFR10P
4q27	PDE5A, NDNF, TNIP3, ANXA5, MAD2L1, CCNA2, TRPC3, TMEM155, ADAD1, QRFP, KIAA1109
13q21	NPM1P22, ZDHC20P4, KLHL1, ATXN805, SOGAZP1, CLN5, DX9P1
5q14	AP3B1, SCAMP1, JMY, MTX3, SERINC5, RASA1, MIR92, POLR3G, RAB5BP2, EDIL3
2q21	POL2D, AMMECR1L, RAB6C, CFC1, POTEJ, MGHT5, CCNT2, ACMSD, MAP3K19, TMEM163, ACMSD
14q21	LRFN5, FSCB, SKBP3, LRR1, POLE2, ARF6, LRR1, ARF6, GNG2, FKBP3
3q26.2	GOLIM4, MECOM, MYNN, PHC3, SLC7A14, SAMD7
9q34-q33	TNC, TLR4, C5, GSN, CDK9, TSC1, NOTCH1, TNFAF-2
12q24.3	CABP1, SPPL3, P2RX1, HP10, L31, DIABLO, TMED2, UBL, SACRB1, DHX37, RAN, MMP17
7q36	MNX1, NOM1, NOS3, SSPO, ZNF783, ATG9B, WDR60

Tabla 10. miRNAs localizados en regiones con alteraciones cromosómicas.

Tumor	Región	miRNA
Ependimoma	9q34	MIR126
	2q13	MIR4265, MIR4266, MIR4267, MIR4436B1, MIR4436B1, MIR4436B2, MIR4435-2, MIR4435-1HG, MIR1302-3
	6q23-q16	MIR2113, MIR548AI, MIR587
Meduloblastoma	8q22	MIR3151, MIR548A3
	6q27	MIR1913, MIR8939
	9q22.3	MIRLET7A1, MIRLET70HG, MIR23B, MIR27B, MIR24-1
Oligodendroglioma	22q13	MIR3909, MIR659, MIR4534, MIR4766, MIR1281, MIR33A, MIR1249, MIR4762, MIR3619, MIRLET7B, MIR3201, MIR4535, MIR3667
Astrocitoma /GBM	19p13.3	MIR27A, MIR23A
	19q13.4	MIR125A, MIR372, MIR373
Germinoma	12p12-p13	MIR200C, MIR3974, MIR920, MIR4302

Tabla 11. miRNAs localizados en regiones con patrón de metilación modificado.

Tumor	Región	miRNA
Ependimoma	12q24.3	MIR4419B, MIR3612
	6q27	MIR1913, MIR3939
	14q32	MIR370, MIR494, MIR376C, MIR1185-2, MIR134, MIR409, MIR203
Astrocitoma/GBM	10q25-q26	MIR4680, MIR5480, MIR548E, MIR4595, MIR4483, MIR4297, MIR3780, MIR202
Meduloblastoma	8p23	MIR3674, MIR596, MIR124-1, MIR1322
	17q24-q25	MIR634, MIR548D2, MIR548AA2, MIR4524A, MIR4524B, MIR657, MIR3065, MIR338
	1q41	MIR215, MIR194-1

La Tabla 12 muestra los miRNAs encontrados las regiones con alteraciones cromosómicas compartidas entre-tumores.

Tabla 12. miRNAs localizados en regiones compartidas entre-tumores con modificación de patrón de metilación y alteraciones cromosómicas.

Tumores	Región	Modificación	miRNAs
EP/AST/OLI	8q24	Hipometilación	MIR3610, MIR548D1, MIR1206, MIR1207, MIR1204, MIR1205, MIR1208, MIR3686, MI5194, MIR30B, MIR1302-7, MIR4472-1
AST/GBM	17p13	Hipometilación	MIR132, MIR212
AST/MED	11p15	Hipometilación	MIR210, MIR4486, MIR4694
EP/OLI/GBM/MED/GER	1p36.1-p36.3	Pérdida y/o Hipometilación	MIR200B, MIR200A, MIR34A

Para identificar las vías de regulación en las que se encuentra implicados estos miRNAs (Anexo III) se seleccionaron los miRNAs involucrados en varios tipos de cáncer (Tabla 13) y a partir de estas vías se seleccionaron algunos genes involucrados en algún tipo de cáncer (Anexo IV), ya que dentro del análisis bioinformático se observó que no todos los genes blanco de los miRNAs juegan un papel primordial durante la regulación.

Tabla 13. miRNAs reportado en cáncer.

MIR126	MIR494	MIR194-1
MIR3151	MIR376C	MIR5194
MIRLET7B	MIR1185-2	MIR30B
MIR27A	MIR134	MIR30D
MIR23A	MIR409	MIR132
MIR200C	MIR203	MIR149
MIR3974	MIR202	
MIR920	MIR124-1	
MIR125A	MIR1322	
MIRLET7A1	MIR3065	
MIR23B	MIR338	
MIR24-1	MIR215	

Posteriormente se seleccionó la región 1p36.1-p36.3 como la más frecuentemente alterada, así como el patrón de metilación modificado. En esta región se localizan genes involucrados con muerte celular programada, desarrollo cerebral, procesos oncogénicos relacionados a metástasis y algunos supresores de tumores; igualmente se encuentran miRNAs reportados como supresores en otros tipos de neoplasias (Tabla 14).

Tabla 14. Genes y miRNAs involucrados en procesos oncogénicos localizados en la región 1p36.3-p36.1

GENES	miRNAs
TNFRS18	MI200B
TNFRS4	MIR429
TNFRSF25	MIR34A
MMP23B	
HES5	
TP53	
AJAP1	

Además, la pérdida en el cromosoma 22q13 fue observada en los tumores gliales de bajo grado (ependimoma, astrocitoma, oligodendroglioma), dónde se localizan genes que participan en la regulación del ciclo celular (*MCM5*), regulación del crecimiento y división celular (*EP300*, *PDGFB*), factores de transcripción (*POLR2F*, *ATF4*), involucrados en procesos oncogénicos (*WNT7B*); así como miRNAs encontrados en neoplasias (*MIRLET7A3*, *MIRLET7B*).

8. Discusión

Las muestras para la realización de este estudio se colectaron en un periodo de marzo de 2012 a junio de 2013, se capturaron un total de 12 tumores de SNC localizados en fosa posterior, se propuso el presente estudio debido a que actualmente no se tiene en la literatura reportada suficiente información sobre las regiones compartidas que se encuentran alteradas en tumores de SNC por su localización. De acuerdo a lo informado previamente existen cambios genéticos y epigenéticos en las neoplasias de origen glial, así como otros tumores cerebrales, de ahí que se consideró importante realizar un escrutinio general de los TSNC ubicados en fosa posterior pero con diferente origen. De esta forma se tendrá un panorama de las regiones cromosómicas modificadas y del patrón de metilación con especial interés en las regiones compartidas intra y entre tumores, además se analizaron los miRNAs que se encuentran en estas regiones que pueden tener un papel importante durante el desarrollo y proliferación tumoral, por lo que se realizaron las técnicas de CGH y AIMS-CGH.

Se ha informado que las alteraciones genéticas no se localizan al azar, sino cada una relacionada con la tumorigénesis. En el caso de los TSNC, especialmente en astrocitoma grado II, muestran alteraciones en los cromosomas 1, 5, 7, 8, 9, 13, 19 y 20 (Sevilhan *et al.*, 2007), en comparación con lo encontrado en el presente trabajo que fue encontrada en los cromosomas 1, 5, 8, 9 y 22, este último característico de los endimomas.

En los gliomas, los cambios genéticos incluyen amplificación y/o delección de oncogenes, pérdida de los genes supresores de tumores y genes de reparación de DNA, debido probablemente a mecanismos epigenéticos como la hipermetilación (Nord *et al.*, 2009). Dentro de los gliomas, el tumor más estudiado es el GBM en los que se ha publicado un largo número de alteraciones genéticas, epigenéticas y transcripcionales, conduciendo a un complejo genoma oncogénico de supervivencia, donde se observan principalmente genes con funciones relacionadas con el sistema inmune y regulación del ciclo celular teniendo efecto en la tumorigénesis, progresión, respuesta inflamatoria, inducción de la apoptosis

y angiogénesis (Sintupisut *et al.*, 2013). En las regiones alteradas se encontraron genes que participan en la regulación del sistema inmune, regulación del ciclo celular y factores de transcripción; se observa que los genes del sistema inmune son los más afectados lo que sugiere un rol importante dentro de la formación de los TSNC; igualmente se han visto algunas vías afectadas como: RAS, TP53, PIK3, las cuales controlan el ciclo celular, proponiéndose que las aberraciones representan sólo una fracción de los cambios genéticos involucrados en la gliomagénesis e igualmente pueden tener un efecto sumatorio y posiblemente compensatorio con el patrón de metilación característico del tumor estudiado; dentro de los estudios realizados con los GBM se han involucrado a los astrocitomas por considerarse como la primera etapa de desarrollo de los GBM, estos tumores presentan mutaciones o deleciones en CDKN2, TP53, EGFR, IDH1 (Vaitkiené *et al.*, 2013).

Otros tumores gliales son los oligodendrogliomas pediátricos en los que es común observar la pérdida de 1p, 19q (Nord *et al.*, 2009) y ganancias en los cromosomas 7q, 8q y 20q (Sevilhan *et al.*, 2007). En comparación con el presente trabajo donde se encontró la ganancia en el cromosoma 7q, aunque cabe destacar que se analizó solamente una muestra para este tumor.

Para el meduloblastoma se ha demostrado como característica principal el isocromosoma 17q, presentando una deleción del brazo corto y una amplificación compensatoria en el brazo largo, además de la amplificación de los miembros de la familia MYC asociados a un peor pronóstico (Kool *et al.*, 2008). En las muestras estudiadas el cromosoma 17 no mostró alguna alteración cromosómica pero se observó alterado el patrón de metilación en la región 17q25 y 17q24 con respecto al testigo.

Por otra parte, se sabe que las alteraciones epigenéticas juegan un papel importante en la tumorigénesis, donde se involucran procesos celulares incluyendo el ciclo celular, diferenciación, transcripción y motilidad. El estatus de la metilación de los genes ha demostrado ser de gran importancia durante el desarrollo tumoral en contexto con los patrones de metilación del tejido específico (Lindsey *et al.*, 2007), por lo que fue importante estudiar el patrón de metilación de

los TSNC permitiendo observar cambios importantes, diferentes a las regiones pérdidas o ganadas permitiendo visualizar a los procesos genéticos y epigenéticos como un efecto sumatorio entre las dos alteraciones. Además se considera a la metilación como un mecanismo importante de la inactivación epigenética y factor primordial para los tumores de SNC ubicados en fosa posterior. Se sabe que la metilación aberrante participa en la patogénesis y progresión de las neoplasias, siendo la metilación diferente en todos los tumores hasta ahora estudiados, lo que sugiere que cada neoplasia tiene un perfil de metilación distinto, existen diferencias para cada individuo como resultado de la presión selectiva o reflejan la pérdida de protección de las islas CpG contra la metilación del DNA (Ebinger *et al.*, 2004); al ser la metilación distinta para cada individuo se puede esperar que cada muestra estudiada tenga diferencias en este patrón de metilación.

En el presente trabajo se encontraron regiones modificadas dentro del patrón de metilación semejante a lo informado lo que puede sugerir un efecto sumatorio entre las dos alteraciones o bien colocar a los factores epigenéticos como primordiales dentro del desarrollo de neoplasias.

También encontramos resultados de regiones duplicadas y/o deletadas de los tumores similar a lo informado, por ejemplo alteración en 9q34 y 2q13 en ependimomas, 9p13, 1q36.1, 19q13.4 en astrocitomas y GBM, 8q22 y 6q27 en meduloblastoma, 22q13 en oligodendroglioma. Por otra parte se observaron regiones modificadas, no antes informadas como 12q12, 12p13, y 11q13 en germinales, 6q23, 6q21.16 y 14q24 en ependimoma, 9q22.3, 8p12 y 16q13 en meduloblastoma; además de otras regiones que no se consideran características de los tumores.

Así mismo, regiones que han sido reportadas como alteraciones cromosómicas, en el presente estudio se encontraron alteradas en el patrón de metilación siendo en el ependimoma el cromosoma 22q una pérdida característica de este tumor, la cual fue observada como hipometilada en la región 22q13; además es importante mencionar que el cromosoma 17q perdido y/o ganado es característico para el meduloblastoma, en el presente estudio se encontró como hipometilado en la región 17q25; por otra parte los oligodendrogliomas se caracterizan por tener

pérdidas en el cromosoma 1p, nosotros encontramos la región 1p36.1 como hipometilada.

Con respecto a los miRNAs encontramos a MIR1322 y MIR338 que han sido publicados en neuroblastoma; lo que sugiere que el patrón de metilación y las alteraciones cromosómicas juegan un papel importante para la regulación de los miRNAs que afectan directamente a los oncogenes.

La región 1p36.3-p36.2 se vio modificada en los distintos tipos de tumores estudiados, observándose en algunos casos pérdida y en otros hipometilada, donde se localizan genes como: *TNFRS18*, *TNFRS4*, *TP53* y *AJAP*, los cuales ya se reportaron en la literatura al estar involucrados en el desarrollo del tumor; se puede sugerir un papel significativo de esta región dentro de los TSNC ya que pueden favorecer o truncar la tumorigénesis dependiendo del estado de la región ya sea perdida o hipometilada. Sin embargo, es importante considerar que también se localizan miRNAs relacionados con la tumorigénesis como: MIR200B, MIR429 y MIR34A, siendo este último un supresor de tumores relacionado con la vía de *p53*. Por lo tanto, si la región cromosómica 1p36.3-p36.2 está pérdida se mostrará bloqueada la vía de *p53*, debido a que se localiza tanto *TP53* y MIR34A en esta banda cromosómica, posiblemente favoreciendo el desarrollo tumoral. Igualmente la región 1p36.3-p36.2 hipometilada, sugiere que existe mayor expresión de *TP53* pero menor expresión de MIR34A. A pesar de conocerse que este miRNA depende de la expresión de *p53*, se puede esperar que se encuentre bloqueada debido a la subexpresión de MIR34A, afectando la retroalimentación entre *TP53* y MIR34A.

Cabe mencionar que es importante ampliar el número de muestras así como también realizar otros estudios con mayor resolución y especificidad para poder ubicar las alteraciones cromosómicas y el patrón de metilación que tengan en común los TSNC ubicados en fosa posterior así como también las regiones que permitan distinguir entre cada tipo de tumor de acuerdo a su origen ya sea germinal, glial y embrionario. Así como estudiar la expresión de algunos genes que se sugiere se localizan sub o sobre expresa

9. Conclusiones

En el presente estudio se observaron alteraciones cromosómicas y patrón de metilación en regiones compartidas entre e intra-tumores de fosa posterior a pesar de ser de diferente origen ya sea germinal, glial o embrionario. La región encontrada con más alteraciones cromosómicas y patrón de metilación aberrante es 1p36.1-p35, mientras que diferentes regiones de otros cromosomas como 5q, 7q, 17q y 22 se perciben como características en los distintos TSNC estudiados, lo que sugiere que existen regiones características para cada tipo de tumor, como las regiones hipometiladas 7p13 en astrocitomas, 3q29 en Germinoma y 17q24-q25 en meduloblastomas; así como regiones compartidas entre tumores localizados en fosa posterior.

Los genes mayormente afectados están relacionados con sistema inmune, regulación del ciclo celular, factores de transcripción y adherencia. Además los resultados obtenidos sugieren que el patrón de metilación sumado a las alteraciones cromosómicas tiene un papel importante en la regulación de los miRNAs para el desarrollo tumoral en TSNC.

El estudio permitió una visualización general de las similitudes que poseen los TSNC por ubicación, abriendo la posibilidad de otros estudios más específicos sobre algunos tumores y sobre genes blanco que proporcionen mayor información que ayude a la comprensión de las vías de regulación involucradas en los TSNC.

10. Literatura citada

- Ahmad J., Hasnain S. E., Siddiqui M. A., Ahamed M., Musarrat J., Al.Khedhairy A., **“MicroRNA in carcinogenesis & cancer diagnostics: A new paradigm”**; Indian Journal Medical Research 137:680-694, 2013
- Alcaraz M E., Niveiro J. M., Paya R. A., López C. S. Moreno L. P., Aranda L. I., **“Ependimoma de células gigantes de la cauda equina. A propósito de un caso”**; Revista Española de Patología 43:155–158, 2010.
- Alelú-Paz R., Ashour N., González-Corpas A., Roper S., **“DNA methylation, histone modifications, and signal transduction pathways: a close relationship in malignant gliomas pathophysiology”**; Journal of Signal Transduction 2012:8, 2012.
- Alonso M. E., Bello M. J., Gonzalez-Homez P., Arjona D., de Campos J. M., Gutierrez M., Rey J. A., **“Aberrant CpG island methylation of multiple genes in ependymal tumors”**; Journal of Neuro-Oncology 67:159–165, 2004.
- Amatruda J. F., Ross J. A., Christensen B., Fustino N. J., Chen K. S., Hooten A. J., Nelson H., Kuriger J. K., Rakheja D., Frazier L., Poynter J. N., **“DNA methylation analysis reveals distinct methylation signatures in pediatric germ cell tumors”**, BMC Cancer 13:313-326, 2013.
- Asanuma M., Aoyama T., Sakai K., Asano K., Uehara T., Hongo K. **“Hematogenous extraneural metastasis of the germinomatous component of a pineal mixed germ cell tumor”**; Brain Tumor Pathology 29:245–250, 2012.
- Asmoniene V., Skiriute D., Gudinaviciene I., Tamasauskas S., Skauminas K., Delvuta V P., Tamasauskas A., **“A Primary Primitive Neuroectodermal Tumor of the Central Nervous System in a 51-year-old Woman: a Case Report and Literature Review”**; Medicine (Kaunas) 47:440-445, 2011.

- Bax D. A., Little S. E., Carvalho ., Viana-Pereira M., Tamber N., Grigoriadis A. E., Ashworth A., Reis R. M., Ellison D. W., Al-Sarraj S., Hargrave D., Jones C., **“A distinct spectrum of copy number aberrations in paediatric high grade gliomas”**; Clinical Cancer Research 16: 3368–3377, 2010.
- Cheng Q., Yi B., Wang A., Jiang X., **“Exploring and exploiting the fundamental role of microRNAs in tumor pathogenesis”** OncoTargets and Therapy 6:1675–1684, 2013.
- Chico P. L. F., Castro S. E., Perezpeña D. M., Gordillo D. L. F., Santana M.B. L., Rocha R. L. E., Vaca R. M. A., Ríos A. M., Sánchez H. F., Valdés O. R., **“Tumores intracraneanos del niño”**; Boletín Médico del Hospital Infantil de México 63:367-381, 2006.
- Collins V. P. **“Brain tumours: classification and genes”**; Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry 75:2–11, 2004.
- Costa F. F., Bischof J. M., Vainn E. F., Lulla R. R., Wang M., Sredni S. T., Rajaram., Bonaldo M F., Wang D., Goldman S., Tomita T., Soares M. B., **“Identification of MicroRNAs as potential prognostic markers in Ependymoma”** Plos One 6:10-20, 2011.
- de Bont J. M., Packer R. J., Michiels E. M., den Boer M. L.; Pieters R., **“Biological background of pediatric medulloblastoma and ependymoma: A review from a translational research perspective”**; Neuro- Oncology 10:1040–1060, 2008.
- Diede S. J., Guenthoerec J., Gengc L. N., Mahoneyc S E., Marottad M., Olsona J, M., Tanakad H., Tapscotta S., **“DNA methylation of developmental genes in pediatric medulloblastomas identified by denaturation analysis of methylation differences”**; Proceedings of the National Academy of Science 107:234-239, 2010.
- Ebinger M., Senf L., Wachowski O., Scheurlen W., **“Promoter methylation pattern of Caspase-8, P16INK4A, MGMT, TIMP-3, and E-Cadherin in Medulloblastoma”**; Pathology Oncology Research 10:17-21 , 2004.

- Ellison D. W., Kocak ;., Figarella B. D., Felice G., Catherine G., Pietsch T., frappaz D., Massimino M., Grill J., Boyett J. M. Grundy R. G., **“Histopathological grading of pediatric ependymoma: reproducibility and clinical relevance in European trial cohorts”**; Journal of Negative Results in BioMedicine 10:7-21, 2011.
- Ertan Y., sarsik B., Ozgiray E., Kitis O., Dalbasti T., Akalm T., **“Pigmented ependymoma with signet-ring cells and Rosenthal fibers: A rare variant of ependymoma”**; Neuropathology 30:71–75, 2010.
- Fajardo G. A., Mejía A. J. M., Hernández C. L., Méndoza S. H. F.; Garduño E. J., Martínez G. M. C.; **“Epidemiología descriptiva de las neoplasias malignas en niños”** Revista Panamericana de Salud Publica 6:77-88, 1999.
- Fangusaro J., Van den Berghe C., Tomita T., Rajaram V., Aguilera D., Goldman S., **“Wang Evaluating the incidence and utility of microscopic metastatic dissemination as diagnosed by lumbar cerebro-spinal fluid (CSF) samples in children with newly diagnosed intracranial ependymoma”**; Jorunal of Neurooncology 103:693–698, 2011.
- Fernández L., Portugal R., Valentin J., Martína R., Maxwell H., González-Vicent M., Díaz M. A., de Prada I., Pérez-Martínez A., **“In vitro Natural Killer Cell immunotherapy for medulloblastoma”**; Frontiers in Oncology 3:94, 2013.
- Forbes J. A., Zuckerman S. L., Hanif R., Forbes C., Pearson M. M., Wushensky C. A., **“Evidence of tumor exit from the outlet foramina of fourth ventricle predicts Ependymoma in pediatric patients with cerebellar/fourth ventricular tumors”**; Journal of Surgical and Radiologic Anatomic 3:20-23, 2011.
- Frigola J., Ribas M., Risques R. A., Peinado M. A., **“Methylome profiling of cancer by amplification of inter-methylated sites (AIMS)”**; Nucleic Acid Research 30:7 2002.

- Gömöri E. Pál J., Kovács B., Dóczi T., **“Concurrent hypermethylation of DNMT1, MGMT and EGFR genes in progression of gliomas”**; Diagnostic Pathology 7:8, 2012.
- Gonzalez-Gomez P., Bello M. J., Alonso M. E., Arjona D., Lomas J., de Campos J. M., Isla A., Rey J. A., **“CpG Island methylation status and mutation analysis of the RB1 genes esencial promoter región and protein-binding pocket domaid in nervous system tumours”**; British Journal of Cancer 88:109-114, 2003.
- Graff M., Blacker H., Fotto H., **“Extraneural Metastasizing Ependymoma of the Spinal Cord”**; Pathology Oncology Research 5:56-60, 1999.
- Hadjipanayis C. G., Van Meir E. G., **“Brain cancer propagating cells: biology, genetics and targeted therapies”**; Trends in Molecular Medicine 15:519–530, 2009.
- Havik A B., Brandal P., Honne H., Spenning H S., Scheie D., Hektoen M., Ragnar M T., Helseth E., Heim S., Lothe R Lind G E., **“MGMT promoter methylation in gliomasassessment by pyrosequencing and quantitative methylation-specific PCR”**; Journal of Translational Medicine 10:36, 2012.
- Ichimura K., Vogazianou A. P., Liu L., Pearson D. M., Bäcklund L. M., Plant K., Baird K., Langford C. F., Gregory S. G., Collins V. P., **“1p36 is a preferential target of chromosome 1 deletions in astrocytic tumours and homozygously deleted in a subset of glioblastomas”**; Oncogene 27:2097–2108, 2008.
- Johnson R. A., Wright K. D., Poppleton H., Mohankumar K. M., Finkelstein D., Pounds S. B., Rand V., Leary S. E. S., White E., Eden C., Hogg T., Northcott P., Mack S., Neale G., Wang Y. D., Coyle B., Atkinson J., dewier M., Kranenburg T A., Gillespie Y., Allen J. C., Merchant T., Boop F. A., Sanford R. A., Gajjar A., Ellison D. W., Taylor M. D., Grundy R. G., Gilbertson R. J.; **“Cross-species genomics matches driver mutations and cell compartments to model ependymoma”**; Nature, 466:632–636, 2010.

- Khinoshita M., Izumoto S., Kagawa N., Hashimoto N., Muruno M., Yoshimina T., **“Long term control of recurrent anaplastic ependymoma with extracranial metastasis: Importance of multiple surgery and stereotactic radiosurgery procedure”**; Neural Med Chair (Tokyo) 44:669-673, 2004.
- Koeller K., Rushing E J., **“From the archives of the AFIP Oligodendroglioma and its variants: Radiologic-pathologic correlation”**; RadioGraphics 25:1669–1688, 2005.
- Kool M., Koster J., Bunt J., Haselt N. E., Lakeman A., van Sluis P., Troost D., Schouten-van Meeteren N. Caron N., Cloos J., Mrcic A., Ylstran B., Grajkowska W., Hartmann W., Pietsch T., Ellison D., Clifford S C., Versteeg R., **“Integrated genomics identifies five Medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features”**; PLoS ONE 3:3088-3102, 2008
- Kurian K. M., Jones D. T. W., Mursden F., Openshaw S. W. S., Pearson D. M., Ichimura K., Collins I. P., **“Genome-Wide analysis of Subependymoma shows underlying chromosomal copy number changes involving chromosomes 6, 7, 8 and 14 in a proportion of cases”**; Brain Pathology 18:469-473, 2008.
- Lee B H., Kwon J. T., Park Y. S., **“Supratentorial clear cell ependymoma mimicking Oligodendroglioma: Case report and review of the literature”**; Journal of Korean Neurosurgical Society 50:240-243, 2011.
- Lee S. K., Lim D. J., Kim S D., **“Supratentorial Cortical Ependymoma in a 21-Month-Old Boy”**; Journal of Korean Neurosurgery Society 50:244-247, 2011.
- Li L. C. **“Chromatin remodeling by the small RNA machinery in mammalian cells”**; Epigenetics 9:1–8, 2014.
- Li Z., Nie F., Wang S., Li L., **“Histone H4 Lys 20 monomethylation by histone methylase SET8 mediates Wnt target gene activation”**; Proceedings of the National Academy of Science 108:3116-3123, 2011.

- Lindsey J. C., Anderton J. A., Gilbertson R. J., Ellison D. W., Clifford S. C., **“Epigenetic deregulation of multiple S100 gene family members by differential hypomethylation and hypermethylation events in medulloblastoma”**; British Journal of Cancer 97:267–274, 2007.
- Lindsey J. C., Lusher M. E., Strathdaie G., Brown R., Gilbertson R. J., Bailey S., Ellison D. W., Clifford S. C.; **“Epigenetic inactivation of MCJ (DNAJD1) in malignant paediatric brain tumours”**; International Journal of Cancer 118:346-352, 2006.
- Lok-HayYim R., Lam Kwong Y., Yeung Wong K., Sang Chim C. **“DNA methylation of tumor suppressive miRNAs in non-Hodgkin’s lymphomas”**; Frontiers Genetics 3:233, 2012.
- López-Aguilar E., Sepúlveda-Vildósola A. C, Betanzos-Cabrera Y., Gascón-Lastiri G., Ortiz-Suárez L., Rivera-Márquez H., Cerecedo-Díaz F., Wanzke-Del Ángel V., Hermilo De la Cruz-Yáñez H., Ramírez-Reyes G., Arenas-Aranda D., Siordia-Reyes G **“Factores pronósticos y sobrevida de pacientes pediátricos con ependimomas”**; Gaceta Médica de México 145:7-13, 2009.
- Mabbott D. J., Monsalves E., Spiegler B. J., Bartels U., Janzen L., Guger S., Laperriere N., Andrews N., Bouffet E., **“Longitudinal evaluation of neurocognitive function after treatment for central nervous system germ cell tumors in childhood”**; Cancer 117:5402–5411, 2011.
- Maeda S., Takahashi S., Koike K., Sato M., **“Primary Ependymoma in the posterior mediastium”**; Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery 17:494-497, 2011.
- Martínez R., **“Beyond genetics in glioma pathways: The ever-increasing crosstalk between epigenomic and genomic events”**, Journal of Signal Transduction 2012:9, 2012.

- Milde T., Kleber S., Korshunov A., Witt H., Hielscher T., Koch P., Kopp H., Jugold M., Deubzer H. E., Oehme I., Lodrini M., Grone H. J., Benner A., Brustle O., Gilbertson R. J., **“A novel human high-risk ependymoma stem cell model reveals the differentiation-inducing potential of the histone deacetylase inhibitor Vorinostat”**; Acta Neuropathology 122:637–650, 2011.
- Mufti S T., Jamal A., **“Primary intracranial germ cell tumors”**; Asian Journal of Neurosurgery 4:197-202, 2012.
- Muñoz J., Inda M., Lázcoz P., Zazpe I., Fan X., Alfarp J., Tuñón T. Rey J.A., Castresana J. S., **“Promoter methylation of RASSF1A associates to adult secondary glioblastomas and pediatric glioblastomas”**; Neurology 2012: 10, 2012.
- Navas-García M., Going-Revert F., Villarejo-Ortega F J., Robla J., de Prada I., Madero L., Pérez-Díaz C., Rivero-Martín B., Martín-Gamero A P., Budke M., Cordobés-Tapia F., **“Tumores de la región pineal en la edad pediátrica. Presentación de 23 casos y revisión de la bibliografía”** Revista de Neurología 52: 641-652, 2011.
- Nord H., Hartmann C., Andersson R., Menzel U., Pfeifer S., Piotrowski A., Bogdan A., Kloc W., Sandgren J., Olofsson T., Hesselager G., Blomquist E., Komorowski J., von Deimling A., Bruder C., Dumanski J., Díaz de Stahl T. **“Characterization of novel and complex genomic aberrations in glioblastoma using a 32K BAC array”**; Society for Neuro-Oncology 11:803-818, 2009.
- Otsuka S., Maegawa S., takamura A., Kamitani H., Watanabe T., Oshimura M., Nanba E., **“Aberrant promoter methylation and expression of the imprinted PEG3 gene in glioma”**; Proceeding of the Japan Academy Ser. B 85:157-165, 2009.
- Packer, R J., MacDonald T., Vezina G., **“Tumores del sistema nervioso central”**; Pediatricas Clinicas de Norteamérica 55:121–145, 2008.

- Parwani A. V., Baisden B. L., Erozan Y. S., Burger P. C., Ali S. Z., **“Pineal gland lesions a cytopathologic study of 20 specimens”**; Cancer (Cancer Cytopathology) 105:80–86, 2005.
- Peyre M., Common F., Dantas B. C., Andreiuolo F., Puget S., Lacroix L., Dusch F., Scott V., Varlet P., Muguen A., **“Portrait of ependymoma recurrence in children: biomarkers of tumor progression identified by dual-color microarray-based gene expression analysis”**; PLoS ONE 5:12932, 2010.
- Phi J H., Kim S. H., Lee J., Park C. K., Kim H., Ahn H., Shin H Y., Kim I., Jung H., Kim D. G., Paek S. H., Wang K.C., **“The enigma of bifocal germ cell tumors in the suprasellar and pineal regions: synchronous lesions or metastasis?”** Journal of Neurosurgery Pediatrics 11:107–114, 2013.
- Prat R A. Galeano S I., **“Opciones terapéuticas del astrocitoma de bajo grado supratentorial en el adulto”**; Archivos de Neurociencias (México) 13: 35-42, 2008.
- Raisch J., Darfeuille-Michaud A., Nguyen H., **“Role of microRNAs in the immune system, inflammation and cancer”**; World Journal of Gastroenterology 19:2985-2996, 2013.
- Rickert C. H., Simon R., Bergmann M., Dockhorn-Dworniczak B., Paulus W., **“Comparative Genomic Hybridization in pineal germ cell tumors”**; Journal of Neuropathology and Experimental Neurology 59:815-821, 2000.
- Robindon G., Parker M., Kranenburg T. A., Lu C., Chen X., Ding L., Phoenix T. N., Hedlund E., Wei L., Zhu X., Chamhoub N., Baker S. J., Huethet R., Kriwaki R., Curley N., Thiuvenkatam R., Wang J., Wu G., Rush M., Hong X., Becksforty J., Gupta P., Ma J., Easton J., Vadodarai B., Onar-Thomas A., Lin T., Li S., Pounds S., Paugh S., Zhao D., Kawauchi D., Roussel M. F., Finkeltein D., Ellison D.W., Lau C., Bouffet E., Hassall T., Gururagan R., Cohn R., Fukton R. S., Fulton L. L., Dooling D. J., Ochoa K., Gajjar A., Mardis E. R., Wilson R. W., Downing J, R., Zhang J,m Gilbertson R. J., **“Novel mutations target distinct subgroups of medulloblastoma”**; Nature 488:43–48, 2012.

- Rogers H. A., Kilday J. P., Mayne C., Adamowicz-Brice M., Schwalbe E. C., Clifford S. C., Cole B., Grundy R. G., **“Supratentorial and spinal pediatric ependymomas display a hypermethylated phenotype which includes the loss of tumor suppressor genes involved in the control of cell growth and death”**; *Acta Neuropathologica* 123:711–725, 2012.
- Rousseau A., Idbaih A., Ducray F., Criniere E., Fevre-Montange M., Jouvret A., Delattre J. **“Specific chromosomal imbalances as detected by array CGH in ependymomas in association with tumor location, histological subtype and grade”**; *Journal of Neurooncology* 97:353–364, 2010.
- Rousseau E., Palm T., Scaravilli F., Ruchoux M., Figarella B. D., Salmon I., Ellison D., Lacroix C., Chapon F., Mikol J., Vikkul M., Godfraind C.; **“Trisomy 19 ependymoma, a newly recognized genitico-histological association, including clear cell ependymoma”**; *Molecular Cancer* 6:47, 2007.
- Schmidt A. T., Martin R. B., Ozturk A., Kates W. R., Wharam M. D., Mahone E. M., Horská A., **“Neuroimaging and neuropsychological follow-up study in a pediatric brain tumor patient treated with surgery and radiation”**; *Neurocase* 16:74–90, 2010.
- Schubert F., Tausch B., Joos S., Elis R., **“CGH-Profiler: Data mining based on genomic aberration profiles”**; *BMC Bioinformatics* 6:188, 2005.
- Schwalbe E. C., Lindsey J. C., Straughton D., **“Rapid Diagnosis of Medulloblastoma Molecular Subgroups”**; *Clinical Cancer Research* 17:1883-1894, 2011.
- Senetta R., Verdun L., Chiusa L., Castellano I., Gugliotta P., Sapino A., Cassoni P.; **“Weighted fluorescence in situ hybridization strengthens the favorable prognostic value of 1p/19q codeletion in pure and mixed oligodendroglial tumors”**; *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 72:432-434, 2013.

- Sevilhan A., Ülkü Ö., Müslümanoglu H., Özdemir M., Durmaz R., Arslantas D., Vural M., Cosan E., Atasoy M., **“Genomic alterations in low-grade, anaplastic astrocytomas and glioblastomas”**; Pathology Oncology Research 13:39-46, 2007.
- Shonka **“Targets for therapy in ependymoma”**; Target Oncology 6:163–169, 2011
- Sintupisut N., Liu P. L., Yeang C. H., **“An integrative characterization of recurrent molecular aberrations in glioblastoma genomes”**; Nucleic Acids Research 2013:1–19, 2013.
- Suri V., Jha P., Agarwal S., Pathak P., Sharma M. C., Sharma V., Shukla S., Somasundaram K., Kumar A., Kale S. S., Sarkar C. **“Molecular profile of oligodendrogliomas in young patients”**; Neuro-Oncology 13:1099–1106, 2011.
- Tysnes B. B., **“Tumor-initiating and –propagating cells: Cells that we would like to identify and control”**; Neoplasia 12:506–515, 2010.
- Vaitkienė P., Skiriutė D., Tamasauskas A., **“GATA4 and DcR1 methylation in glioblastomas”**; Diagnostic Pathology 8:7, 2013.
- Vega-Orozco R., Rembao-Bojórquez D., Salmerón-Mercado M., García-Marquez A., Tena-Suck M. L., **“Inguinal lymph nodal metastasis of myxopapillaryependymoma confirmed by fine-needle aspiration cytology, biopsy, and immunohistochemistry: Case report”**; Diagnostic. Cytopathology 39:689–693, 2011.
- Velnar T., Smrdel U., Popovic M., Bunc G., **“Genetic markers in oligodendroglial tumours”**; Radiology and Oncology 44:13-18, 20120.
- Villarejo F., Martínez L F., **“Tumores cerebrales en niños”** Pediatría Integral 12:577-583, 2008.
- Volpe P., **“The language of methylation in genomics of eukaryotes”**; Biochemistry (Moscow) 70:584-595, 2005.

- Waha A., Koch A., Hartmann W., Mack H., Schramm J., Sörensen N., Berthold F., Wiestler O. D., Pietsch T., Waha A., **“Analysis of HIC-1 Methylation and Transcription in human ependymomas”**; International Journal of Cancer 110:542-549, 2004.
- Walker C., Baboie A., Crooks D., Wilkins S., Jenkinson M. D., **“Biology, genetics and imaging of glial cell tumours”**; The British Journal of Radiology 84:90–106, 2011.
- Wani K., Armstrong T. S., Vera-Bolanos E., Raghunathan A., Ellison D., Gilbertson R., Vaillant B., Goldman S., Packer R. J., Fouladi M., Pollack I., Mikkelsen T., Prados M., Omuro A., Soffietti R., Ledoux A., Wilson C., Long L., Gilbert M. R., Aldape K., **“A prognostic gene expression signature in infratentorial ependymoma”**; Acta Neuropathology 123:727–738, 2012.
- Wantaka S. N., Roa S., **“The Multidimensional Nature of Epigenetic Information and Its Role in Disease”**; Discovery Medicine 11:233-243 2011.
- Weiss M. M., Hermsen J. A., Meijer G. A., van Grieken N. C. T., Baak J. P. A., Kujpers E. J., van Diest P. J., **“Comparative genomic hybridization”**; Journal Clinical Pathology: Molecular Pathology 52:243–251, 1999.
- Wu X., Northcott P., Dubuc A., Dupuy A., Shih D., Witt H., Croul S., Bouffet E., Fult D W., Eberhart C., Garzia I., Van Meter T., Zagza D., Jabado N., Schwartzentruber J., Majewski J., Scheerz T., Pfister S., Korshunov A., Li X., Schere S W., Cho Y J., Akagi K., McDonald T., Joster J., McCabe M G., Sarver A L., Collins P V., weiss W A., Largaespada D., Collier L S., Taylor M., **“Clonal selection drives genetic divergence of metastatic Medulloblastoma”**, Nature 482:529–533, 2012.
- Xie H., Wang M., Bonaldo M. F., Rajaram V., Stellpflug W., Smith C., Arndt K., Goldman S., Tomita T., Soares M. B., **“Epigenomic analysis of Alu repeats in human ependymomas”**; Proceedings of the National Academy of Science, Genetics; 17: 1-6, 2010.

- Zhang L., Meng J., Liu H., Huang Y., **“A nonparametric Bayesian approach for clustering bisulfate-based DNA methylation profiles”**, BMC Genomics, 13:S20, 2012
- Ziberman D., Henikokk. **“Genome-wide analysis of DNA methylation patterns”**; Development 134:3959-3965, 2007.
- Zinn PO, Sathyan P, Mahajan B, Bruyere J, Hegi M., **“A Novel Volume-Age-KPS (VAK) glioblastoma classification identifies a prognostic cognate microRNA-gene signature”**; PLoS ONE 7:8, 2012.
- Zornic M., Korkuti D., Jakupoici S., Roux F. E., **“Infratentorial Ependymomas in Children”**; Paediatrics Today 7:125-132, 2011.
- Zuccaro G **“Ependimoma Intracraneano en la Infancia”**, Revista Argentina Neurociencias 22:191, 2008.

Anexo I

Método de Fenol-Cloroformo-Isoamílico

1. Colocar el tejido en 500 µl de Amortiguador de lisis.
2. Disgregar el tejido en TissueLyser a 30 Htz por 2 min.
3. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min.
4. Recuperar el sobrenadante.
5. Hacer extracción Vol:Vol con Fenol-Cloroformo-Isoamílico (25:24:1).
6. Centrifugar a 14,000 rpm durante 10 min.
7. Recuperar la fase acuosa.
8. Precipitar con isopropanol en una relación Vol:Vol
9. Incubar a -20 °C por 3 horas.
10. Centrifugar a 10,000 rpm por 10min.
11. Elimina el sobrenadante, recuperando la pastilla.
12. Lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70%.
13. Centrifugar a 10,000 rpm durante 15 min.
14. Recuperar la pastilla.
15. Lavar la pastilla con 500 µl de etanol al 70%
16. Centrifugar a 10,000 rpm durante 15 min.
17. Recuperar la pastilla.
18. Dejar secar.
19. Resuspender en 20 µl de Agua libre de DNAsas
20. Almacenar a -20 °C.

Anexo II

Marcaje con Random Primers DNA Labeling System (Invitrogen)

1. Desnaturalizar 25 ng de DNA por calentamiento durante 5 min en un baño de agua hirviendo y enfriar en hielo.
2. Agregar 2 μ l de dATP, 2 μ l de dGTP, 2 μ l dTTP, 15 μ l de Buffer y a un volumen de 49 μ l.
3. Mezclar brevemente.
4. Añadir 5 μ l de enzima "*Klenow Fragment*", mezclar.
5. Incubar a 25 °C durante 1 hora.
6. Para detener la reacción añadir 5 μ l de "*buffer stop*".

Anexo III

En las siguientes tablas se muestran las vías en que participan los miRNAs encontrados en las regiones con alteraciones cromosómicas o con patrón de metilación modificado con respecto al grupo testigo; dentro del paréntesis se hace referencia cómo fue observada la región donde se localiza el miRNA.

Tabla 1. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-126 (Región amplificada)

Vías Blanco	Genes
Carcinoma Renal	CRK
Leucemia mieloide crónica	CRK
Vía de señalización ErbB	CRK
Vía de señalización Wnt	LRP6
Vía de señalización MAPK	CRK

Tabla 2. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-920 (Región pérdida)

Vías Blanco	Genes
Cáncer de pulmón de células pequeñas	ITGA3, AKT3
Vía de señalización	AKT3, SPNS1
Cáncer endometrial	AKT3
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	AKT3
Leucemia mieloide aguda	AKT3
Vía de señalización MAPK	MAP2K1IP1, AKT3
Vía de señalización de células B	AKT3
Glioma	AKT3
Carcinoma Renal	AKT3
Vía de señalización VEGF	AKT3
Melanoma	AKT3
Cáncer de páncreas	AKT3
Leucemia mieloide crónica	AKT3
Apoptosis	AKT3
Cáncer colorectal	AKT3
Vía de señalización ErbB	AKT3
Vía de señalización TGF-beta	SMURF1
Cáncer de próstata	AKT3
Vía de señalización Jak-STAT	AKT3

Tabla 3. Vías y procesos celulares en las que participa hsa-miR-1185 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Vía de señalización p53	CCND2
Vía de señalización VEGF	MAPK14
Ciclo celular	CCND2
Vía de señalización Wnt	CCND2
Vía de señalización Jak-STAT	CCND2
Vía de señalización MAPK	MAPK14

Tabla 4. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-let-7b (Región pérdida)

Vías Blanco	Genes
Vía de Señalización MAPK	MAP4K3, MAP4K4, DUSP4, TGFBR1, MAP3K1, PDGFB, MAP3K7IP2, MAPK11, DUSP9, FASLG, CACNG4, CACNA1D, DUSP16, MAP3K3, PAK1, TP53, FGF11, AKT2, ACVR1B, PLA2G3, NLK, DUSP1, FGF5, ACVR1C, FAS, RPS6KA3, CASP3
Leucemia Mieloide Crónica	GAB2, TGFBR1, CDKN1A, CBL, E2F2, RB1, TP53, AKT2, ACVR1B, ACVR1C, BCL2L1, CCND1
Vía de señalización p53	CDKN1A, RRM2, STEAP3, TP53, THBS1, CCND2, PMAIP1, FAS, IGF1, CASP3, CCND1
Melanoma	IGF1R, CDKN1A, PDGFB, E2F2, RB1, TP53, FGF11, AKT2, FGF5, IGF1, CCND1
Cáncer de páncreas	TGFBR1, RALB, SMAD2, E2F2, RB1, TP53, AKT2, ACVR1B, ACVR1C, BCL2L1, CCND1
Cáncer Colorectal	APC2, DVL3, TGFBR1, IGF1R, SMAD2, TP53, AKT2, ACVR1B, ACVR1C, FZD4, CASP3, CCND1
Cáncer de vejiga	CDKN1A, DAPK1, E2F2, RB1, TP53, THBS1, CCND1
Glioma	IGF1R, CDKN1A, PDGFB, E2F2, RB1, TP53, AKT2, IGF1, CCND1
Vía de señalización TFG-beta	E2F5, TGFBR1, SMAD2, ACVR2A, GDF6, THBS1, ACVR2B, ACVR1B, ACVR1C, ZFYVE16
Cáncer de próstata	IGF1R, CDKN1A, PDGFB, E2F2, RB1, TP53, AKT2, IGF1, CCND1
Vía de señalización Wnt	APC2, NKD1, DVL3, VANGL2, SMAD2, TP53, WNT1, NLK, CCND2, FZD4, SENP2, CCND1
Cáncer de pulmón de células pequeñas	COL4A6, E2F2, RB1, TP53, AKT2, BCL2L1, COL4A1, CCND1
Ciclo celular	CDKN1A, SMC1A, SMAD2, E2F2, RB1, TP53, CCND2, CDC25A, CCND1
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	E2F2, RB1, TP53, AKT2, CCND1
Vía de señalización Notch	DTX2, DVL3, NUMBL, DTX4
Vía de señalización Jak-STAT	SOCS4, CBL, IL13, OSMR, GHR, IL10, AKT2, CCND2, BCL2L1, CCND1
Apoptosis	FASLG, TP53, AKT2, FAS, CASP3, BCL2L1
Vía de señalización Hedgehog	WNT1
Cáncer endometrial	APC2, TP53, AKT2, CCND1
Vía de señalización de celula T	ICOS, CBL, VAV3, PAK1, IL10, AKT2
Vía de señalización de célula B	VAV3, AKT2
Vía de señalización ErbB	CDKN1A, CBL, PAK1, ABL2, AKT2
Cáncer de tiroide	TP53, CCND1
Vía de señalización PPAR	SCD, OLR1, ACSL6, PPARA
Carcinoma Renal	PDGFB, PAK1, AKT2
Leucemia mieloide aguda	AKT2, CCND1
Vía de señalización VEGF	MAPK11, AKT2, PLA2G3

Tabla 5. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-27b (Región amplificada)

Vías Blanco	Genes
Cáncer colorectal	FZD7, PDGFRA, TGFBR1, MET, KRAS, SMAD2, SOS1, APC, GRB2, DVL2, ACVR1C, FZD4, PIK3CD
Vía de señalización ErbB	CAMK2D, HBEGF, KRAS, MAP2K4, SOS1, ABL2, GRB2, PAK6, MAP2K7, CBLB, SHC4, RPS6KB1, PIK3CD
Vía de señalización MAPK	PRKY, PDGFRA, TGFBR1, MAP3K4, MAPKAPK3, KRAS, CACNB2, MEF2C, DUSP5, MAPT, TAOK1, MAP2K4, SOS1, PRKX, RPS6KA5, FGF1, CDC42, GRB2, MAP2K7, RAP1B, NLK, NF1, MAPK14, ACVR1C, MAP3K12, MAP3K14, GNG12
Glioma	CAMK2D, PDGFRA, KRAS, CDK6, SOS1, CALM1, CALM2, CALM3, GRB2, IGF1, SHC4, PIK3CD
Vía de señalización Wnt	FZD7, WNT3A, CAMK2D, PRKY, LRP6, SFRP1, VANGL2, SMAD2, PRKX, APC, VANGL1, DVL2, NLK, DKK2, FZD4, NFAT5, PRICKLE2
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	RASSF5, PDPK1, KRAS, CDK6, SOS1, GRB2, PIK3CD, RXRA
Leucemia mieloide crónica	TGFBR1, KRAS, CDK6, SOS1, RUNX1, GRB2, CBLB, ACVR1C, SHC4, PIK3CD
Vía de señalización TGF-beta	TGFBR1, ID3, SMAD2, SMAD5, ACVR2A, GDF6, ACVR2B, SP1, ACVR1C, RPS6KB1, BMPR1A
Carcinoma renal	MET, KRAS, VEGFC, SOS1, CDC42, GRB2, PAK6, RAP1B, PIK3CD
Cáncer de páncreas	TGFBR1, ARHGEF6, KRAS, CDK6, SMAD2, VEGFC, CDC42, ACVR1C, PIK3CD
Leucemia mieloide aguda	KRAS, SOS1, RUNX1, GRB2, RARA, RPS6KB1, PIK3CD
Cáncer de próstata	PDGFRA, PDPK1, KRAS, SOS1, FOXO1, GRB2, IGF1, CREB1, PIK3CD
Cáncer de tiroides	KRAS, RET, PPARG, RXRA
Cáncer endometrial	PDPK1, KRAS, SOS1, APC, GRB2, PIK3CD
Melanoma	PDGFRA, MET, KRAS, CDK6, FGF1, IGF1, PIK3CD
Ciclo celular	CDC27, YWHAB, CDK6, SMAD2
Vía de señalización p53	CCNG1, CDK6, SESN2, APAF1, IGF1, BBC3
Señalización SHH	WNT3A, PRKY, PRKX, PTCH1, CSNK1G1
Vía de señalización VEGF	MAPKAPK3, KRAS, CDC42, MAPK14, NFAT5, PIK3CD
Apoptosis	APAF1, MAP3K14, PIK3CD
Vía de señalización de células B	KRAS, VAV3, VAV2, NFAT5, PIK3CD
Vía de señalización PPAR	LPL, PDPK1, PPARG, RXRA, PPARA
Vía de señalización Jak-STAT	LEP, LIFR, SOCS4, SOS1, IL10, GRB2, CBLB, PIK3CD, SPRY2
Vía de señalización Notch	DVL2, DTX4
Cáncer de vejiga	KRAS, VEGFC, RPS6KA5

Tabla 6. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-23a (Región amplificada)

Vías Blanco	Genes
Carcinoma renal	MET, EPAS1, SOS1, PTPN11, CREBBP, PAK2, PAK6, RAP1B, TGFA, RAP1A, ARNT, ARNT2, PIK3R3
Vía de señalización Wnt	FZD7, CTNNBIP1, SFRP4, LRP5, CSNK2A2, FZD5, SFRP1, CREBBP, FRAT2, PPP3CA, NLK, FZD4, CCND1, FRAT1
Vía de señalización MAPK	MAP4K4, MAP3K1, FLNB, MEF2C, DUSP5, RRAS2, STK4, SOS1, MAP3K3, FGF2, PAK2, RAP1B, PPP3CA, NLK, TGFB2, RAP1A, ACVR1C, FAS, MAP3K5, PDGFA
Cáncer colorectal	FZD7, FZD5, MET, SOS1, TGFB2, ACVR1C, FZD4, PIK3R3, CCND1
Leucemia mieloide crónica	STAT5B, SOS1, PTPN11, RUNX1, TGFB2, ACVR1C, PIK3R3, CCND1
Vía de señalización p53	CCNG1, RCHY1, SESN2, APAF1, PMAIP1, FAS, CCND1
Vía de señalización Jak-STAT	IL21R, STAT5B, SOS1, PTPN11, CREBBP, JAK1, IL12B, IL11, PIK3R3, CCND1, SPRY2, IL6R
Vía de señalización ErbB	STAT5B, SOS1, ABL2, PAK2, PAK6, TGFA, ERBB4, PIK3R3
Cáncer de próstata	PDPK1, SOS1, HSP90B1, CREBBP, TGFA, PIK3R3, CCND1, PDGFA
Cáncer de páncreas	ARHGEF6, TGFA, TGFB2, JAK1, ACVR1C, PIK3R3, CCND1
Melanoma	MET, MITF, FGF2, PIK3R3, CCND1, PDGFA
Leucemia mieloide aguda	SOS1, RUNX1, RUNX1T1, PIK3R3, CCND1
Vía de señalización TGF-beta	RBL2, SMAD5, CREBBP, ACVR2B, TGFB2, BMPR1B, ACVR1C
Glioma	SOS1, TGFA, PIK3R3, CCND1, PDGFA
Vía de señalización PPAR	PDPK1
Cáncer endometrial	PDPK1, SOS1, PIK3R3, CCND1
Apoptosis	CASP7, APAF1, PPP3CA, FAS, PIK3R3
Cáncer de pulmón de células pequeñas	COL4A4, APAF1, PIK3R3, COL4A1, CCND1
Vía de señalización VEGF	PPP3CA, PIK3R3
Cáncer de vejiga	CCND1
Ciclo celular	RBL2, CCNH, CREBBP, YWHAG, CDC23, CCND1
Vía de señalización Notch	CREBBP
Vía de señalización de células B	PPP3CA, PIK3R3
Vía de señalización Shh	CSNK1G3, CSNK1G1, IHH

Tabla 7. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-200c (Región pérdida)

Vías Blanco	Genes
Carcinoma renal	KRAS, TCEB1, CRKL, PTPN11, VEGFA, RAC1, CREBBP, PAK6, RAP1B, AKT2, ETS1, PAK7, EP300, GAB1, EGLN1, JUN
Vía de señalización ErbB	CDKN1B, PRKCA, KRAS, CBL, CRKL, SHC1, PAK6, AKT2, ERBB4, PAK7, PLCG1, GAB1, RPS6KB1, JUN
Vía de señalización TGF-beta	RHOA, SMURF1, SMAD2, ACVR2A, NOG, PPP2R2C, CREBBP, PPP2CA, ACVR2B, SMURF2, SP1, ACVR1C, EP300, RPS6KB1
Leucemia mieloide crónica	CDKN1B, E2F3, KRAS, CBL, CRKL, PTPN11, SHC1, IKBKB, AKT2, ACVR1C, CTBP2
Cáncer de próstata	CCNE2, BCL2, CDKN1B, E2F3, PDPK1, KRAS, CREBBP, IKBKB, CREB5, AKT2, CDK2, EP300
Vías de señalización MAPK	MAP4K3, MAP4K4, RPS6KA2, PRKCA, NTF3, MAP3K1, PPM1B, KRAS, CRKL, RAC1, SRF, MAPK7, IKBKB, RAP1B, AKT2, DUSP1, ACVR1C, RPS6KA3, MAP3K5, PRKACB, JUN
Vía de señalización Notch	NUMB, CREBBP, LFNG, EP300, JAG2, CTBP2
Cáncer de pulmón	CCNE2, BCL2, CDKN1B, E2F3, IKBKB, APAF1, AKT2, CDK2, LAMC1
Cáncer de páncreas	E2F3, KRAS, SMAD2, VEGFA, RAC1, IKBKB, AKT2, ACVR1C
Vía de señalización Wnt	PRKCA, RHOA, SMAD2, PPP2R2C, RAC1, CREBBP, FBXW11, PPP2CA, EP300, PRKACB, JUN, CTBP2
Ciclo celular	CCNE2, CDKN1B, E2F3, YWHAB, SMAD2, YWHAQ, CREBBP, YWHAG, CDK2, EP300
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	E2F3, PRKCA, PDPK1, KRAS, AKT2, PLCG1
Vía de señalización Shh	RAB23, GLI3, FBXW11, PTCH1, CSNK1G3, PRKACB
Vía de señalización VEGF	PRKCA, KRAS, VEGFA, RAC1, KDR, AKT2, PLCG1
Cáncer colorectal	BCL2, APPL1, KRAS, SMAD2, RAC1, AKT2, ACVR1C, JUN
Glioma	E2F3, PRKCA, KRAS, SHC1, AKT2, PLCG1
Apoptosis	BCL2, PRKAR2B, IKBKB, APAF1, AKT2, PRKAR1A, PRKACB
Vía de señalización células B	KRAS, RAC1, IKBKB, AKT2, JUN
Vía de señalización p53	CCNE2, SESN1, APAF1, CDK2, PMAIP1
Leucemia mieloide aguda	KRAS, IKBKB, AKT2, RPS6KB1
Cáncer de vejiga	E2F3, KRAS, VEGFA
Vía de señalización PPAR	SCD, PDPK1
Cáncer de tiroides	KRAS
Melanoma	E2F3, KRAS, AKT2
Carcinoma de células basales	GLI3, PTCH1
Vía de señalización Jak-STAT	CNTRF, LEPR, CBL, PTPN11, CREBBP, AKT2, EP300

Tabla 8. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-23b (Región amplificada)

Vías Blanco	Genes
Carcinoma renal	MET, EPAS1, SOS1, PTPN11, CREBBP, PAK2, PAK6, RAP1B, TGFA, RAP1A, ARNT, ARNT2, PIK3R3
Vía de señalización Wnt	FZD7, CTNNBIP1, SFRP4, LRP5, CSNK2A2, FZD5, SFRP1, CREBBP, FRAT2, PPP3CA, NLK, FZD4, CCND1, FRAT1
Vía de señalización MAPK	MAP4K4, MAP3K1, FLNB, MEF2C, DUSP5, RRAS2, STK4, SOS1, MAP3K3, FGF2, PAK2, RAP1B, PPP3CA, NLK, TGFB2, RAP1A, ACVR1C, FAS, MAP3K5, PDGFA
Cáncer colorectal	FZD7, FZD5, MET, SOS1, TGFB2, ACVR1C, FZD4, PIK3R3, CCND1
Leucemia mieloide crónica	STAT5B, SOS1, PTPN11, RUNX1, TGFB2, ACVR1C, PIK3R3, CCND1
Vía de señalización p53	CCNG1, RCHY1, SESN2, APAF1, PMAIP1, FAS, CCND1
Vía de señalización Jak-STAT	IL21R, STAT5B, SOS1, PTPN11, CREBBP, JAK1, IL12B, IL11, PIK3R3, CCND1, SPRY2, IL6R
Vía de señalización ErbB	STAT5B, SOS1, ABL2, PAK2, PAK6, TGFA, ERBB4, PIK3R3
Cáncer de próstata	PDPK1, SOS1, HSP90B1, CREBBP, TGFA, PIK3R3, CCND1, PDGFA
Cáncer de páncreas	ARHGEF6, TGFA, TGFB2, JAK1, ACVR1C, PIK3R3, CCND1
Melanoma	MET, MITF, FGF2, PIK3R3, CCND1, PDGFA
Leucemia mieloide aguda	SOS1, RUNX1, RUNX1T1, PIK3R3, CCND1
Vía de señalización TGF-beta	RBL2, SMAD5, CREBBP, ACVR2B, TGFB2, BMPR1B, ACVR1C
Glioma	SOS1, TGFA, PIK3R3, CCND1, PDGFA
Vía de señalización PPAR	PDPK1
Cáncer endometrial	PDPK1, SOS1, PIK3R3, CCND1
Apoptosis	CASP7, APAF1, PPP3CA, FAS, PIK3R3
Cáncer de pulmón de células pequeñas	COL4A4, APAF1, PIK3R3, COL4A1, CCND1
Vía de señalización VEGF	PPP3CA, PIK3R3
Vía de señalización células T	SOS1, PAK2, PAK6, PPP3CA, PIK3R3
Cáncer de vejiga	CCND1
Ciclo celular	RBL2, CCNH, CREBBP, YWHAG, CDC23, CCND1
Cáncer de tiroides	CCDC6, CCND1
Vía de señalización Notch	CREBBP
Vía de señalización células B	PPP3CA, PIK3R3
Vía de señalización Shh	CSNK1G3, CSNK1G1, IHH

Tabla 9. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-494 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Vías de señalización Wnt	CAMK2D, CUL1, PPP2R2B, TBL1X, ROCK1, APC, PLCB1, CCND2, NFAT5, PRICKLE2
Vía de señalización TGF-beta Glioma	CUL1, PPP2R2B, ROCK1, INHBB, ACVR1C, BMPR2, PITX2 CAMK2D, IGF1R, CDK6, PIK3R3
Vía de señalización GnRH Melanoma	CAMK2D, ADCY7, PLA2G12B, PLCB1, ADCY6 IGF1R, CDK6, FGF7, PIK3R3
Leucemia Mieloide Crónica	CDK6, PTPN11, ACVR1C, PIK3R3
Cáncer colorectal	IGF1R, APC, ACVR1C, PIK3R3
Carcinoma de célula basal	GLI3, APC, HHIP
Vía de señalización Shh	GLI3, HHIP, CSNK1G1
Vía de señalización p53 Carcinoma renal	CDK6, CCND2, BBC3 PTPN11, RAP1B, PIK3R3
Vía de señalización VEGF	PLA2G12B, NFAT5, PIK3R3
Vía de señalización Jak-STAT Cáncer de páncreas	PTPN11, LIF, CCND2, IL12B, PIK3R3 CDK6, ACVR1C, PIK3R3
Vía de señalización MAPK	TAOK3, PPM1B, FGFR2, PLA2G12B, FGF7, RAP1B, ACVR1C
Cáncer pulmonar de células pequeñas	CKS1B, CDK6, PIK3R3
Cáncer de próstata	IGF1R, FGFR2, PIK3R3
Cáncer endometrial	APC, PIK3R3
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	CDK6, PIK3R3
Ciclo celular	CUL1, CDK6, CCND2
Vía de señalización células T	NFAT5, PIK3R3
Vía de señalización ErbB	CAMK2D, PIK3R3
Apoptosis	PIK3R3

Tabla 10. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-1322 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Glioma	CAMK2D, PRKCA
Vías de señalización ErbB	CAMK2D, PRKCA
Vías de señalización TGF-beta	SMAD7, BMPR2
Vía de señalización Wnt	CAMK2D, PRKCA
Cáncer pulmonar de células no pequeñas	PRKCA
Vía de señalización MAPK	PRKCA, CACNA2D1
Vía de señalización VEGF	PRKCA

Tabla 11. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-134 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Cáncer de páncreas	KRAS, RAD51
Leucemia mieloide crónica	KRAS, STAT5B
Vía de señalización ErbB	KRAS, STAT5B
Cáncer de tiroide	KRAS
Cáncer de vejiga	KRAS
Cáncer endometrial	KRAS
Carcinoma de célula basal	PTCH1
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	KRAS
Vía de señalización Shh	PTCH1
Leucemia mieloide aguda	KRAS
Vía de señalización células B	KRAS
Vía de señalización Jak-STAT	STAT5B
Glioma	KRAS
Vía de señalización p53	SERPINE1
Carcinoma renal	KRAS
Vía de señalización PPAR	ANGPTL4
Vía de señalización VEGF	KRAS
Vía de señalización MAPK	KRAS, BDNF
Melanoma	KRAS
Cáncer colorectal	KRAS
Cáncer de próstata	KRAS

Tabla 12. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-376c (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Cáncer renal	CREBBP, GRB2, ARNT
Cáncer de próstata	IGF1R, CREBBP, GRB2
Vía de señalización Notch	DLL1, CREBBP
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	RARB, GRB2
Leucemia mieloide aguda	GRB2, FLT3
Glioma	IGF1R, GRB2
Vía de señalización MAPK	MAP3K7IP2, CACNB2, SRF, GRB2
Cáncer colorectal	IGF1R, GRB2
Vía de señalización ErbB	HBEGF, GRB2
Vía de señalización Wnt	CREBBP, NFAT5
Vía de señalización TGF-beta	CREBBP
Vía de señalización Jak-STAT	CREBBP, GRB2
Cáncer pulmonar de células pequeñas	RARB
Leucemia mieloide crónica	GRB2
Cáncer endometrial	GRB2
Vía de señalización VEGF	NFAT5
Vía de señalización PPAR	ACSL1

Tabla 13. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-203 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Vías de señalización ErbB	PIK3CA, HBEGF, PRKCA, CBL, CRK, SRC, AKT2, PRKCB1, ABL1
Leucemia mieloide crónica	PIK3CA, E2F3, CBL, CRK, AKT2, ABL1, SMAD3
Glioma	PIK3CA, E2F3, PRKCA, PDGFRA, AKT2, PRKCB1
Cáncer colorectal	PIK3CA, BIRC5, PDGFRA, APPL1, APC, AKT2, SMAD3
Cáncer de pulmón de células pequeñas	PIK3CA, E2F3, ITGA2, COL4A4, AKT2, ITGAV, LAMC1
Cáncer de próstata	PDGFD, PIK3CA, E2F3, PDGFRA, CREB3, AKT2, SRD5A2
Vía de señalización VEGF	PIK3CA, PRKCA, VEGFA, SRC, AKT2, PRKCB1
Melanoma	PDGFD, PIK3CA, E2F3, PDGFRA, AKT2, FGF5
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	PIK3CA, E2F3, PRKCA, AKT2, PRKCB1
Cáncer de páncreas	PIK3CA, E2F3, PLD1, VEGFA, AKT2, SMAD3
Vía de señalización TGF-beta	CUL1, ID4, ACVR2A, ACVR2B, SP1, SMAD3
Carcinoma renal	PIK3CA, VEGFA, CRK, AKT2, RAP1A
Vía de señalización Wnt	CUL1, PRKCA, SFRP1, APC, NLK, PRKCB1, PRICKLE2, SMAD3
Vía de señalización MAPK	PRKCA, PDGFRA, MAP3K1, MAP3K13, DUSP5, CRK, AKT2, NLK, FGF5, RAP1A, PRKCB1
Vía de señalización Jak-STAT	PIK3CA, CNTFR, IL24, CBL, SOCS3, AKT2, IL15
Cáncer endometrial	PIK3CA, APC, AKT2
Carcinoma de células basales	GLI3, APC, PTCH1
Cáncer de tiroides	RET
Leucemia mieloide aguda	PIK3CA, AKT2
Vía de señalización Shh	GLI3, PTCH1
Vía de señalización p53	CCNG1, ATM
Vía de señalización PPAR	ACSL1, ACSL3
Cáncer de vejiga	E2F3, VEGFA

Tabla 14. Vías y neoplasias en las que participa hsa-miR-215 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Leucemia mieloide aguda	RUNX1, RUNX1T1
Próstata de cáncer	CREB5, IGF1
Vía de señalización Wnt	CTNNBIP1, NFAT5
Vía de señalización mTOR	IGF1
Glioma	IGF1
Vía de señalización p53	IGF1
Vía de señalización PPAR	FABP3
Vía de señalización VEGF	NFAT5
Melanoma	IGF1
Leucemia mieloide crónica	RUNX1
Vía de señalización ErbB	EREG
Vía de señalización TGF-beta	ACVR2B
Vía de señalización de células B	NFAT5

Tabla 15. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-202 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Vía de señalización p53	RRM2, STEAP3, TP53, THBS1, CCND2, PMAIP1, IGF1, CASP3, CCND1
Melanoma	IGF1R, HGF, RB1, TP53, FGF11, FGF5, IGF1, CCND1
Vía de señalización MAPK	MAP4K3, MAP4K4, DUSP4, TGFBR1, MAP3K7IP2, DUSP9, FASLG, CACNA1D, DUSP16, MAP3K3, TP53, FGF11, DUSP1, FGF5, ACVR1C, CASP3
Cáncer colorectal	TGFBR1, IGF1R, TP53, ACVR1C, FZD4, CASP3, CCND1
Vía de señalización TGF-beta	TGFBR1, ROCK1, ACVR2A, GDF6, THBS1, ACVR2B, ACVR1C
Leucemia mieloide crónica	TGFBR1, CBL, RB1, TP53, ACVR1C, CCND1
Vía de señalización Wnt	WNT2B, LRP6, ROCK1, VANGL2, TP53, CCND2, FZD4, SENP2, CCND1
Cáncer de hígado	RB1, TP53, THBS1, CCND1
Glioma	IGF1R, RB1, TP53, IGF1, CCND1
Cáncer de páncreas	TGFBR1, RB1, TP53, ACVR1C, CCND1
Carcinoma de células basales	WNT2B, TP53, GLI2, FZD4
Vía de señalización Notch	DTX2, NUMBL, DTX4
Cáncer de próstata	IGF1R, RB1, TP53, IGF1, CCND1
Vía de señalización PPAR	SCD, OLR1, ACSL6, PPARA
Vía de señalización mTOR	EIF4EBP1, PRKAA2, IGF1
Cáncer de tiroides	TP53, CCND1
Cáncer de pulmón de células pequeñas	RB1, TP53, CCND1
Carcinoma renal	HGF
Ciclo celular	SMC1A, RB1, TP53, CCND2, CCND1
Vía de señalización de células T	CBL, VAV3, LCK, IL10
Vía de señalización de células B	VAV3
Vía de señalización Jak-STAT	CBL, IL13, GHR, IL10, CCND2, CCND1
Vía de señalización Shh	WNT2B, GLI2
Cáncer endometrial	TP53, CCND1
Apoptosis	FASLG, TP53, CASP3

Tabla 16. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-30b (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Glioma	CAMK2D, E2F3, IGF1R, KRAS, SOS1, PIK3R2, IGF1, PLCG1, PDGFRB, PIK3CD
Vía de señalización ErbB	CAMK2D, NCK2, KRAS, CRKL, SOS1, ABL2, PIK3R2, CBLB, ABL1, PLCG1, PIK3CD
Cáncer de próstata	CCNE2, BCL2, E2F3, IGF1R, KRAS, SOS1, PIK3R2, IGF1, AR, PDGFRB, PIK3CD
Cáncer colorectal	BCL2, RALGDS, IGF1R, KRAS, SMAD2, SOS1, PIK3R2, PDGFRB, CASP3, PIK3CD
Leucemia mieloide crónica	E2F3, KRAS, CRKL, SOS1, RUNX1, PIK3R2, CBLB, ABL1, PIK3CD
Vía de señalización mTOR	RPS6KA2, TSC1, PIK3R2, DDIT4, IGF1, PIK3CD
Cáncer de páncreas	RALGDS, E2F3, ARHGEF6, KRAS, SMAD2, PIK3R2, JAK1, PIK3CD
Vía de señalización Jak-STAT	SOCS1, LIFR, LEPR, SOS1, IFNAR2, IL2RA, SOCS3, PIK3R2, CBLB, JAK1, IL28RA, CLCF1, PIK3CD
Apoptosis	BCL2, IL1A, PPP3CA, PIK3R2, PRKAR1A, CASP3, PIK3CD, PPP3CB
Carcinoma renal	KRAS, CRKL, SOS1, CUL2, RAP1B, PIK3R2, PIK3CD
Vía de señalización MAPK	MAP4K4, RPS6KA2, KRAS, CACNB2, BDNF, CRKL, TAOK1, IL1A, SOS1, RAP1B, PPP3CA, NLK, NF1, RASA1, MAP3K12, MAP3K5, PDGFRB, CASP3, PPP3CB
Vía de señalización VEGF	KRAS, PPP3CA, PIK3R2, NFAT5, PLCG1, PIK3CD, PPP3CB
Melanoma	E2F3, IGF1R, KRAS, PIK3R2, IGF1, PDGFRB, PIK3CD
Ciclo celular	CCNE2, DBF4, E2F3, SMAD2, YWHAZ, ORC2L, CDC7, TFDP1, ABL1
Cáncer endometrial	FOXO3, KRAS, SOS1, PIK3R2, PIK3CD
Cáncer pulmonar de células no pequeñas	CCNE2, RARB, BCL2, E2F3, ITGA6, PIK3R2, PIK3CD
Vía de señalización Notch	JAG2
Vía de señalización Wnt	CAMK2D, LRP6, TBL1X, SMAD2, VANGL1, PPP3CA, PRICKLE1, NLK, NFAT5, PPP3CB
Vía de señalización Shh	RAB23, CSNK1G1, GLI2
Vía de señalización TGF-beta	SMAD2, ACVR1, THBS2, SMAD1, TFDP1
Vía de señalización p53	CCNE2, SERPINE1, IGF1, CASP3
Cáncer de tiroides	KRAS, CCDC6
Cáncer de vejiga	E2F3, KRAS

Tabla 17. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-30d (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Glioma	CAMK2D, E2F3, IGF1R, KRAS, SOS1, PIK3R2, IGF1, PLCG1, PDGFRB, PIK3CD
Vía de señalización ErbB	CAMK2D, NCK2, KRAS, CRKL, SOS1, ABL2, PIK3R2, CBLB, ABL1, PLCG1, PIK3CD
Cáncer pulmonar de células no pequeñas	RARB, E2F3, FOXO3, KRAS, SOS1, PIK3R2, PLCG1, PIK3CD
Cáncer de próstata	CCNE2, BCL2, E2F3, IGF1R, KRAS, SOS1, PIK3R2, IGF1, AR, PDGFRB, PIK3CD
Cáncer colorectal	BCL2, RALGDS, IGF1R, KRAS, SMAD2, SOS1, PIK3R2, PDGFRB, CASP3, PIK3CD
Vía de señalización mTOR	RPS6KA2, TSC1, PIK3R2, DDIT4, IGF1, PIK3CD
Cáncer de páncreas	RALGDS, E2F3, ARHGEF6, KRAS, SMAD2, PIK3R2, JAK1, PIK3CD
Vía de señalización Jak-STAT	SOCS1, LIFR, LEPR, SOS1, IFNAR2, IL2RA, SOCS3, PIK3R2, CBLB, JAK1, IL28RA, CLCF1, PIK3CD
Apoptosis	BCL2, IL1A, PPP3CA, PIK3R2, PRKAR1A, CASP3, PIK3CD, PPP3CB
Carcinoma renal	KRAS, CRKL, SOS1, CUL2, RAP1B, PIK3R2, PIK3CD
Vía de señalización MAPK	MAP4K4, RPS6KA2, KRAS, CACNB2, BDNF, CRKL, TAOK1, IL1A, SOS1, RAP1B, PPP3CA, NLK, NF1, RASA1, MAP3K12, MAP3K5, PDGFRB, CASP3, PPP3CB
Vía de señalización VEGF	KRAS, PPP3CA, PIK3R2, NFAT5, PLCG1, PIK3CD, PPP3CB
Vía de señalización PPAR	ME1
Melanoma	E2F3, IGF1R, KRAS, PIK3R2, IGF1, PDGFRB, PIK3CD
Carcinoma de célula basal	GLI2
Ciclo celular	CCNE2, DBF4, E2F3, SMAD2, YWHAZ, ORC2L, CDC7, TFDP1, ABL1
Cáncer endometrial	FOXO3, KRAS, SOS1, PIK3R2, PIK3CD
Cáncer pulmonar de células pequeñas	CCNE2, RARB, BCL2, E2F3, ITGA6, PIK3R2, PIK3CD
Leucemia mieloide aguda	KRAS, SOS1, RUNX1, PIK3R2, PIK3CD
Vía de señalización Notch	JAG2
Vía de señalización Wnt	CAMK2D, LRP6, TBL1X, SMAD2, VANGL1, PPP3CA, PRICKLE1, NLK, NFAT5, PPP3CB
Vía de señalización Shh	RAB23, CSNK1G1, GLI2
Vía de señalización p53	CCNE2, SERPINE1, IGF1, CASP3
Cáncer de tiroides	KRAS, CCDC6
Cáncer de vejiga	E2F3, KRAS

Tabla 18. Vías, procesos celulares y neoplasias en las que participa hsa-miR-132 (Región hipometilada)

Vías Blanco	Genes
Cáncer de próstata	CDKN1A, RB1, SOS1, FOXO1, MAPK1, MAPK3, CREB5, TCF7L2, TCF7L1, EP300
Vía de señalización TGF-beta	E2F5, SMAD2, SMAD5, ACVR1, MAPK1, MAPK3, ACVR2B, GDF5, EP300, PPP2CB
Cáncer endometrial	FOXO3, SOS1, MAPK1, MAPK3, TCF7L2, TCF7L1
Cáncer de tiroide	MAPK1, MAPK3, TCF7L2, TCF7L1
Carcinoma renal	SLC2A1, SOS1, CRK, MAPK1, MAPK3, EP300
Vía de señalización Wnt	SMAD2, FBXW11, TCF7L2, PPP3CA, NFAT5, TCF7L1, PRICKLE2, EP300, PPP2CB
Leucemia mieloide crónica	CDKN1A, RB1, SOS1, CRK, MAPK1, MAPK3
Cáncer pulmonar de células pequeñas	FOXO3, RB1, SOS1, MAPK1, MAPK3
Leucemia mieloide aguda	SOS1, MAPK1, MAPK3, TCF7L2, TCF7L1
Cáncer colorectal	SMAD2, SOS1, MAPK1, MAPK3, TCF7L2, TCF7L1
Vía de señalización ErbB	HBEGF, CDKN1A, SOS1, CRK, MAPK1, MAPK3
Glioma	CDKN1A, RB1, SOS1, MAPK1, MAPK3
Cáncer de hígado	CDKN1A, RB1, MAPK1, MAPK3
Vía de señalización MAPK	GNA12, DUSP9, MAPT, SOS1, MAP3K3, CRK, MAPK1, FGF7, MAPK3, PPP3CA, RASA1
Melanoma	CDKN1A, RB1, MAPK1, FGF7, MAPK3
Carcinoma de células basales	PTCH1, TCF7L2, HHIP, TCF7L1
Vía de señalización VEGF	MAPK1, MAPK3, PPP3CA, NFAT5
Cáncer de páncreas	SMAD2, RB1, MAPK1, MAPK3
Ciclo celular	CDKN1A, SMAD2, RB1, YWHAG, EP300
Vía de señalización Shh	FBXW11, PTCH1, HHIP
Vía de señalización mTOR	MAPK1, MAPK3
Vía de señalización Jak-STAT	SOS1, SPRY1, SPRED1, EP300
Vía de señalización p53	CDKN1A, APAF1
Vía de señalización PPAR	FABP2
Vía de señalización Notch	EP300
Apoptosis	APAF1, PPP3CA

Anexo IV

Se muestran genes encontrados en las alteraciones cromosómicas o con patrón de metilación modificado. Además estos genes fueron reportados como regulados por los miRNAs antes mencionados.

Tabla 1. Alteraciones asociadas a TP53 en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Leucemia mieloide crónica	BCR-ABL, EVI1, AML1, p16/INK4A, p53, RB1
Leucemia linfocítica crónica	Bcl-2, p53, ATM, Fas
Mesotelio pleural maligno	p53, p16/CDKN2A, p15/CDKN2B, NF2, PDGF-A, PDGF-B, IGF-1, IGF-R1
Cáncer de vejiga	H-ras, FGFR3, p16/INK4A, p53, RB1, EGFR, ERBB2, RASSF1, DAPK1
Melanoma maligno	BRAF, NRAS, CDK4, MITF, PTEN, p16/INK4A, p53
Carcinoma de célula basal	SHH, SMO, p53, PTCH
Carcinoma de célula escamosa	p53, p16/INK4A, H-ras, K-ras
Kaposi's sarcoma	Bcl-2, c-MYC, c-INT, K-ras, p53

Tabla 2. Alteraciones asociadas a CCND1 en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Mieloma múltiple	CCND1-IgH, CCND3-IgH, IgH-FGFR3, IgH-MMSET, IgH-MAF, N-ras, K-ras, c-MYC, p53
Cáncer de mama	BRCA1, BRCA2, p53, RB1, PTEN, c-MYC, ERBB2, CDH1, CCND1

Tabla 3. Alteraciones asociadas a KRAS en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Carcinoma de célula escamosa	p53, p16/INK4A, H-ras, K-ras
Cáncer de vesícula	p53, p16/INK4A, K-ras, APC

Tabla 4. Alteraciones asociadas a JUN en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Linfoma lipoplasmático	Pax5-IgH
Cáncer de vesícula	p53, p16/INK4A, K-ras, APC

Tabla 5. Alteraciones asociadas a AKT2 en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Cáncer de ovario	BRCA1, BRCA2, MSH2, MLH1, ERBB2, K-ras, AKT2, PIK3CA, c-MYC, p53

Tabla 6. Alteraciones asociadas a APC en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Cáncer de esófago	EGFR, p53, p16/INK4A, RB1, iNOS, COX2, APC, Cyclin D1, FAS
Cáncer gástrico	K-ras, c-met, K-sam, ERBB2, EGFR, EGF, TGF-alpha, VEGF, p53, APC, DCC, E-Cadherin, beta-Catenin, CD44, Bcl-2, Cyclin E
Cáncer Colorectal	beta-Catenin, K-ras, APC, DCC, TGF-betaRII, Smad2, Smad4, BAX, p53, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6

Tabla 7. Alteraciones asociadas a CDK6 en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Cáncer de pulmón de células no pequeñas	K-ras, RAR-beta, FHIT, RASSF1, p16/INK4A, p53, EML4-ALK, TFG-ALK, SLC34A2-ROS1

Tabla 8. Alteraciones asociadas a RAR-BETA en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Cáncer pulmonar de células pequeñas	c-MYC, RAR-beta, FHIT, p53, RB1, PTEN, Bcl-2
Cáncer pulmonar de células no pequeñas	K-ras, RAR-beta, FHIT, RASSF1, p16/INK4A, p53, EML4-ALK, TFG-ALK, SLC34A2-ROS1
Carcinoma hepatocelular	PTEN, H-ras, K-ras, N-ras, AXIN1, beta-Catenin, p53, p73, RB1, p16/INK4A, E-Cadherin, IGF2R

Tabla 9. Alteraciones asociadas a SMAD 2 en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Cáncer Colorectal	beta-Catenin, K-ras, APC, DCC, TGF-betaRII, Smad2, Smad4, BAX, p53, MLH1, MSH2, MSH3, MSH6

Tabla 10. Alteraciones asociadas a RB1 en varios tipos de neoplasias

Nombre	Genes
Leucemia mieloide crónica	BCR-ABL, EVI1, AML1, p16/INK4A, p53, RB1
Cáncer pulmonar de células pequeñas	c-MYC, RAR-beta, FHIT, p53, RB1, PTEN, Bcl-2
Cáncer de esófago	EGFR, p53, p16/INK4A, RB1, iNOS, COX2, APC, Cyclin D1, FAS
Cáncer de vejiga	H-ras, FGFR3, p16/INK4A, p53, RB1, EGFR, ERBB2, RASSF1, DAPK1
Cáncer de mama	BRCA1, BRCA2, p53, RB1, PTEN, c-MYC, ERBB2, CDH1, CCND1
Osteosarcoma	MDM2, SAS, p53, RB1, p16/INK4A, CDKN2B, c-MYC
Glioma	EGFR, MDM2, PTEN, p16/INK4A, PDGF-A, PDGF-B, PDGFR-alpha, PDGFR-beta, CDK4, p53, RB1
Carcinoma hepatocelular	PTEN, H-ras, K-ras, N-ras, AXIN1, beta-Catenin, p53, p73, RB1, p16/INK4A, E-Cadherin, IGF2R