



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

BIOLOGÍA

**EFFECTO DE DIVERSOS AGENTES
INDUCTORES DE DIFERENCIACIÓN EN
GLIOMA MALIGNO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIOLOGA

P R E S E N T A:

IANNEL REYES VIDAL

DIRECTORA DE TESIS

DRA. ROXANA MAGAÑA MALDONADO



LOS REYES IZTACALA, TLANEPANTLA, ESTADO DE MÉXICO, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía “Manuel Velasco Suárez”. Bajo la dirección de la Dra. Roxana Magaña Maldonado y la asesoría del Dr. Julio E. Sotelo Morales.



Instituto Nacional de
Neurología y Neurocirugía
Manuel Velasco Suárez





UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA
 SECRETARÍA GENERAL ACADÉMICA
 CARRERA DE BIOLOGÍA

No. reg.: BIO/071/17

Los Reyes Iztacala a 31 de octubre de 2017

DRA. PATRICIA D. DAVILA ARANDA
DIRECTORA DE LA FES IZTACALA
Presente

Atención: Lic. Eloy González Fernández
 Jefe de la Unidad de Administración Escolar

Los abajo firmantes, miembros de la Comisión Dictaminadora del trabajo de: **TESIS**
 Titulado "EFECTO DE DIVERSOS AGENTES INDUCTORES DE DIFERENCIACIÓN EN GLIOMA MALIGNO"

Que presenta el (la) pasante de Biología **IANNEL REYES VIDAL** número de cuenta: **30814230-5**
 Para obtener el título de Biólogo.

Informan que después de haber revisado cuidadosamente el trabajo, consideramos que reúne las características de calidad académica que se requieren para aspirar a la obtención del título citado, razón por la cual otorgamos nuestros **votos aprobatorios** para la presentación del examen profesional correspondiente.

GRADO	NOMBRE	FIRMA	CARGO
DR.	JULIO EVERARDO SOTELO MORALES		Presidente
DRA.	MARTHA OFELIA SALCEDO ALVAREZ		Vocal
DRA.	ROXANA MAGAÑA MALDONADO		Secretario
DRA.	ANA MARIA GARCIA BORES		Suplente
MTRA.	MARIA DEL ROCIO VARGAS MARTINEZ		Suplente

Con base en lo anterior solicito su autorización para que los profesores que otorgan los votos aprobatorios funjan como sinodales del examen profesional en el cargo anotado, y a la Administración Escolar otorgue la fecha para la Réplica Oral del trabajo presentado.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

JEFA DE CARRERA

DRA. CLAUDIA TZASNA HERNANDEZ DELGADO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 FES IZTACALA



JEFATURA DE BIOLOGIA

Dra. Patricia D. Davila Aranda
 Directora de FES Iztacala
 Vo. Bo.

Edificio de gobierno, primer piso
 Tel y Fax: 5623-1147 • 5623-1149
 Av. de los Barrios N° 1, Los Reyes Iztacala,
 Tlaxiaco, Tlax., P. 54090, Estado de México, México.

UNAM
 La Universidad de la Nación



“Solo debes creer”

Alberto Reyes Vidal

1995-2009



*Para mi hermano Alberto y mi
abuelo Manuel quienes me han
inspirado a seguir luchando*



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Estudios Superiores Iztacala por permitirme formarme como bióloga dentro de sus instalaciones.

Al comité integrado por:

Dra. Martha Ofelia Salcedo Álvarez.

Dra. Ana María García-Bores

M. en. C. Rocío Vargas Martínez

Al Instituto Nacional de Neurología y al laboratorio de Neuroinmunología, por permitirme realizar este proyecto de tesis.

Agradezco en especial al Dr. Julio Sotelo por permitirme trabajar en el laboratorio de Neuroinmunología, además de brindarme su apoyo y consejos académicos para realizar este proyecto.

Dra. Roxana, no solo por ser mi tutora, sino por ser una amiga que me ha formado y guiado paso a paso durante el desarrollo de este trabajo, por tenerme paciencia en mis fracasos y enseñarme a que siempre hay que dar lo mejor. De igual forma agradezco a la pequeña Aurora por hacer que terminara en tiempo récord el proyecto.

Dra. Lupita, gracias por regalarme momentos de risa, bromas, consejos, por estar ahí en los momentos en que las dos queríamos renunciar a todo y dedicarnos a vender medias para conseguir anticuerpos.

Dra. Paty, gracias por todos los tips de los cuales he aprendido, jamás olvidare aquel día que entre en pánico por el filtro que se desprendió y que me ayudo a cambiar, y sobre todo por animarme y dibujarme una sonrisa cada que me desanimaba en el laboratorio.

Dra. Espe, antes que nada, le envié un enorme beso como esos que le doy en el laboratorio, que le puedo decir la quiero mucho y gracias por sus consejos y uno que otro regaño, los cuales me han servido como no tiene idea, gracias por su cariño y apoyo incondicional.

Fernando y Miguelito por dibujarme múltiples sonrisas dentro del laboratorio, lamento todo el desorden que fui dejando en este camino.

A los panes, cariños en especial a Geo, Karen y Alfredo por brindarme su amistad todo este tiempo.

Dany, muchas gracias por todos tus consejos que mejoraron esta tesis y por regalarme siempre de tu tiempo para ayudarme.

Diana y Beto, la amistad de ustedes ha significado mucho para mí, gracias por enseñarme que los verdaderos amigos si existen, los amo y siempre estaré para ustedes.

DEDICATORIAS

Cuando somos niños bromeamos acerca de lo que queremos ser de grandes, en esa etapa todo es un juego, nuestros deseos se basan en querer ser un astronauta, una bailarina, ser doctora, sin embargo al transcurrir los años comenzamos a ver que no solo se trata de un juego, y empezamos a tomar todo con mayor seriedad, es ahí donde las pequeñas risas que nos invadían de niños, se transforman en esfuerzos constantes: obtener un lugar en la preparatoria, desvelarse para terminar los trabajos, sobrevivir al maestro más temido de la escuela; pero cada esfuerzo tiene las recompensas que queremos, convirtiendo las ojeras en sonrisas, pero a veces, los resultados obtenidos no son lo que esperábamos en realidad, y es ahí donde siempre he creído que nosotros podemos diseñar nuestro futuro, pero con cada obstáculo que nos pone la vida nuestro diseño va cambiando, y al final la construcción que queremos no es nada de lo que imaginábamos. Las personas que han llegado a mi vida saben que nunca imagine ser bióloga, de hecho, si me lo preguntan era pésima en esta materia, y aunque hice hasta lo imposible, siempre terminaba en biología y por más que diseñe mi futuro, la vida se dedicaba a cambiar el plano de mi construcción, provocando cierto desagrado en como quedaba, pero al final seré sincera me he enamorado de cómo quedo mi construcción, de verdad la miro hoy y estoy orgullosa de decir que he estudiado la carrera más hermosa.

Sin mis padres todo esto jamás hubiera sido posible, en cada derrota que he tenido a lo largo de mi vida ellos han estado ahí, a veces no de la forma que espere, pero que hubiera sido de mí, sin mi *madre*, aunque peleamos como toda madre e hija, sus consejos ha sido un motivo más por el cual debo seguir luchando, gracias madre, por cada lagrima que me limpiaste, por darme el ejemplo que a pesar que todo esté en contra de nosotros debemos luchar, madre este primer triunfo es para ti. *Padre* desnaturalizado, gracias por cada útil consejo que me das, pero, así como haz regañado cada que quiero renunciar a algo, yo como tu hija solo te pido que no lo hagas tú también, y sí, es cierto lo que dices "*Las cosas pasan por algo*" y hoy me siento feliz de haber terminado esta primera etapa y sobre todo me siento bendecida de tenerlos como padres a los dos. Les prometo que les pagare todo lo que ustedes siempre han hecho por mí y por Alberto.

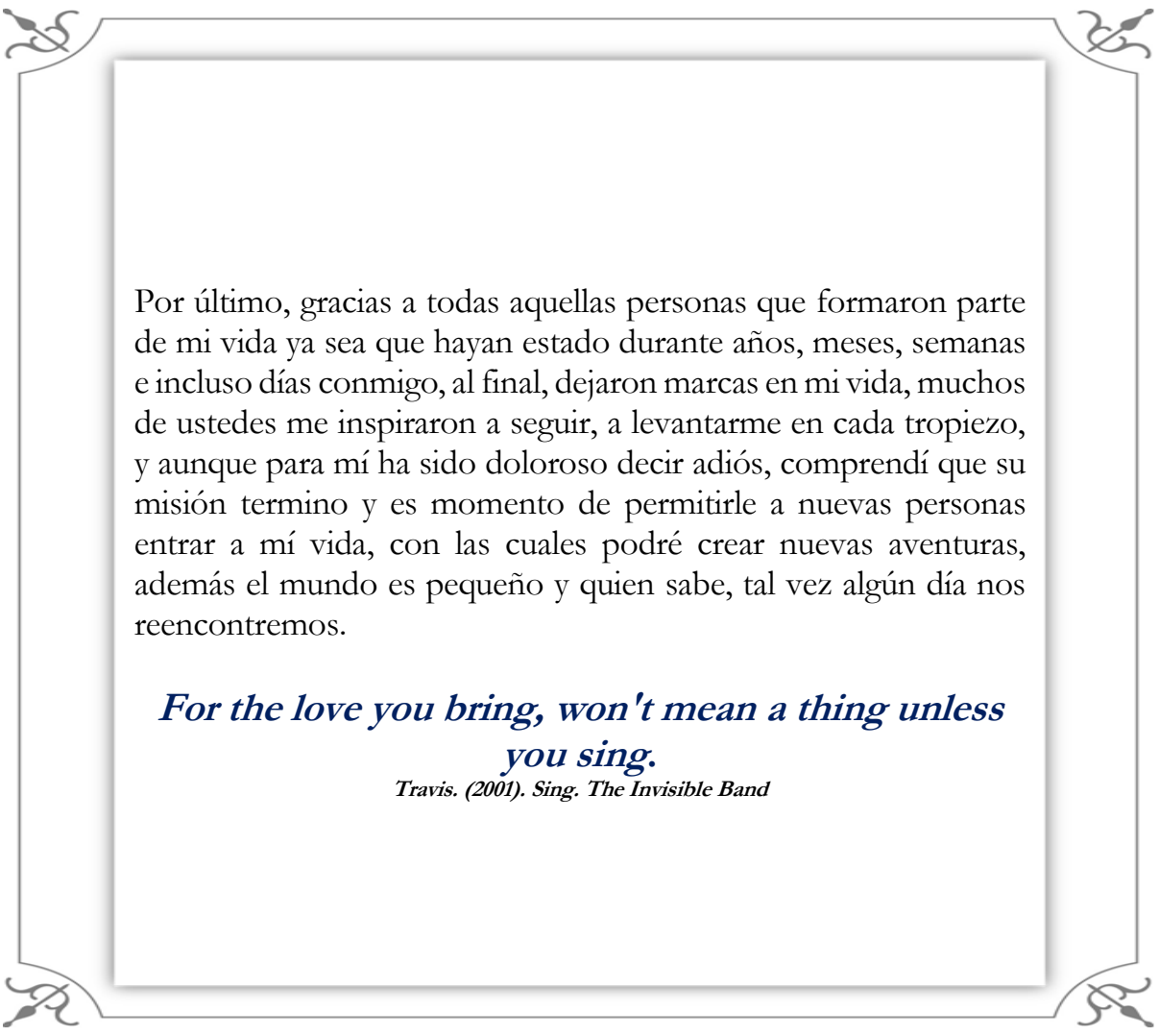
Mario Alvarado, me llevaría toda la tesis para decirte lo agradecida que estoy contigo, gracias por ser aquel ángel que siempre ha estado con mi familia, jamás podré pagarte todo lo que has hecho por nosotros desde que nos conocimos, gracias por adoptarme como ahijada, por escucharme cada que necesito desahogarme, por cuidarme y preocuparte por mí, mil gracias por todo, gracias por darle paz a mi vida.

Eduardo, nuestra vida siempre está llena de sorpresas, a veces tenemos todo lo que hemos deseado, pero otras ocasiones todo se desvanece con un solo respiro, quisiera que mi dedicatoria fuera similar a la que escribí cuando inicie esta aventura en el INNN, tal vez no tenía ni la introducción, y en más ni siquiera sabía que cambiaría de tutora, sin embargo, yo siempre supe que este trabajo sería dedicado a la persona que siempre estuvo en cada momento a mi lado, aquella persona con la que podía reír y llorar al mismo tiempo. Pero la vida es tan cambiante y si algo aprendí es que jamás vuelve a ser igual, lo único que puedo hacer es darte las gracias por esperarme mil horas a que saliera del INNN, por haber compartido conmigo mis victorias y fracasos, además de haberme dado la mano para levantarme en cada fracaso. Te deseo lo mejor y espero que encuentres lo que siempre has deseado.

Javier, mi eterno amigo, creo de los pocos de los que tengo y aunque sientas que no has hecho nada por mí, temo decirte que durante 11 años has soportado mis llantos, mis desilusiones, mis fracasos, mis malos chistes, mis risas, mis victorias quien más podría conocerme como tú, hace unos años me diste uno de los mejores consejos "*No te aferres al pasado, tal como eras antes, uno nunca podrá ser como era, sin embargo, tenemos dos opciones o nos volvemos mejores personas o nos volvemos peores*", desde entonces solo intento ser mejor y a pesar que tenemos poca comunicación recuerda que ocupas un enorme lugar en mi corazón, y gracias por comprender que, aunque muchas veces no pueda escribirte siempre serás mi amigo.

Arelí, lo logramos amiga, a pesar de todo y contra todo hemos terminado *¡Por fin somos libres!*, parece como si fuera ayer cuando perdí mi bota en el estanque y tú no querías rescatarnos a Luna y a mí con la red de cuchara... Qué tiempos aquellos, no fue fácil terminar esto, pero me alegro haber tenido una amiga como tú para enfrentar cada reto, y al final, las dos nos dimos cuenta que conforme uno se acerca a la meta son pocos los verdaderos amigos que se quedan con nosotros al terminar esta cruel y horrible batalla. *¡Te quiero are!*

Fabian, puedes creerlo termine la carrera, a pesar que hice hasta lo imposible para cambiarme, siempre serás mi mejor amigo, con todo y tu odio y mala vibra que me tienes, ojalá ya dejes de mentir y aceptes que te estrellaste a propósito contra el vidrio en Veracruz para que no fuera la única torpe, gracias por cuidarme la espalda durante la carrera, y aunque también te cueste aceptar te preocupabas por mí y eso te lo agradezco, gracias por tu sarcasmo. *¡Te quiero!*



Por último, gracias a todas aquellas personas que formaron parte de mi vida ya sea que hayan estado durante años, meses, semanas e incluso días conmigo, al final, dejaron marcas en mi vida, muchos de ustedes me inspiraron a seguir, a levantarme en cada tropiezo, y aunque para mí ha sido doloroso decir adiós, comprendí que su misión terminó y es momento de permitirle a nuevas personas entrar a mi vida, con las cuales podré crear nuevas aventuras, además el mundo es pequeño y quien sabe, tal vez algún día nos reencontremos.

***For the love you bring, won't mean a thing unless
you sing.***

Travis. (2001). Sing. The Invisible Band

INDICE

Capítulo I: Sistema Nervioso	1
Organogénesis del tejido nervioso.....	1
Diferenciación celular del tejido nervioso.....	2
Células nerviosas	4
Células gliales	4
Capítulo II: Cáncer.....	6
Aspectos generales	6
Aspectos moleculares	7
Capítulo III: Gliomas	9
Epidemiología.....	9
Presentación clínica y diagnóstico	10
Clasificación	10
Células troncales carcinogénicas en GBM.....	13
Capítulo IV: Modelos Experimentales.....	14
Nitrosoureas.....	14
Linaje Celular	15
Antecedentes	16
Justificación	22
Hipótesis	22
Objetivos.....	23
Metodología.....	24
<i>In vitro</i>	24
<i>In vivo</i>	27
Resultados	29
Discusión	41
Conclusión.....	44
Perspectivas	45
Literatura citada	46



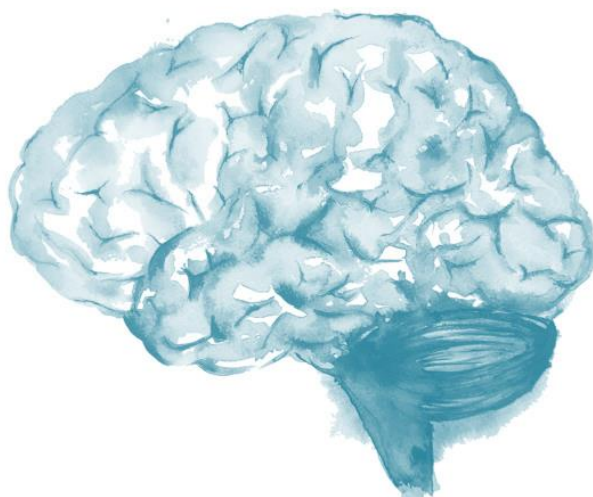
LISTA DE FIGURAS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. <i>Proceso de neurulación</i>	1
2. <i>Neurogénesis y gliogénesis adulta de la ZSV</i>	3
3. <i>Anatomía de las células neuronales</i>	4
4. <i>Interacciones Glía-neurona</i>	5
5. <i>Características planteadas por Hanahan & Weinberg en 2000</i>	7
6. <i>Características planteadas por Hanahan & Weinberg en 2011</i>	8
7. <i>Frecuencia (%) de tumores del SNC</i>	9
8. <i>Histología de astrocitomas</i>	12
9. <i>Ruta de señalización del retinol</i>	19
10. <i>Morfología celular tiempos cortos (Control-VPA)</i>	30
11. <i>Morfología celular tiempos cortos (ATRA-MCT)</i>	31
12. <i>Morfología celular tiempos largos(Control-VPA)</i>	32
13. <i>Morfología celular tiempos largos (ATRA-MCT)</i>	33
14. <i>Viabilidad celular por MTT</i>	34
15. <i>Ciclo celular determinado con IP en células de glioma de rata C6</i>	35
16. <i>Expresión del marcador de linaje troncal: NESTINA</i>	36
17. <i>Expresión del marcador de linaje neural: TUJ-1</i>	37
18. <i>Expresión del marcador de linaje astrocítico: GFAP</i>	38
19. <i>Análisis de supervivencia</i>	39
20. <i>Incidencia acumulada (%)</i>	40



LISTA DE CUADROS

<i>Número</i>	<i>Página</i>
1. <i>Etapas de diferenciación de las células neurales.....</i>	<i>2</i>
2. <i>Abordaje clínico para los gliomas.....</i>	<i>10</i>
3. <i>Grados Histológicos establecidos por la OMS (2017).....</i>	<i>11</i>
4. <i>Concentraciones para los tratamientos in vitro.....</i>	<i>24</i>
5. <i>Tratamiento in vivo.....</i>	<i>27</i>



LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AB</i>	Antibiótico/Antimicótico
<i>ATRA</i>	Ácido trans- retinoico (Siglas en inglés)
<i>BO</i>	Bulbo olfatorio
<i>CMR</i>	Corriente migratoria rostral
<i>CTC</i>	Células troncales carcinogénicas
<i>CTN</i>	Células troncales neurales
<i>DACH</i>	Desacetilasa de histonas
<i>DMSO</i>	Dimetil sulfóxido
<i>ENU</i>	N-etil-nitrosourea
<i>GBM</i>	Glioblastoma
<i>GD</i>	Giro dentado del hipocampo
<i>GFAP</i>	Proteína ácida fibrilar glial (Siglas en inglés)
<i>LCR</i>	Líquido cefalorraquídeo
<i>MCT</i>	Mezcla con teofilina
<i>MNU</i>	N-metil-nitrosourea
<i>MST</i>	Mezcla sin teofilina
<i>SFB</i>	Suero fetal bovino
<i>SN</i>	Sistema nervioso
<i>SNC</i>	Sistema nervioso central
<i>SNP</i>	Sistema nervioso periférico
<i>TUJ-1</i>	Proteína específica de neuronas clase III β -tubulina (Siglas en inglés)
<i>VEGF</i>	Factor de crecimiento endotelial vascular (Siglas en inglés)
<i>VPA</i>	Ácido valproico (Siglas en inglés)
<i>ZSV</i>	Zona subventricular
<i>ZV</i>	Zona ventricular



RESUMEN

Los gliomas forman un grupo heterogéneo de neoplasias del Sistema Nervioso Central (SNC) de origen glial, siendo el glioblastoma (GBM) el tumor de mayor malignidad. A pesar de la terapia multimodal actual que incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia, su progresión permanece desfavorable debido a que los pacientes presentan una supervivencia media pobre de alrededor de 14 meses. A la fecha, la terapéutica está enfocada en la eliminación de las células tumorales; sin embargo, ésta estrategia ha resultado ineficaz debido a diversos factores, entre ellos la heterogeneidad celular del GBM, que se encuentra constituido por células con distintos grados de diferenciación. Dada la importancia de buscar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta neoplasia, este trabajo contribuyó en apoyar el paradigma de transformación de las células tumorales hacia menores grados de malignidad, utilizando la combinación de diversos agentes que promueven la diferenciación celular. En este trabajo se observó que la combinación de: ácido trans-retinoico (ATRA), dimetil sulfoxido (DMSO), teofilina y ácido valproico (VPA), induce un efecto citotóxico a partir de 24 horas de tratamiento, lo cual correlaciona con el incremento en la fase SubG0 del ciclo celular. El tratamiento sin teofilina (DMSO, ATRA y VPA) a los 15 días incrementa la expresión del marcador proteína ácida fibrilar glial (GFAP) indicando que esta combinación induce la diferenciación de células de glioma C6 hacia un linaje astrocítico. La combinación de DMSO, ATRA, VPA y teofilina no incrementan la supervivencia de ratas Wistar expuestas con N-etil-nitrosourea (ENU), lo cual indica que no existen cambios en la incidencia de tumores del SNC.

Palabras Clave: *neoplasia, glioblastoma, heterogeneidad celular, ENU, C6, nestina, Tuj-1, GFAP*



SISTEMA NERVIOSO

El sistema nervioso (SN) es una red compleja de estructuras especializadas (encéfalo, tronco encefálico, médula espinal, y nervios), su función principal es la relación del individuo con el medio externo, a través de una organización coordinada recibe estímulos sensitivos, los traduce en impulsos nerviosos conducidos hacia centros nerviosos, en donde se integran piezas aferentes de información, que evalúan el estímulo recibido, e inician una respuesta eferente^{1,2}.

Organogénesis del tejido nervioso

Una vez que se forman las tres capas germinativas, ectodermo, mesodermo, y endodermo, en el blastocisto, comienzan los procesos celulares necesarios para la formación del SN^{2,3,4}. Específicamente, en el ectodermo dorsal, ocurre una invaginación inducida por la notocorda, una estructura que establece el eje cefálico-caudal^{2,3,4}. Esta invaginación ocasiona el engrosamiento del disco embrionario a nivel de la línea primitiva, dando origen a la placa neural, este proceso marca el inicio de la neurulación^{2,3}. Posteriormente, se constituye el surco neural donde los bordes laterales de la placa se elevan, provocando una fusión de los pliegues neurales que finalmente formará el tubo neural, la estructura primaria que da organización anatómica al SN^{2,3,4} (Figura 1).

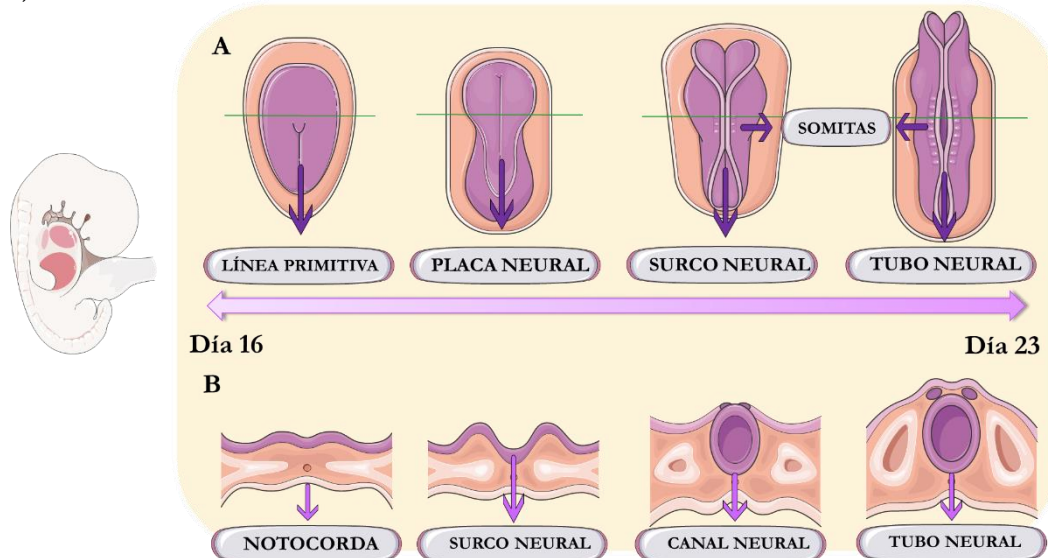


Figura 1. Proceso de neurulación. Corte dorsal (A) y transversal (B) que muestran el proceso de neurulación en humanos, donde a partir de la línea primitiva se formará la placa neural. Este proceso marca el inicio de transformaciones graduales que originan el tubo neural. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 de noviembre del 2017).

El tubo neural es una estructura histológicamente formada por neuroepitelio estratificado constituido de células mitóticamente activas, conocidas como células troncales neurales (CTN), una población celular definida por su capacidad de auto-renovación^{2,3,5,6}. Estas células darán origen a varios subtipos celulares a través de distintas etapas de diferenciación celular (Cuadro 1), constituyendo dos nichos importantes en el SNC: la zona ventricular (ZV) y subventricular (ZSV)^{3,5,6}. Las células que se desprenden tempranamente del tubo neural, dan origen a gran parte del sistema nervioso periférico(SNP)^{2,3}.

<i>Etapas</i>	<i>Función</i>
<i>I</i>	Inducción de la placa neural. Proliferación neuronal.
<i>II</i>	Migración neuronal. Diferenciación de neuroblastos.
<i>III</i>	Formación de conexiones interneuronales con sinapsis. Síntesis de neurotransmisores.
<i>IV</i>	Diferenciación celular. Formación de glioblastos seguida de diferenciación de astrogliá y oligodendrogliá. Recubrimiento de los axones por mielina.
<i>V</i>	Sinaptogénesis.
<i>VI</i>	Muerte neuronal. Eliminación de conexiones formadas inicialmente.

Cuadro 1. Etapas de diferenciación de las células neurales. Tomado y modificado de Lizana & Almagiá, 2012.

Diferenciación celular del tejido nervioso adulto

En la edad adulta la neurogénesis y gliogénesis ocurre en dos regiones del cerebro compuestas por CTN: el giro dentado del hipocampo (GD) y la región formada por la zona subventricular-corriente migratoria rostral–bulbo olfatorio principal (ZSV-CMR-BO)^{7,8,9,10}. Específicamente, en la ZSV las CTN migran a través de la CMR hasta el BO^{11,12}. En esta región las CTN son diferenciadas a través de diversos mecanismos celulares regulados por la modulación epigenética, factores de crecimiento y citocinas que dirigen la activación e inhibición de genes implicados en la diferenciación neuronal y glial^{13,14,15}. Estableciéndose de manera gradual subtipos celulares delimitados por funciones diferentes, de acuerdo a su localización, conectividad, morfología o la expresión de marcadores moleculares y neurotransmisores^{14,15} (Figura 2). Las células de tipo A son neuroblastos provenientes de células de tipo C, representan la población celular más abundante de la ZSV^{16,17}. Son identificados con la expresión del marcador específico β III-Tubulina (Tuj1), una proteína involucrada en procesos de diferenciación, asociada a los microtúbulos de neuronas inmaduras^{16,17}.

Las células de tipo B son considerados como precursores neuronales primarios, identificados por una proliferación activa y por exhibir propiedades morfológicas y neuroquímicas similares a los astrocitos, por lo que en base a su función se especifican en dos arquetipos, en células B1 o B2¹⁶. Las células B1 son CTN de tipo astrocítico que también pueden derivar de la glía radial, se particularizan por ser mitóticamente activas e intervenir en la regulación endógena de la neurogénesis¹⁶. Su identificación es confirmada con la expresión de diversos marcadores como la proteína GFAP localizada en filamentos intermedios, la cual conforma una red que proporciona soporte y fuerza a las células¹⁸.

Las células tipo C se generan a partir de la división asimétrica de las células tipo B, dan origen a células tipo A. Se ha observado que el factor de transcripción Olig2 expresado en las células tipo C dirige la diferenciación celular hacia el linaje oligodendroglial¹⁶. Finalmente, las células de tipo E son provenientes de la glía radial, modulan la dirección del flujo del líquido cefalorraquídeo (LCR) y liberan factores como nogina que regula la neurogénesis inhibiendo la señalización de la proteína morfogénica ósea-4 (BMP-4, por sus siglas en inglés)^{16,19}.

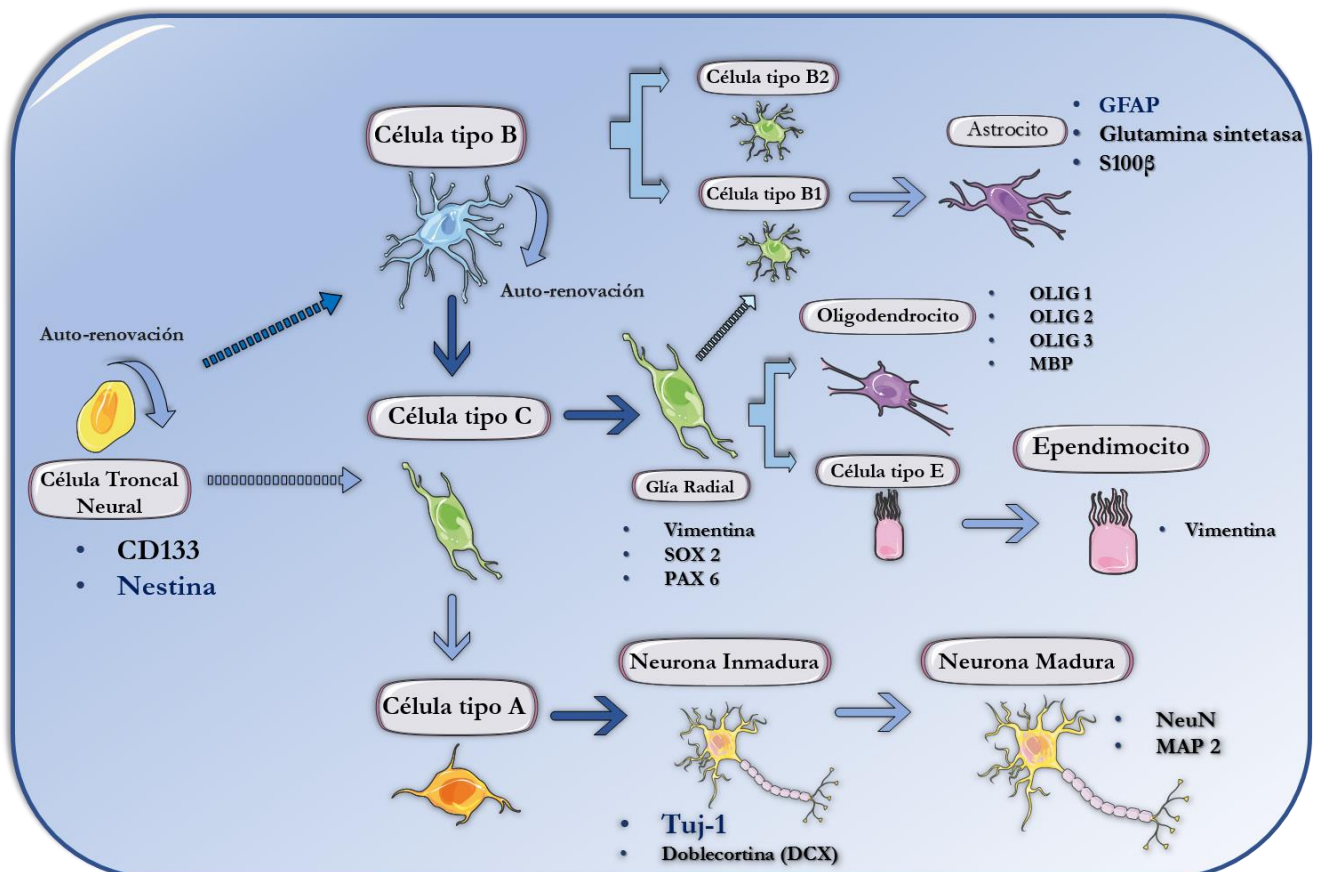


Figura 2. Neurogénesis y gliogénesis adulta de la ZSV. Las células troncales neurales (CTN) tienen potencial de auto-renovación, se clasifican en cuatro tipos celulares dependiendo de su morfología y marcadores moleculares expresados. Modificado de Capilla-González *et al.*, 2012. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 de noviembre del 2017).

Células nerviosas

Las células nerviosas son las unidades funcionales del sistema nervioso (Figura 3), especializadas en la recepción de estímulos y la conducción de impulsos nerviosos^{1,2}. Estas células se componen por: un cuerpo celular o soma que realiza la síntesis de proteínas, por prolongaciones ramificadas encargadas de recibir estímulos nerviosos, conocidas como dendritas y un axón especializado en conducir el impulso nervioso desde el cuerpo celular^{1,2}. Las neuronas de acuerdo a sus funciones se pueden dividir en tres tipos: sensoriales, motoras e interneuronas^{1,2}.

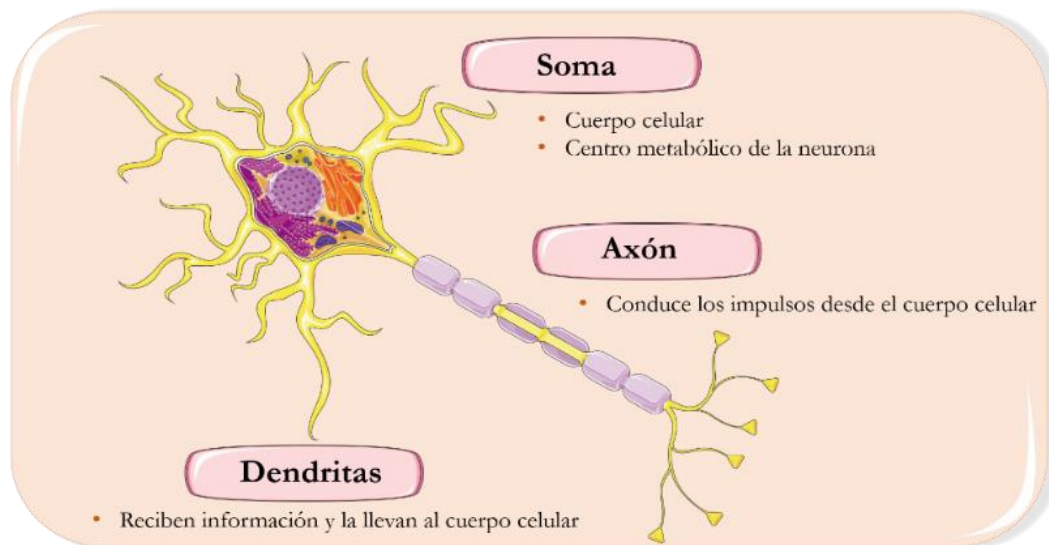


Figura 3. Anatomía de las células neuronales. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 de noviembre del 2017).

Células gliales

Las células gliales participan en el establecimiento de los contactos sinápticos necesarios para modular la propagación eléctrica entre las células neuronales^{20,21}. Estas células mantienen su capacidad replicativa, permitiendo realizar funciones de soporte neuronal y la formación de mielina en los axones^{20,21}. Las células gliales que conforman el tejido de sostén del SNC son clasificados en: astrocitos, oligodendrocitos, ependimocitos y células microgliales (Figura 4)²⁰.

El tipo de glía más abundante que compone el SNC son los astrocitos, los cuales dirigen funciones importantes, logrando adaptarse a regiones específicas del cerebro. Estas células participan en el mantenimiento del entorno químico de la señalización neuronal, captan la glucosa de la sangre y la convierten en ácido láctico que transportan a las neuronas conectadas en torno a los capilares sanguíneos del encéfalo, contribuyendo a crear la barrera hematoencefálica^{20,22,23}.

Los astrocitos de acuerdo a su localización se clasifican en dos grupos: a) astrocitos protoplásmicos, localizados en la materia gris del cerebro y que presentan una asociación con los cuerpos neuronales, así como en el proceso de sinapsis; b) astrocitos fibrosos, presentes en la materia blanca, asociados con los axones neuronales²⁰.

Los oligodendrocitos forman una envoltura compuesta de lípidos, llamada mielina, la cual está involucrada en la transmisión eléctrica de algunos axones^{20,24}. Los endoteliales intervienen en el revestimiento de los ventrículos del encéfalo y del conducto endimario de la médula espinal contribuyendo a la circulación del líquido cefaloraquídeo y la eliminación de los desechos neuronales²⁰. Finalmente, las células microgliales son células fagocíticas derivadas del mesodermo que participan en la eliminación de los restos celulares de superficies lesionadas²⁰.

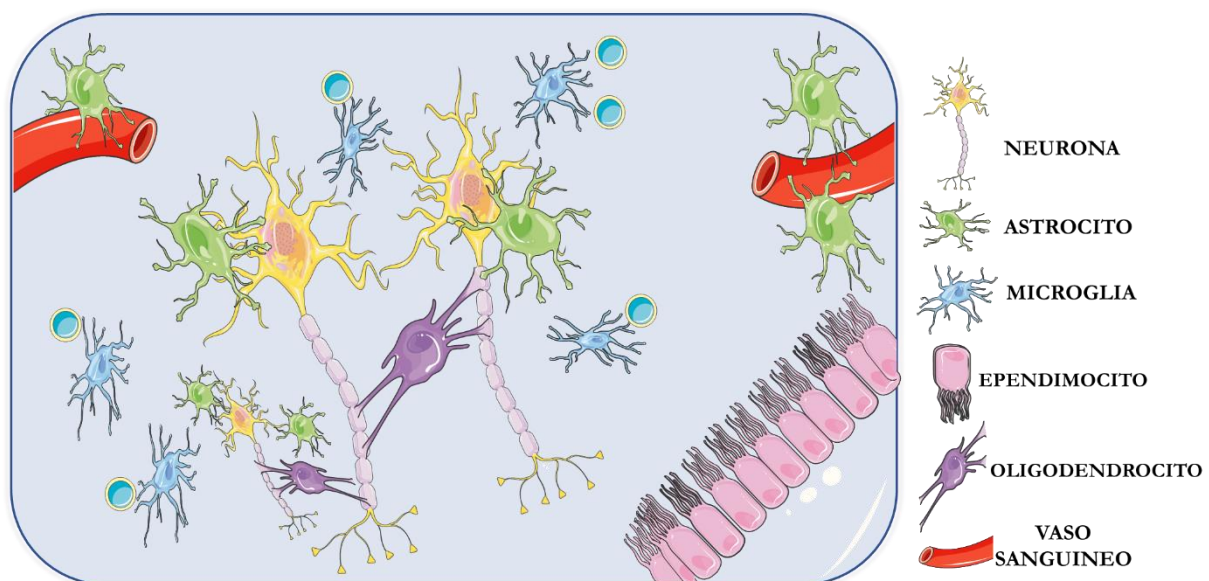


Figura 4. Interacciones Glía-neurona. La imagen muestra la integración funcional de células gliales con neuronas y los vasos sanguíneos circundantes. Los astrocitos recubren los vasos sanguíneos del sistema nervioso para facilitar y controlar la nutrición de las neuronas. Los oligodendrocitos recubren a las neuronas con mielina alrededor de los axones para acelerar la transmisión neuronal. Los endoteliales contribuyen a la circulación del líquido cefaloraquídeo. La microglía son células fagocíticas que eliminan restos celulares, manteniendo el cerebro bajo vigilancia por daño o infección. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 de noviembre del 2017).

CÁNCER

En tejidos sanos, las células se encuentran en un estado de homeostasis que permite el mantenimiento de su estructura, tamaño y grado de diferenciación^{25,26}. A partir de alteraciones en mecanismos bioquímicos, morfológicos e inmunológicos se desencadena un crecimiento descoordinado de células, formando una masa de tejido anormal denominada neoplasia^{25,26,27,28}.

Aspectos generales

El cáncer es un conjunto de enfermedades de origen multifactorial causadas por la acumulación de mutaciones que desencadena la proliferación descontrolada de las células^{27,28,29}. Bajo el concepto de cáncer se incluyen lesiones desarrolladas en distintos tejidos del organismo²⁸. Las neoplasias dependiendo del tejido del que proceden, pueden clasificarse en: carcinomas, cuando el origen de las células cancerígenas corresponde a tejidos epiteliales; sarcomas, formados a partir de la transformación maligna del tejido conectivo; linfomas, originados del tejido linfático y leucemias, procedentes de la alteración de precursores hematopoyéticos²⁸.

La malignidad de un tumor se define con base en el tipo de tejido afectado, su tasa proliferativa, grado de diferenciación, y organización celular²⁸. Los tumores presentan diferentes subpoblaciones de células con distintos niveles de diferenciación, algunas de ellas presentan un menor grado, lo que favorece su proliferación y crecimiento celular, además incrementa su capacidad de invasión través del sistema linfático o circulatorio hacia órganos y tejidos distantes^{28,30}. Un grado de diferenciación bajo, es indicativo de que las células tumorales todavía presentan características similares a las células de las que derivan, sin embargo, no existe una especialización o función celular, lo cual es una característica de una célula diferenciada normal^{28,30}.

Entre los factores etiológicos involucrados se encuentran: los factores de tipo endógeno que presentan alteraciones genéticas provocadas por oncogenes dominantes, entre ellos la familia de genes Ras (H-ras, K-ras, N-ras), genes supresores de tumor que participan en la regulación del ciclo celular, como: TP53 (Tumor Protein p53, por sus siglas en inglés) y RB (Retinoblastoma); y los factores exógenos como: el consumo de tabaco y/o alcohol, exposición a radiación y a determinadas sustancias (asbesto, arsénico, níquel, etc.) y determinados virus^{28,31,32,33}.

Aspectos moleculares

Hanahan & Weinberg en el 2000 (Figura 5), describieron que la complejidad y heterogeneidad de las células neoplásicas está regulada por características distintivas a nivel celular y molecular^{25,26}. Existe inestabilidad genética y mutaciones generadas, por diversos oncogenes y por la pérdida de la función de los genes supresores de tumor, así como alteraciones en los mecanismos que conllevan a la muerte celular a través de la expresión e inhibición de genes pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia de Bcl-2^{25,26}.

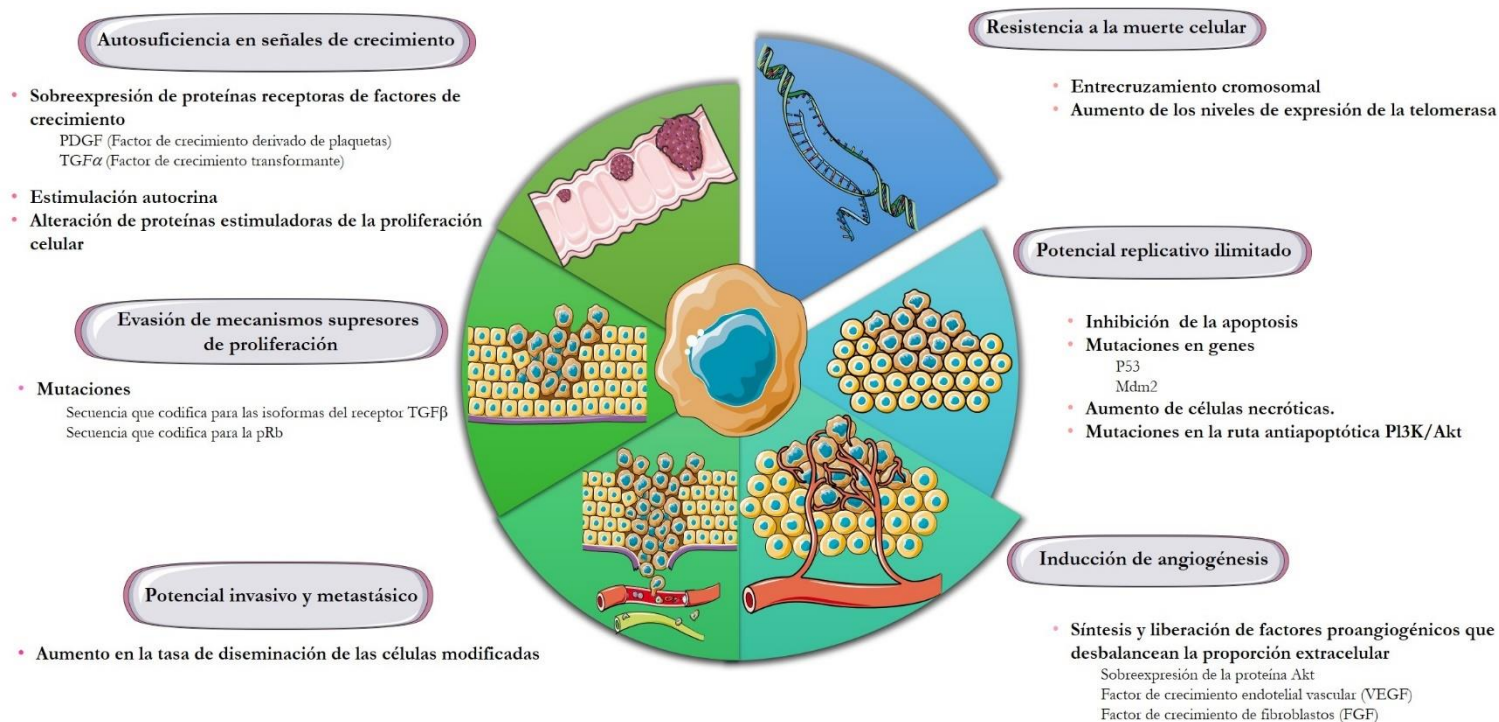


Figura 5. Características planteadas por Hanahan & Weinberg. Estas características consideran el funcionamiento de grupos de proteínas permitiendo que las células mutadas adquieran funciones, tales como: 1. Autosuficiencia en señales de crecimiento; 2. Potencial replicativo ilimitado; 3. Resistencia a la muerte celular; 4. Inducción de angiogénesis; 5. Potencial invasivo y metastásico; 6. Evasión de mecanismos supresores de proliferación. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 noviembre del 2017).

Estos autores en 2011 (Figura 6) describen nuevas características involucradas con interacciones del microambiente tisular²⁵. Afirman que a través de procesos continuos se generan cambios bioquímicos, genómicos, fisiológicos e inmunológicos que alteran mecanismos celulares necesarios para el control de procesos de proliferación y diferenciación celular^{25,26}.

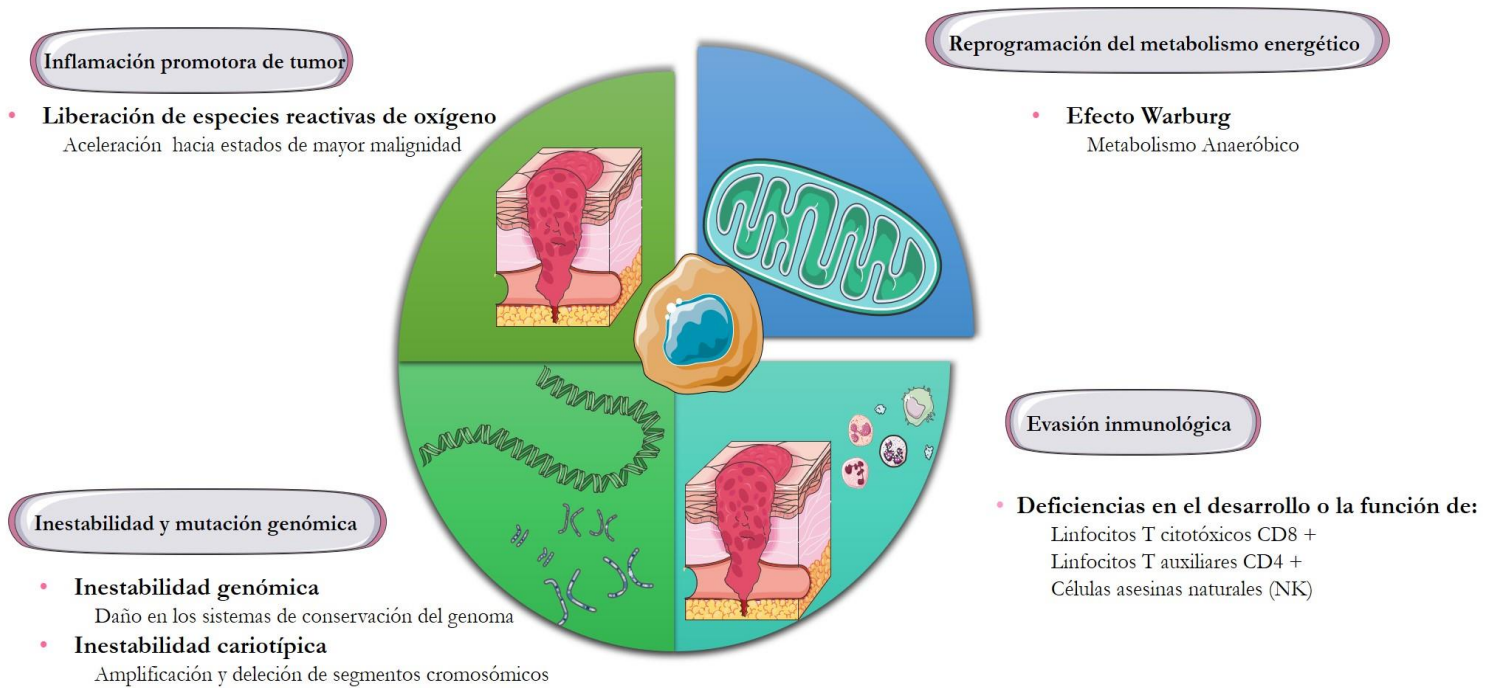


Figura 6. Características planteadas por Hanahan & Weinberg en 2011. Estas características consideran el funcionamiento de grupos de proteínas permitiendo células mutadas adquieran funciones, tales como: 1. Reprogramación del metabolismo energético; 2. Evasión inmunológica; 3. Inestabilidad y mutación genómica; 4. Inflamación promotora de tumor. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 noviembre del 2017).

GLIOMAS

Los gliomas forman un grupo heterogéneo de tumores primarios del SNC, constituidos a partir de alteraciones a nivel celular y molecular que ocasionan un desequilibrio en la proliferación de células gliales involucradas en el soporte, nutrición y mantenimiento extracelular de las células neuronales^{16,34}.

Epidemiología

En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía en el año 2000 se reportó que los tumores primarios del SNC constituían alrededor del 9% de todas las neoplasias en la edad adulta, siendo el 28% gliomas³⁵. En el año 2016, se realizó un estudio sobre la frecuencia de tumores del SNC, en la población mexicana dentro del periodo de 1965 a 2014, este reporte mostró que los tumores neuroepiteliales representaban el 33% (Figura 7), siendo las neoplasias de origen glial más reincidentes³⁶. De este grupo inciden los astrocitomas (66.7%) y los oligoastrocitomas (9.5%)³⁶.

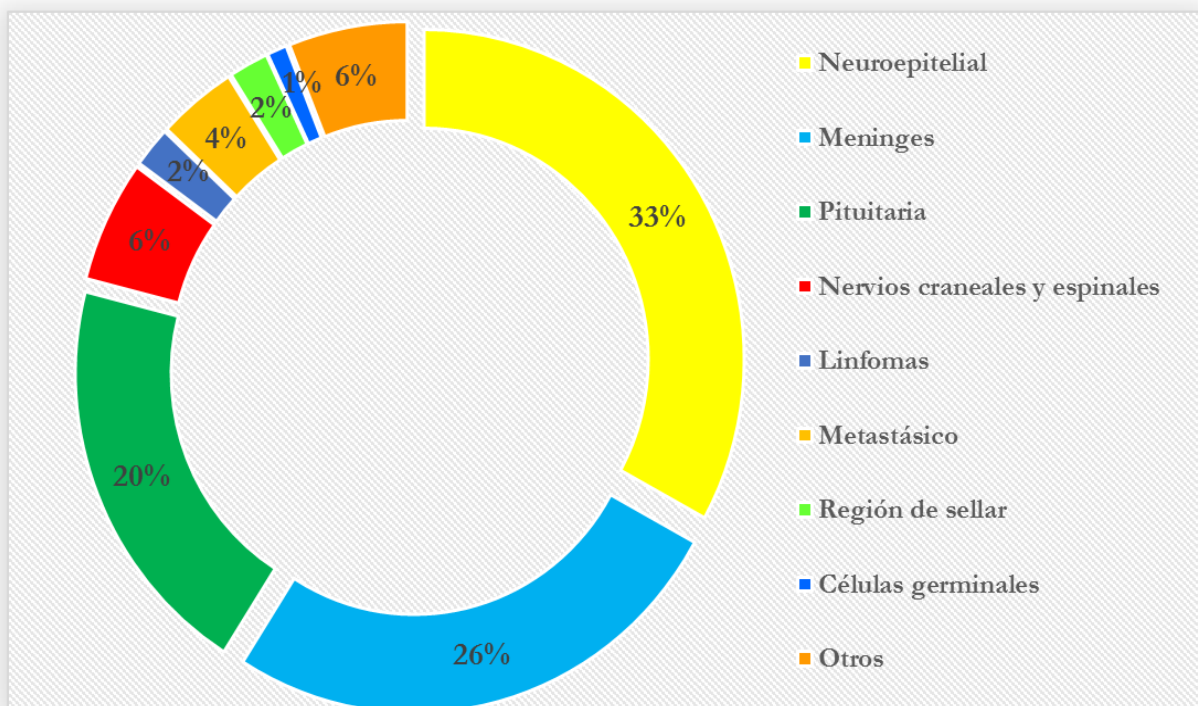


Figura 7. Frecuencia (%) de tumores del SNC reportados en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (1965-2014). Modificado de Aguirre- Cruz *et al.*, 2016.

Presentación clínica y diagnóstico

La sintomatología de los pacientes con neoplasias del SNC varía de acuerdo al tamaño, localización y el grado de invasión hacia el tejido cerebral adyacente^{37,38}. Los síntomas más frecuentes son: dolor de cabeza, convulsiones, parestias o parestesias en diferentes zonas del cuerpo, también estos pacientes presentan alteraciones en funciones cognitivas y sensoriales³⁹. La sospecha diagnóstica de un tumor cerebral se logra inicialmente con una adecuada exploración física y neurológica del paciente, además se completa con imagenología radiológicas que permiten reconocer las características de la neoplasia^{39,40,41}. No obstante, el diagnóstico definitivo se obtiene por determinaciones histopatológicas que consideran criterios morfológicos de estos tumores³⁹.

Abordaje clínico de los gliomas				
Exploración física y neurológica	Diagnóstico de la patología	Astrocitomas Pilocítico	Cirugía Radioterapia (50.4-60 Gy) Quimioterapia	10 años
		Astrocitoma difuso	Cirugía Radioterapia (54-60 Gy) Quimioterapia	5-7 años
Astrocitoma anaplásico		Cirugía Radioterapia (54-60 Gy) Quimioterapia	20-24 meses	
Glioblastoma		Cirugía Radioterapia (54-60 Gy) Quimioterapia	14 meses	
Imagenología (Resonancia Magnética)				
Diagnóstico		Clasificación	Tratamiento	Pronóstico

Cuadro 2. *Abordaje clínico de los gliomas*. Tomado y modificado de Weller *et al.*, 2014.

Clasificación

Los gliomas son definidos a partir del tipo de célula que asemejan y grado de malignidad. De acuerdo al linaje glial, son diferenciados en astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas y oligoastrocitomas^{16,34}. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha considerado criterios histológicos para establecer cuatro grados de malignidad^{32,42}(Cuadro 2). Los gliomas de grado I y II son más frecuentes en infantes e individuos jóvenes, se consideran de mejor pronóstico debido a su bajo potencial proliferativo^{16,43}. Los gliomas grado III y IV inciden en la edad adulta, se caracterizan por atipia nuclear, alta actividad mitótica y pleomorfismo nuclear y celular^{16,43}.

El grado IV, además se caracteriza por presentar trombosis vascular, necrosis e infiltración generalizada hacia el tejido sano, este se clasifica como, el tumor primario de SNC de mayor grado de malignidad ^{16,32}.

Grado de Malignidad	Características
I	Bajo potencial proliferativo y lesiones localizadas.
II	Baja actividad mitótica, atipia nuclear y lesiones infiltrantes.
III	Elevada actividad mitótica, atipia nuclear, anaplasia.
IV	Elevada actividad mitótica, atipia nuclear, proliferación endotelial y/o necrosis.

Cuadro 3. Grados Histológicos establecidos por la OMS (2017). Modificado de Louis *et al.*,2016

Tumores astrocitarios

Estas neoplasias astrocíticas son clasificados de acuerdo al grado de malignidad en cuatro subtipos⁴³ (Figura 8). En infantes y adolescentes se presenta con mayor incidencia los grados inferiores, mientras que en adultos mayores el GBM es el tumor más frecuente⁴³.

Astrocitomas Pilocítico (AP) (Grado I):

Este tipo de tumor se caracteriza por su bajo potencial proliferativo y lesiones localizadas, ocurre en la infancia^{43,44}.

Astrocitoma difuso (AD) (Grado II):

Esta neoplasia representa entre el 10-15% de los astrocitomas e incide en jóvenes y adultos de edad media, con una supervivencia de 10 años. Se define por una lesión diferenciada y difusamente infiltrante, núcleos ovales, escasa atipia y mitosis ausentes⁴³.

Astrocitoma anaplásico (AA) (Grado III):

Son tumores astrocitarios que inciden en la edad adulta, con una supervivencia entre 20-24 meses. Este tipo de neoplasia tiene predisposición a progresar a un astrocitoma grado IV en un intervalo de dos años. Se especifican por ser infiltrantes con mayor potencial proliferativo, presentan mayor densidad celular, atipia nuclear y actividad mitótica⁴³.

Glioblastoma (GBM) (Grado IV):

Representa el tumor primario más frecuente del SNC, se define por ser altamente agresivo, incide en la edad adulta entre 45-75 años con una prevalencia superior en varones que en mujeres y con una supervivencia media entre 12-15 meses^{45,46,47}. En cuanto a sus criterios histológicos se caracteriza por una gran heterogeneidad celular, angiogénesis y regiones necróticas. Su origen puede ser *de novo* (primario) recurrente en pacientes de edad adulta o ser secundario al progresar de una neoplasia de grado menor^{43,48}.

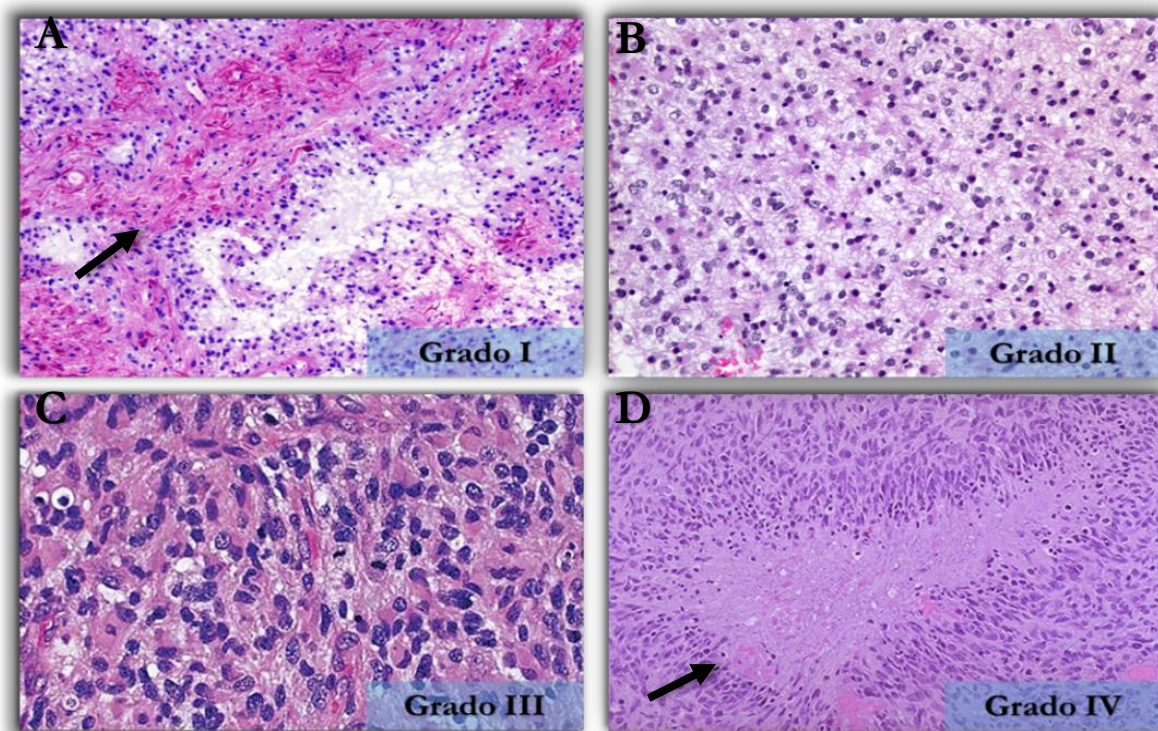


Figura 8. Histología realizada con la tinción hematoxilina-eosina (HE). Las imágenes muestran los cuatro grados de malignidad de los astrocitomas. En **A** se visualiza un astrocitoma pilocítico que se caracteriza por la formación de fibras de Rosenthal (flecha) formadas por un contorno irregular en forma de espiral. En **B** se puede apreciar un astrocitoma difuso delimitados por escasa atipia nuclear. La imagen **C** muestra un astrocitoma anaplásico, histológicamente se caracteriza por atipia nuclear, aumento de la celularidad y alta actividad proliferativa. La figura **D** representa un glioblastoma donde se observa la presencia de angiogénesis, atipia nuclear, alta actividad mitótica, así como una región necrótica (flecha). Imágenes tomadas de Dimitri A. (2011). *Neuropathology: An illustrated interactive course for medical students and residents*. Disponible en: <http://neuropathology-web.org>. (Consultada: 15 de noviembre del 2017).

Entre los tratamientos convencionales para el GBM se incluye la radioterapia, cirugía y quimioterapia, sin embargo, no se observa un incremento en la supervivencia de estos pacientes^{16,49,50}. La ineficacia terapéutica actual ha sido atribuida a diversos factores, entre ellos, a la capacidad de proliferación y potencial de infiltración al parénquima cerebral de células troncales carcinogénicas (CTC), así como la heterogeneidad celular^{16,49,50,51}.

Células troncales carcinogénicas en GBM

Acercas del origen y diferenciación de las CTC se han postulado tres hipótesis^{52,53}. La primera teoría establece que el origen de las CTC surgen a partir de las CTN que sobreviven a un período prolongado de tiempo, acumulando mutaciones oncogénicas, esta hipótesis ha sido corroborada mediante el análisis de expresiones de marcadores de proteínas específicas de células troncales, tal como nestina, una proteína de filamento intermedio presente en células troncales del SNC involucradas en la organogénesis de mamíferos, así como en la organización del citoesqueleto, procesos de señalización y metabolismo celular^{54,55,56}. Otro marcador específico para la identificación de esta población celular es la glicoproteína transmembranal CD133 (Prominina-1)¹⁶. Esta glicoproteína modula la interacción entre la célula y el microambiente de células troncales de varios tejidos, incluyendo las CTN^{16,54}. Diversos trabajos han descrito que las CTC expresan este marcador^{16,54}.

El segundo postulado describe que el origen de las CTC se produce con la transformación y diferenciación de células maduras como consecuencia de mutaciones⁵⁵. Lo anterior genera un incremento en la expresión del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, por sus siglas en inglés), de esta manera, se optimiza la angiogénesis tumoral⁵⁵. Estas células son resistentes a la radiación debido a la activación del punto de control G2/M en el ciclo celular como respuesta al daño en el ADN, esto mejora su capacidad de reparación⁵⁵. Por último, se considera que las CTC se originan como resultado de un almacenamiento descontrolado de células troncales embrionarias durante la ontogénesis; existe una correlación entre el nicho vascular de la ZSV del cerebro adulto, lo que produce un abasto continuo de nuevas células neuronales y gliales, con el establecimiento de gliomas de alto grado en esta región^{16,54}.

MODELOS EXPERIMENTALES

El estudio del comportamiento biológico de tumores cerebrales, así como el desarrollo de diversas estrategias terapéuticas, se apoya a través del uso de modelos experimentales⁵⁷. Durante las últimas décadas, se estableció que las neoplasias formadas a través de estos modelos, permite asemejar a los tumores presentados en humanos, lo que ha generado conocimientos sobre procesos de oncogénesis, lo cual contribuye a diseñar nuevos enfoques terapéuticos contra estas neoplasias⁵⁷.

Nitrosoureas

En 1956 se reportaron los primeros modelos de tumores cerebrales inducidos con agentes carcinogénicos. Los compuestos nitrogenados de la urea son utilizados por su alto potencial carcinogénico y acción neuro-oncogénica que favorece el desarrollo de estas neoplasias⁵⁷. Los compuestos más utilizados son la N-metil-nitrosourea (MNU) y ENU, su alcance carcinogénico se ve relacionado con la vía de administración, dosis, edad y especie de los animales⁵⁷.

Los reportes iniciales con MNU mostraron un alto índice de desarrollo de tumores del SNC después de una administración sistémica en ratas. Sin embargo, se mostró que el efecto neuro-oncogénico en ratas adultas se veía afectado de acuerdo a la vía de administración provocando la aparición de tumores locales en la zona de aplicación. De igual forma se observó que una única dosis entre 70-100 mg/kg inducían la formación de tumores malignos en otros órganos y tejidos⁵⁷.

Por otra parte, se ha reportado que la administración intravenosa de una única dosis de 50 mg/kg de ENU a ratas Wistar en el día 18 de gestación, induce la formación de neoplasias en el SNC del 80% de la progenie en la edad adulta^{58,59}. La actividad mutagénica del compuesto varía de acuerdo a la etapa de desarrollo que se encuentra el animal al momento de la administración^{60,61}.

La exposición de ENU a ratas entre los días 9-15 de gestación ejerce un efecto teratógeno en los embriones^{62,63}. La administración de ENU durante esta etapa de embriogénesis induce mutaciones en el ADN, ocasionando apoptosis y arresto del ciclo celular de células neuroepiteliales, lo que incrementa la susceptibilidad a la formación de anomalías en la crías^{64,65}.

Mientras que en etapas tardías de embriogénesis se potencia su efecto cancerígeno^{13,64,66}. Se ha sugerido que el desarrollo de neoplasias del SNC está relacionado con la alquilación de bases del ADN, ocasionando mutaciones puntuales en las fases de replicación, que conllevan la sobreexpresión de oncogenes, así como una desregulación en vías de señalización que inducen apoptosis y cambios en la dinámica del ciclo celular de las CTN localizadas en la ZSV^{13,64,66}.

Las primeras manifestaciones clínicas asociados a la presencia de tumores del SNC, ocurren en la edad adulta de los animales (seis meses de edad), la sintomatología presentada en los animales son: lateralización de la cabeza, ataxia, disnea, pérdida de peso, descuido de la apariencia, aletargamiento^{57,64}.

Linaje celular

Durante el desarrollo de los estudios *in vitro*, el uso de cultivos primarios de células inmortalizadas; ha sido de gran utilidad para estudiar neoplasias del SNC⁵⁷. En 1973 Bendán y colaboradores aislaron la línea celular C6 a partir de un tumor glial de rata Wistar, obtenido mediante la administración de MNU⁵⁷. El origen glial de las células C6, ha sido confirmada por la producción de altos niveles de la proteína S-100, un fenotipo molecular involucrado en el desarrollo y fisiología del cerebro de los vertebrados, localizado en numerosos tumores cerebrales, tanto de humanos como en otros animales^{67,68}. Se ha descrito una mayor proporción de CTC en la línea C6 en comparación con otras líneas celulares de gliomas, como: CNS1, RT-2, BT4C, F98, RG2, T9⁴⁹.

ANTECEDENTES

Para inducir diferenciación de células neoplásicas se han propuesto diversas estrategias^{69,70,71}. Una de ellas es el uso de factores transcripcionales, los cuales pueden ser liberados mediante vectores lentivirales, permitiendo la reprogramación de células somáticas humanas adultas hacia células madre pluripotentes inducidas (iPSCs) para la generación de células neurales, así como conversión directa en células neurales^{69,70}. Por otra parte, se ha descrito la reprogramación químicamente inducida de células somáticas hacia células madre pluripotentes y células neurales⁷¹.

Los compuestos utilizados en el presente estudio: ATRA, DMSO, teofilina y VPA, presentan propiedades inductoras de diferenciación^{72,73,74,75}. Estos compuestos son relativamente inocuos, económicos y farmacológicamente probados en otros padecimientos. El laboratorio de Neuroinmunología del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía ha desarrollado varios trabajos con ATRA⁷³. En un estudio se determinó que el ATRA promueve la expresión endógena del factor de crecimiento neural (NGF, por sus siglas en inglés) en plasma y nervio periférico, así como en la expresión del receptor β del ácido retinoico (RAR- β)⁷³. Se demostraron sus propiedades para promover la regeneración neural y prevenir el desarrollo de neuropatía diabética inducida por solventes y por quimioterapia en un modelo animal, así como clínicamente en pacientes con cáncer de pulmón^{76,77,78}. Recientemente se reportó que el retinol tiene efecto terapéutico similar al ATRA, el cual revierte las alteraciones sensoriales asociadas a la neuropatía diabética, así como el incremento de los niveles de NGF y RAR- β , los resultados obtenidos sugieren su potencial uso terapéutico en pacientes con neuropatía diabética⁷³.

Ácido valproico

El VPA es un fármaco utilizado para el tratamiento de epilepsia^{79,80}. Interviene en la inhibición de la desacetilasa de histonas (DACH) y quinasas celulares que afectan la transcripción de genes que participan en la hiperacetilación de histonas y la hipometilación del ADN^{79,81,82}. En los últimos años se ha reportado que el VPA mejora la neuroprotección e induce diferenciación neuronal de CTN, a través de la activación del factor transcripcional neurogénico (NeuroD)^{83,84}. Basándose en estos mecanismos, actualmente varios estudios evalúan el potencial terapéutico del VPA en el tratamiento contra los gliomas^{79,81,82}. Este fármaco ha sido descrito como modulador de factores de transcripción implicados en la diferenciación de células de glioma, además de prevenir la angiogénesis en tejidos adyacentes a la zona tumoral^{79,81,82}.

Un estudio realizado por Bacon y colaboradores en el 2002 determinó que la concentración 2 mM de VPA incrementa la expresión de la ciclina D3 durante la fase G1 del ciclo celular y decrece la expresión del antígeno nuclear de células en proliferación (PCNA) de la línea celular de glioma de rata C6, lo que sugiere que el arresto del ciclo celular inducida por VPA puede estar mediada por la activación precoz de la ciclina D3 en la fase G1⁸⁵. El trabajo de Helen y su equipo en el 2003 afirma que el VPA a una concentración de 2 mM modula la inhibición de la adenosina monofosfato cíclico (AMPc) provocando una regulación negativa del crecimiento y proliferación celular en la línea celular de glioma de rata C6 ⁸⁶.

En 2008 un estudio realizado por Benítez y colaboradores reportó que la concentración de 1mM de VPA disminuye la proliferación celular en la línea celular de glioma de rata C6 a tiempos de 24, 48 y 72 horas después del tratamiento, así como cambios morfológicos en las células empleando concentraciones crecientes (1, 2, 3, 5 y 10 mM) de VPA. Estos cambios son relacionados con la disminución del crecimiento, la migración y muerte celular, así como la expresión de GFAP, e incremento de la expresión de Tuj-1, y como resultado el VPA induce diferenciación de las células C6 hacia un fenotipo de tipo neuronal⁸¹. Morita y colaboradores en 2009 reportaron que los fármacos que inhiben la DACH como lo son la Tricostatina A (TSA), el butirato sódico (NaB) y el VPA inducen la estimulación de serotonina, así como la expresión del gen GFAP en células de glioma C6 de rata. Se determinó que el VPA a una dosis de 2 mM durante 24 horas, estimula la serotonina a través de la expresión del gen del factor neurotrófico (BDNF) promoviendo la diferenciación de las células gliales a través de la producción de neuroesteroides 5 α -reducidos⁸⁷.

Riva y su grupo de trabajo en los años 2014 y 2016 evaluaron *in vitro* el efecto del VPA de forma individual y en combinación con Paclitaxel (PTX) y Temozolamida (TMZ) a tiempos cortos (24, 48 y 72 horas) y largos (14 y 30 días) en CTC obtenidas a partir de muestras de tumores de pacientes, ellos determinaron que existe un comportamiento heterogéneo en el GBM, posterior a la evaluación de los perfiles de metilación de ADN, así como la expresión de proteínas presentes en las CTC y los marcadores de linaje neural y astrocítico^{88,89}.

Dimetil sulfóxido

El DMSO es una molécula anfipática con un dominio altamente polar y dos grupos metilo apolares⁹⁰. Este compuesto es empleado como vehículo terapéutico, debido a que promueve el transporte en membranas^{91,92}. Este fármaco es un antagonista de la agregación plaquetaria, analgésico, anti-inflamatorio y bacteriostático^{91,92}.

El DMSO ha sido reportado como modulador epigenético al inducir cambios en el estado de metilación del ADN^{91,92}. Además, este compuesto orquesta procesos de crecimiento y diferenciación hepática, mediante la disminución de genes pluripotentes en células troncales embrionarias humanas hacia un linaje endodérmico mediado por Activina A⁹². Fiore & Degrossi en 1999 reportaron que el DMSO al 1.5% durante 96 horas induce arresto del ciclo celular en la fase G1 de células de ovario de hámster chino (COHC), el incremento de cadherinas, así como una inhibición de la muerte celular por apoptosis, estos resultados muestran que los genes p27 y Bcl-2 están implicados en la reanudación del control del crecimiento que acompaña a la adhesión celular en células⁹³.

Oh y su equipo en 2005 evaluaron diferenciación en la línea celular de neuroblastoma N1E-115 usando DMSO como agente inductor, mediante análisis proteómico identificaron diversas proteínas de señalización que sólo están expresadas en las células diferenciadas, tales como factores de crecimiento, proteínas de unión a calcio, fosfatasa, cinasas, proteínas asociadas a Ras y de unión a GTP⁹⁴. Cipriano y colaboradores en 2016 evaluaron el efecto de diversos modificadores epigenéticos, entre ellos el DMSO, sobre células troncales mesenquimales derivadas de tejido de cordón para inducir diferenciación hacia células hepáticas, observando que la adición de estos agentes mejora la diferenciación y maduración hacia este tipo celular⁹⁵.

Retinoides

La vitamina A y retinoides son compuestos liposolubles asociados al suero y a proteínas de unión celular, ellos orquestan funciones biológicas de proliferación, reproducción, desarrollo embrionario, diferenciación de tejidos epiteliales y en la respuesta inmunitaria^{96,97,98}. La vitamina A (Figura 9) proviene de fuentes dietéticas y es almacenada como ésteres de retinilo en el hígado, se transporta como proteína de unión al retinol del hígado a los tejidos diana, donde se convierte en retinaldehído (retinal) y posteriormente en ácido retinoico⁹⁸. El ácido retinoico (RA) es un metabolito activo del retinol, sintetizado a partir de la oxidación reversible del retinol a retinal⁹⁹. El RA está relacionado con la transcripción de factores nucleares específicos por medio de los receptores del ácido retinoico (RAR) y receptores de retinoides (RXR)⁹⁹. El ATRA es una isoforma natural del retinol que regula procesos de crecimiento y diferenciación celular^{99,100,101}.

Diversos estudios, han evaluado el potencial de modulación de diferenciación de los retinoides en varias líneas celulares de glioma^{102,103}. Das y su equipo en 2008 evaluó la concentración de 1 μ M de ATRA solo y en combinación con taxol (TXL) en las líneas celulares de glioblastoma humano T98G y U87MG. Observaron que el tratamiento con ATRA y TXL induce la diferenciación astrocítica a los 7 días, la sobreexpresión de la proteína GFAP e inhibición de la telomerasa¹⁰⁴.

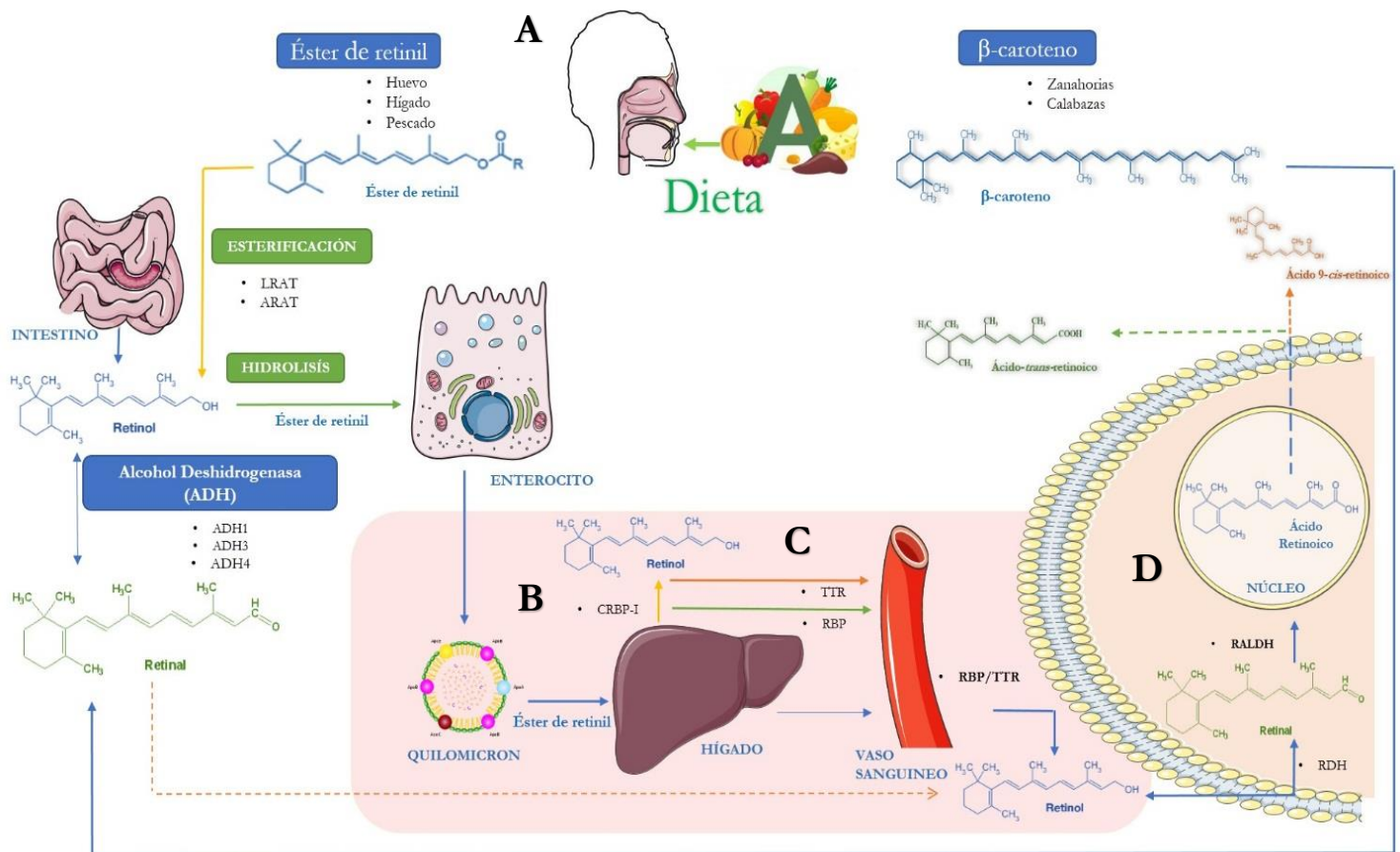


Figura 9. Ruta de señalización del retinol. (A) Los retinoides provienen de una dieta con alto contenido de β -caroteno y ésteres de retinil (ER) que, a través de procesos citosólicos, son absorbidos por las células de la mucosa intestinal, donde se transforman por acción de la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH) en retinol que posteriormente se reduce en retinol. En el interior de las células intestinales, el retinol forma nuevamente ER. Los ER son empaquetados dentro de quilomicrones y secretados en el sistema linfático, donde son transportados hasta el hígado donde son almacenados. (B) La hidrólisis de los ER produce el retinol que se unirá a las proteínas de unión de retinol (RBP). (C) Los RPB, una vez liberadas a la sangre, se combinarán con transtirretina (TTR) formando un complejo ternario encargado de transportar el retinol hasta los tejidos. El retinol entra en tejidos libres de RBP y en el interior de las células se une a las proteínas celulares de unión al retinol (CRBP) y se convierten en retinol. (D) Finalmente, en ácido retinoico (AR). El AR se transfiere al núcleo donde se une a los dímeros del receptor RA (RAR / RXR) y actúa en secuencias cortas de ADN. La figura se realizó utilizando el sitio Servier Medical Art. Disponible en: <http://smart.servier.com> (Consultada: 15 de noviembre del 2017).

En el 2010 Karsy y su grupo de trabajo demostraron que la concentración de $10 \mu\text{M}$ de ATRA modula mecanismos de diferenciación hacia linaje glial y neuronal de CTC, así como la disminución de proliferación de esta población celular. No obstante, en concentraciones de $40 \mu\text{M}$ induce muerte celular por apoptosis. Ellos mostraron que las alteraciones en ERK-1/2 inducidas por ATRA están asociadas con la regulación de la diferenciación, proliferación y apoptosis¹⁰⁵.

En el año 2011 Ying y colaboradores evaluaron el efecto de la inhibición de la vía de Notch mediante el tratamiento con ATRA en células CTC. Observaron que el ATRA induce la expresión de marcadores específicos de diferenciación Tuj-1 y GFAP y reduce la expresión los marcadores CD133, Msi-1, nestina y Sox-2¹⁰⁶. Zhang y colaboradores en 2013 reportaron que el ATRA a una concentración de 1 $\mu\text{mol/L}$, disminuye la expresión de los marcadores CD133 y Nestina. Ellos afirman que a esta concentración de ATRA incrementa la expresión de GFAP y detiene el crecimiento de esta población celular¹⁰⁷.

En el año 2013 Shi y colaboradores utilizaron cuatro concentraciones de ATRA (1, 2,4, y 8 $\mu\text{mol/L}$) sobre CTC aisladas a partir del cultivo de la línea celular de glioma U87MG para inducir la diferenciación de esta población. A través de la detección por PCR en tiempo real se comprobó que el nivel de ARNm de GFAP era significativamente mayor que en el grupo control, y que las concentraciones de 1 y 2 $\mu\text{mol/L}$ inducen diferenciación hacia un linaje astrocítico. Este trabajo mostró, que el ATRA además induce arresto del ciclo celular en la fase G0/G1¹⁰⁸.

Liang y su equipo en 2015 realizaron un estudio sobre el efecto del ATRA a diversas concentraciones (0, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{mol/L}$) en las líneas celulares de glioma U87MG y SHG44. Ellos reportan que el ATRA tiene un comportamiento dosis-dependiente, esto permite la inhibición de la migración, invasión y proliferación, además promueve la apoptosis en células de glioma⁹².

Teofilina

La teofilina es un alcaloide de tipo metilxantina sintetizado de forma natural en las hojas de la planta *Camellia sinensis*¹⁰⁹. Es considerada como un estimulante del SNC y broncodilatador, ya que interviene como antagonista no selectivo de los receptores de la adenosina A₁ y A_{2A}¹¹⁰. Este compuesto ha sido reportado como un inhibidor de las fosfodiesterasas (PDE), dirigiendo la acumulación de AMPc¹¹⁰. Varios estudios han evaluado el papel de las metilxantinas sobre la inducción de apoptosis y la supresión de la proliferación celular de células tumorales; sin embargo, existen pocos estudios sobre la diferenciación de esta población celular^{111,112,113}.

En 1973 el equipo de Masakatsu en la universidad de Tokio reportó que la concentración 1mM de teofilina induce cambios morfológicos de células de glioblastoma humanas y en células de glioma maligno inducidas por metilcolantreno en la cepa C57 de ratón, determinaron que a partir de 6 horas de tratamiento las células formaban cuerpos celulares alargados¹¹¹.

Dos años después Sato y colaboradores reportaron que la misma concentración de teofilina induce cambios morfológicos similares a células gliales a partir del quinto día de exposición en la línea celular de glioma de ratón establecida por Masakatsu en 1973, observó además un incremento en la expresión del marcador S-100; sin embargo, a partir del sexto día de exposición hay una disminución en la viabilidad de esta población celular¹¹².

En 2004 Takanaga y su equipo utilizaron de forma combinada los compuestos N (6), 2'-O-dibutiril AMPc (Bt₂AMP) (1 mM) y teofilina (0.25 mM) como moduladores de diferenciación, que inducen la fosforilación retardada del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3), así como la expresión del marcador GFAP. Por otro lado, se observó que esta combinación estimula la acumulación de AMPc e induce la producción de interleucina 6 (IL-6), causando la activación tardía de STAT3, que promueve la diferenciación astrocítica de la línea celular de glioma de rata C6¹¹³. Moon y su equipo de trabajo en 2012 evaluaron el efecto de los inhibidores no específicos de la PDE sobre la viabilidad celular de las líneas celulares de glioma de humano A172 y U87MG, demostraron que la isobutimetilxantina (IBMX) y la teofilina reducen el porcentaje de viabilidad de ambas líneas celulares¹¹⁴.

JUSTIFICACIÓN

A la fecha, la terapéutica del GBM está enfocada en la eliminación de las células tumorales; sin embargo, esta estrategia ha resultado ineficaz debido a diversos factores, entre ellos la heterogeneidad celular. Dada la importancia de buscar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de tumores cerebrales, este trabajo contribuye en apoyar el paradigma de transformación de las células tumorales hacia grados menores de malignidad, utilizando la combinación de diversos agentes que promueven la diferenciación celular. El uso de estos inductores de diferenciación podría evitar o retardar el desarrollo de los tumores inducidos con ENU en ratas, promoviendo la diferenciación de las células tumorales des-diferenciadas a estadios de menor malignidad.

HIPÓTESIS

Sí la combinación de los agentes propuestos (DMSO, ATRA, VPA y teofilina) estimulan la diferenciación de células tumorales des-diferenciadas, entonces se disminuirá el grado de malignidad en un modelo *in vitro* y se evitará o retardará el desarrollo de tumores cerebrales inducidos con ENU.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la combinación de diversos compuestos inductores de diferenciación en un modelo de glioma maligno.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1.- Evaluar el efecto *in vitro* de los compuestos inductores de diferenciación (DMSO, teofilina, VPA y ATRA) en la línea celular de glioma C6.

- Determinar el efecto de los agentes inductores de diferenciación propuestos sobre la morfología, viabilidad y ciclo celular en la línea de glioma C6.
- Analizar el efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre la expresión de los marcadores de diferenciación en la línea de glioma C6.

2.- Determinar el efecto *in vivo* de los agentes de diferenciación (DMSO, teofilina, VPA y ATRA), en el modelo de tumores cerebrales inducidos con ENU.

- Inducir el modelo experimental de glioma maligno utilizando ENU en ratas Wistar.
- Determinar el efecto de diversos agentes de diferenciación sobre la supervivencia e incidencia de tumores de las ratas Wistar expuestas con ENU.

METODOLOGÍA

In vitro

Reactivos

Los compuestos (DMSO, teofilina, VPA y ATRA) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich. Para los ensayos fueron disueltos en medio DMEM/ F-12 suplementado con 2% de B27 (Gibco), 1% de antibiótico y antimicótico (AB, Gibco). Los tratamientos se realizaron de manera individual y en combinación. Para los experimentos *in vitro* se utilizaron las siguientes concentraciones:

Compuesto	Concentración
<i>DMSO</i>	1%
<i>Teofilina</i>	1mM
<i>VPA</i>	1mM
<i>ATRA</i>	10 μ M
<i>Vitamina A</i>	1010 IU

Cuadro 4. *Concentraciones para los tratamientos in vitro*

Cultivo celular

Las células de glioma de rata C6 fueron obtenidas de la Colección Americana de Cultivos y Tejidos, Rockville, Maryland, USA). Las células se cultivaron en condiciones estériles a 37 °C en una atmósfera húmeda controlada en 5% de CO₂ y 95% de O₂ en medio de cultivo Dulbecco Modificado (DMEM, Sigma-Aldrich, USA), suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB, Gibco), y 1% de antibiótico/antimicótico (AB, Gibco). Los cultivos se monitorearon y cuando estuvieron a 85% de confluencia, se disgregaron mediante tratamiento con tripsina (Sigma-Aldrich)

Análisis Morfológico

Las células fueron sembradas en placas de 24 pozos en medio DMEM suplementado con 10% de SFB y 1% de AB. Después de 24 horas fueron tratadas con los compuestos disueltos en medio DMEM/ F-12, suplementado con 2% de B27 y 1% de AB.

Se evaluaron distintos tiempos (24, 48 y 72 horas; 5, 10 y 15 días). Las células tratadas a tiempos largos fueron suplementadas cada cinco días con el medio de cultivo DMEM/F-12 y su correspondiente tratamiento. La evaluación de los cambios en la morfología celular se realizó mediante microscopía de contraste de fases, se comparó las células tratada con respecto al control. Se tomaron fotos representativas de cada tratamiento.

Ensayo de viabilidad celular

La viabilidad celular de las células de glioma C6 se determinó mediante el ensayo colorimétrico de MTT determinado por Mosmann⁹⁸. El colorante MTT o bromuro 3 [4,5 - dimetiltiazol-2-il] -2,5-difenil-tetrazolio, es reducido por la enzima oxidoreductasa NADPH (succinato deshidrogenasa), que rompe el anillo de tetrazolio produciendo cristales de formazán^{99,100}. Estos cristales formados, son disueltos con una solución solubilizante (SDS al 10% en HCl 0.01M). La absorbancia se determina a 570 nm, y se correlaciona directamente con el número de células vivas.

Para este ensayo se sembraron 1×10^4 células en placas de cultivo de 96 pozos con medio DMEM/ F-12 enriquecido con 2% de suplemento B27 y 1% de AB. Las células se expusieron a concentraciones de los compuestos a los diferentes tiempos e incubados a 37°C. Posteriormente se añadió 10 μ L de MTT (5 mg/mL) (Sigma) y las células se incubaron a 37°C durante 4 horas. Los cristales de tetrazolio se solubilizaron mediante la adición de 100 μ L de solución solubilizante y se incubó la placa durante la noche a 37°C. La absorbancia fue medida en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 570 nm. Se evaluó el porcentaje de células viables utilizando el programa GraphPad Prism ver. 6.

Detección de ciclo celular (yoduro de propidio) por citometría de flujo

La determinación del ciclo celular se realizó por citometría de flujo, utilizando la tinción con yoduro de propidio (PI) en un equipo FACSCalibu. Las células fueron tratadas con los compuestos a los diferentes tiempos y para su posterior recolección. Se fijaron con etanol al 70% durante 2 horas a -20°C. Las células fueron lavadas con PBS, se centrifugaron y resuspendieron en buffer de permeabilización (2M de Na_2HPO_4 , 1M de Ácido cítrico) e incubadas durante 5 minutos a 37°C. Posteriormente, se centrifugaron y suspendieron en RNAsa (1mg/mL) y de IP (1mg/mL), incubándolas durante 15 minutos en oscuridad. Para la determinación, se evaluaron 10,000 eventos. Se determinó el porcentaje de células en las fases de ciclo celular (Sub G0; G1/G0; S; G2/M) utilizando el programa Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1.

Marcadores de expresión

Posterior a los tratamientos con los compuestos inductores de diferenciación (DMSO, ATRA, VPA y teofilina), las células fueron colectadas y resuspendidas en PBS, para determinar la expresión de marcadores de diferenciación específicos de linaje, así como de células troncales mediante citometría de flujo. Para realizar este ensayo, las células se incubaron con los anticuerpos en una dilución 1:100 durante 30 minutos. Se utilizaron los marcadores expresión de células troncales (Nestina-Alexa Fluor 488; Abcam), de linaje neural (Tuj-1- Alexa Fluor 488; Abcam) y linaje astrocítico (GFAP- Alexa Fluor 488; BD Biosciences). Las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% por 30 minutos a 4°C. Para la determinación, se evaluaron 10,000 eventos. Se determinó el porcentaje de células que expresan los marcadores utilizando el programa Cell QuestPro and Flow Jo ver. 7.6.1.

Análisis estadístico

Los grupos se compararon usando análisis de varianza (ANOVA de una vía) y post-hoc (Tukey); un valor de $p \leq 0.05$ fue definido como significativo. Todos los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico GraphPad Prism versión 6 para Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA).

In vivo

Animales

Para la inducción de tumores cerebrales con ENU, se utilizaron 10 ratas Wistar hembras de 12 semanas. Todos los procedimientos experimentales fueron revisados y sometidos a aprobación por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (CICUAL-INNN) y acorde a lo descrito en la NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio.” Los animales se mantuvieron en las condiciones habituales del bioterio, con una temperatura ambiente aproximada de 22°C, con ciclo luz/oscuridad controlada, alimentación uniforme y agua a libre demanda.

Desarrollo de los tumores cerebrales inducidos con ENU

Para la inducción de tumores cerebrales con ENU, se administró el compuesto ENU (50 mg/Kg de peso) disuelto en 1 mL de PBS, vía intravenosa en ratas Wistar hembras que estuvieran en el día 18 de gestación. Las ratas fueron monitoreadas en su ciclo estral, para seleccionar las que se encontraban en periodo estro y posteriormente fueron apareadas. La identificación de las ratas gestantes se realizó mediante la detección del tapón vaginal, así como la visualización de espermatozoides en un frotis vaginal.

Tratamiento con los inductores de diferenciación

La progenie fue destetada a los 21 días de edad, siendo separadas por género y divididas al azar en dos grupos experimentales (100 animales): grupo control (50 animales) y grupo con tratamiento (50 animales). La administración se llevó a cabo a partir del día 70 de edad, diariamente por vía oral hasta que presentaron las manifestaciones tumorales. El tratamiento se describe a continuación.

Grupo A Control (n=50)	Grupo B Tratamiento (n=50)
Administrado con aceite comestible de maíz.	Mezcla de los siguientes compuestos: DMSO (4.8 g/ Kg) Vitamina A (6 mg/ Kg) Ácido valproico (300 mg/ Kg) Teofilina (15 mg/ Kg)

Cuadro 5. Tratamiento in vivo.

Determinación de la supervivencia e incidencia de tumores

Para determinar sobrevida, se monitoreo periódicamente la evolución de las ratas. Se registró el día en que las ratas se encuentren con signos neurológicos correspondientes al desarrollo de un tumor, entonces fueron sacrificadas, de acuerdo a la guía para el uso y cuidado de animales de laboratorio NOM-062-ZOO-1999. Los signos neurológicos correspondientes al desarrollo de un tumor son: exoftalmos, lateralización de la cabeza, ataxia, disnea, pérdida de peso, descuido de la apariencia, aletargamiento, apatía y parálisis de una o ambas extremidades inferiores. Las ratas fueron perfundidas con formalina al 10% con previa anestesia con Xilacina/Ketamina; se analizaron cerebro y médula espinal, y se analizó sí se desarrollaron tumores en algún otro órgano.

Análisis estadístico

Los grupos se compararon usando un análisis de varianza (ANOVA de una vía), Kaplan-Meier para sobrevida y X^2 para la incidencia acumulada; un valor de $p \leq 0.05$ fue definido como significativo. Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 18.0 para Windows (SPSS Inc., Chicago, IL).

RESULTADOS

MORFOLOGÍA CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR DE GLIOMA DE RATA C6

El análisis morfológico de las células de glioma C6 sometidas al tratamiento con DMSO (1%), teofilina (1 mM), VPA (1 mM), ATRA (10 μ M), vitamina A (1010 IU), la combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA, teofilina) y la combinación sin teofilina (DMSO, VPA, ATRA), se realizó a través del monitoreo por microscopía de campo claro a tiempos cortos (24, 48 y 72 horas) y tiempos largos (5, 10 y 15 días). El tratamiento a tiempos cortos (Figura 10 y 11), muestra que las células de glioma C6 sometidas al tratamiento con DMSO, ATRA y vitamina A no presentan cambios morfológicos con respecto al control; sin embargo, el tratamiento con teofilina así como la combinación de todos los compuestos induce un efecto citotóxico a partir de las 24 horas de tratamiento (Figura 10 y 11); mientras que las células tratadas con VPA y la combinación sin teofilina muestran cambios morfológicos a partir de las 72 horas presentando una morfología alargada. El tratamiento a tiempos largos (Figura 13 y 14), muestra que las células tratadas con DMSO no presentan cambios morfológicos con respecto al control; el tratamiento con teofilina, así como la combinación de todos los compuestos sigue mostrando el efecto citotóxico observado desde las 24 horas de tratamiento. A partir del quinto día las células C6 expuestas con VPA muestran la formación de neuritas, mientras que las células tratadas con ATRA y vitamina A presentan un efecto citotóxico, a los 15 días de tratamiento; y la combinación de compuestos sin teofilina presenta cambios morfológicos hacia la formación de neuritas.

24 HORAS

48 HORAS

72 HORAS

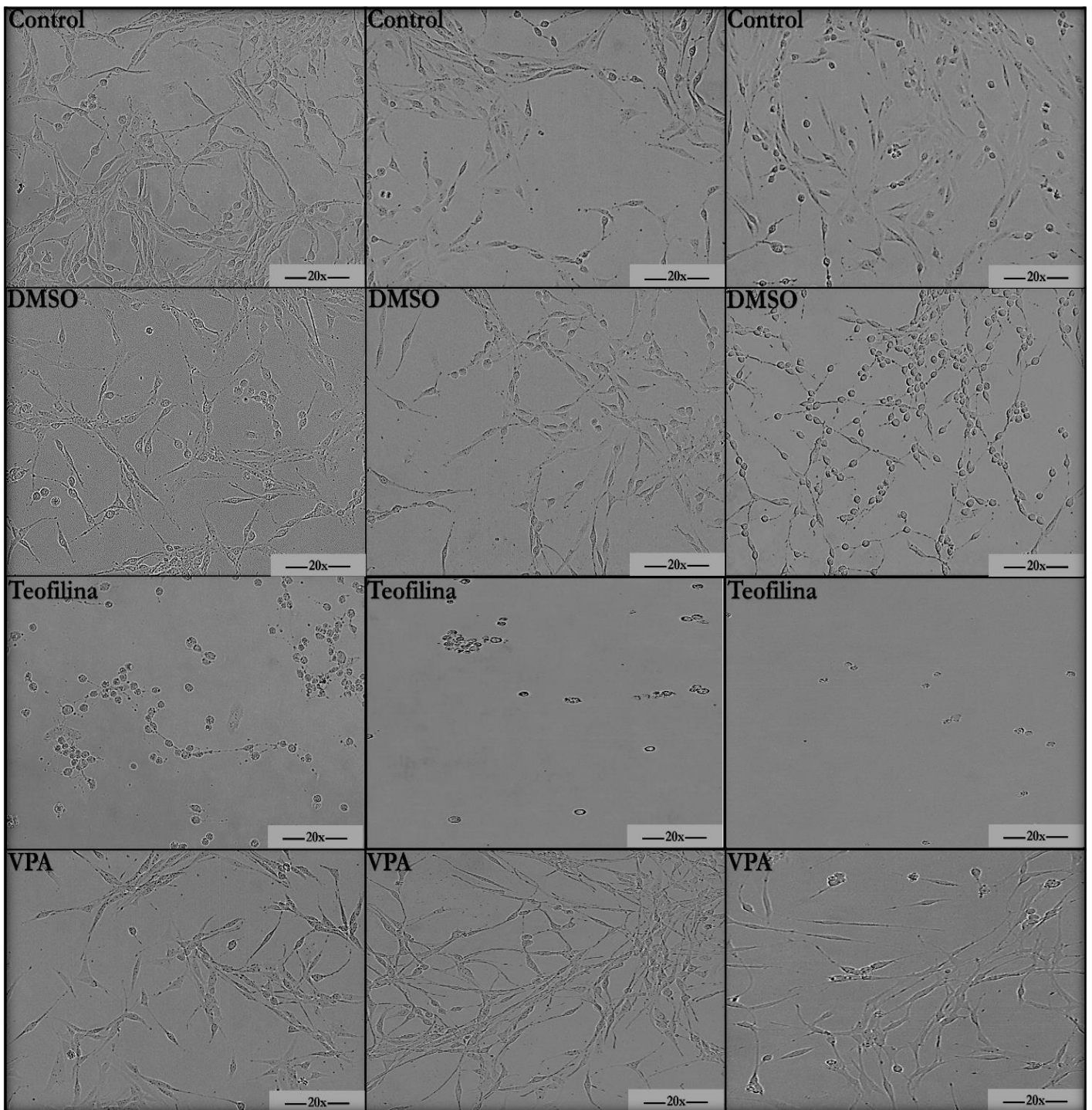


Figura 10. Morfología celular en la línea celular de glioma de rata C6. Morfología celular en la línea celular de glioma de rata C6. Las células de glioma C6 fueron tratadas con DMSO (1%), teofilina (1 mM), VPA (1 mM) a tiempos cortos (24, 48 y 72 horas). Imágenes tomadas por microscopía de campo claro con un aumento de 20X.

24 HORAS

48 HORAS

72 HORAS

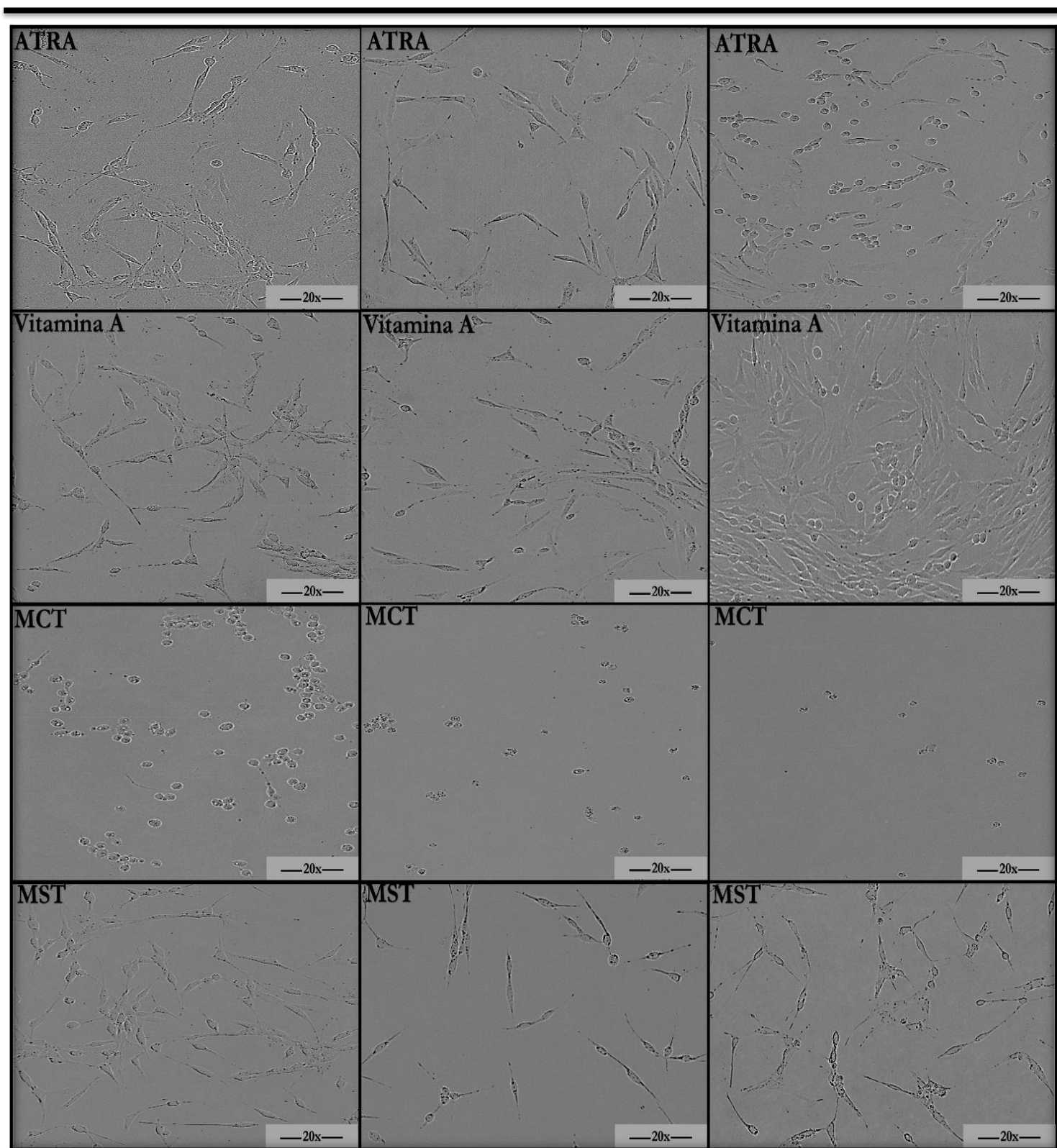


Figura 11. Morfología celular en la línea celular de glioma de rata C6. Las células de glioma C6 fueron tratadas con ATRA (10 μM), Vitamina A (1010 IU), la combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA, Teofilina), y la combinación sin teofilina (DMSO, VPA, ATRA), a tiempos cortos (24, 48 y 72 horas). Imágenes tomadas por microscopia de campo claro con un aumento de 20X.

5 DÍAS

10 DÍAS

15 DÍAS

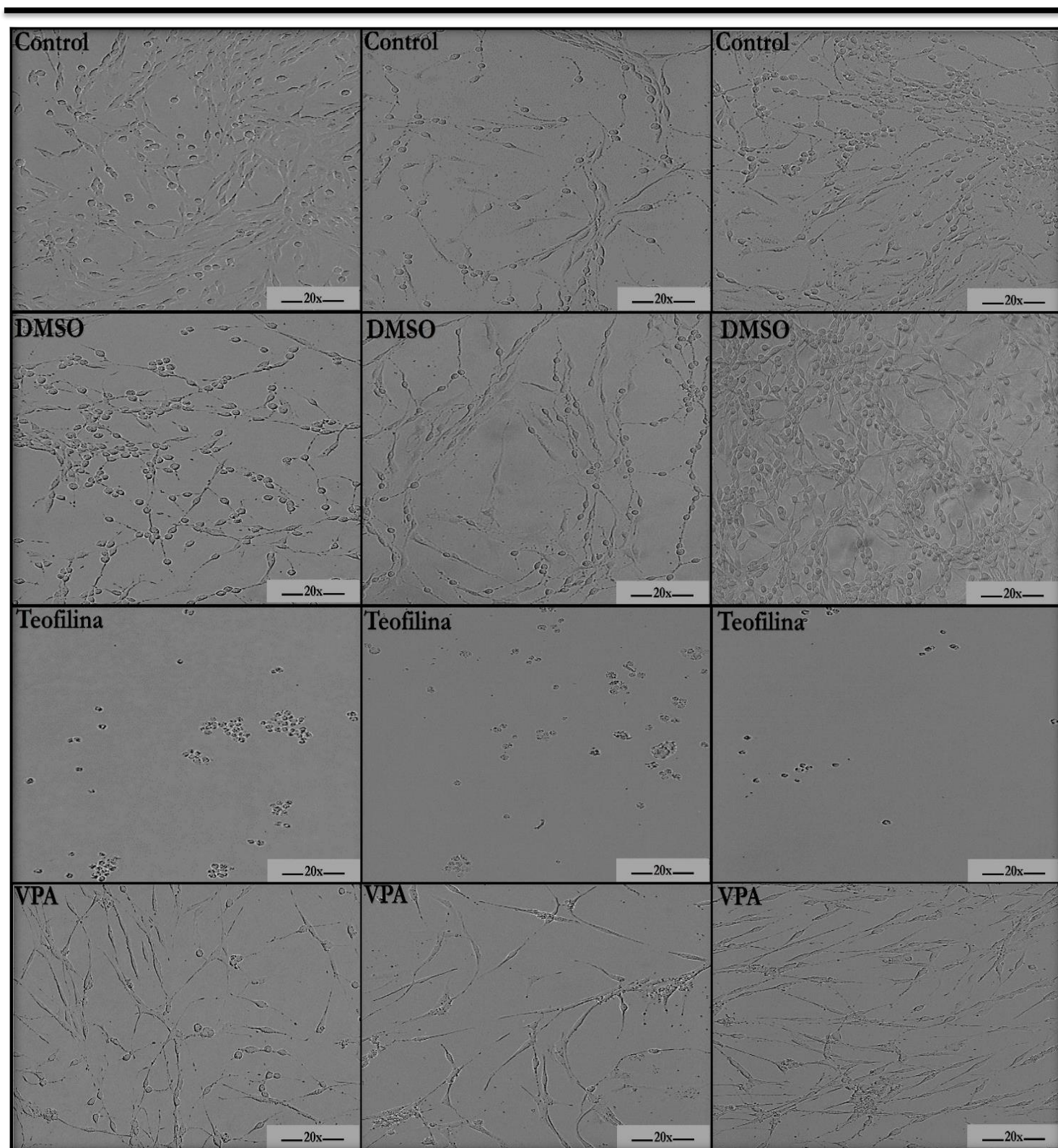


Figura 12. *Morfología celular en la línea celular de glioma de rata C6.* Las células de glioma C6 fueron tratadas con DMSO (1%), teofilina (1 mM), VPA (1 mM) a tiempos largos (5, 10 y 15 días). Imágenes tomadas por microscopía de campo claro con un aumento de 20X.

5 DÍAS

10 DÍAS

15 DÍAS

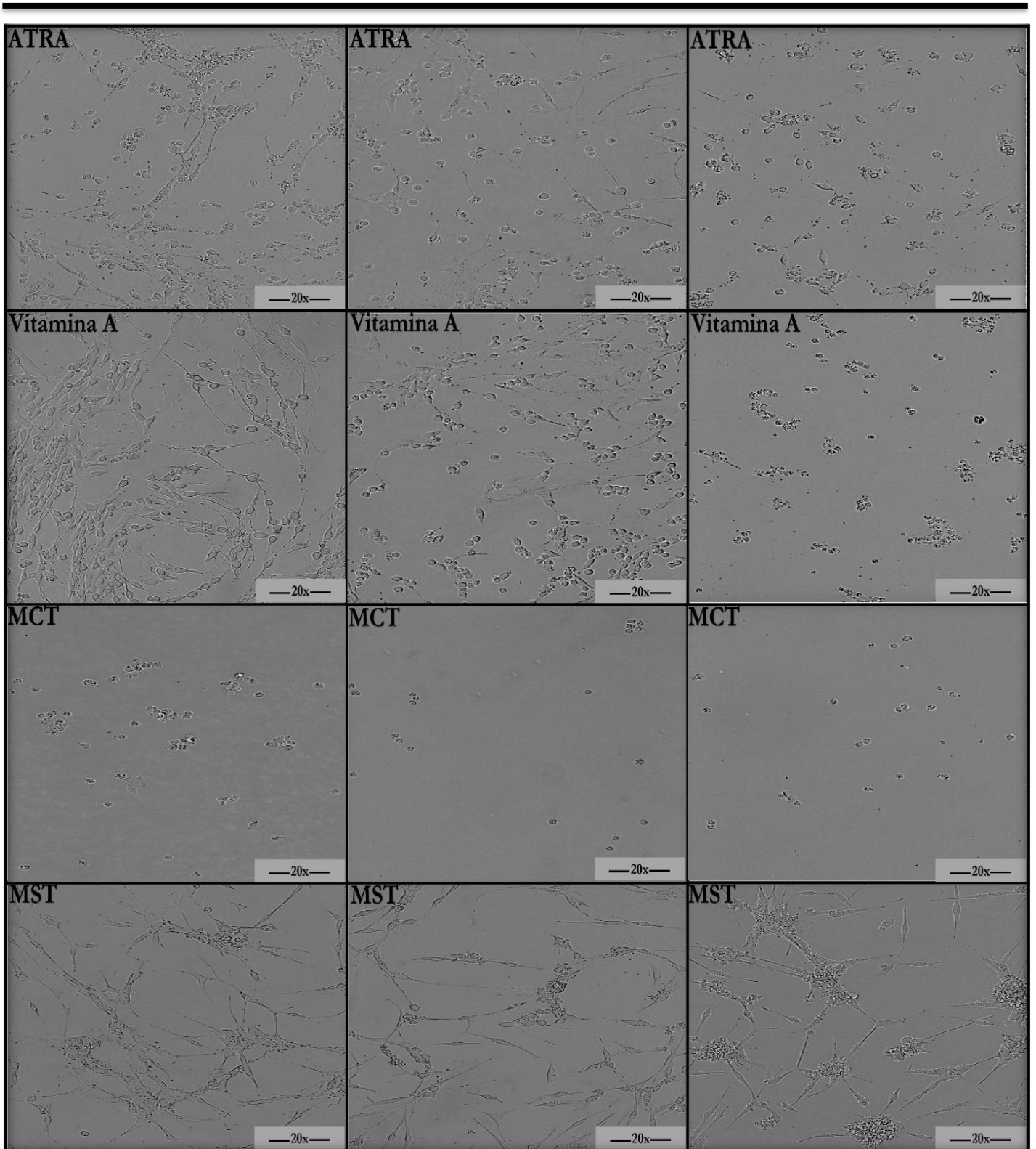


Figura 13. Morfología celular en la línea celular de glioma de rata C6. Las células de glioma C6 fueron tratadas con ATRA (10 μ M), Vitamina A (1010 IU), la combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA, Teofilina), y la combinación sin teofilina (DMSO, VPA, ATRA), a tiempos largos (5, 10 y 15 días). Imágenes tomadas por microscopia de campo claro con un aumento de 20X.

VIABILIDAD CELULAR EN LA LÍNEA CELULAR DE GLIOMA DE RATA C6 POR MTT

Para analizar la viabilidad celular de las células de glioma C6 sometidas al tratamiento con DMSO (1%), teofilina (1 mM), VPA (1 mM), ATRA (10 μ M), vitamina A (1010 IU), la combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA, teofilina) y la combinación sin teofilina (DMSO, VPA y ATRA) a tiempos cortos (24, 48 y 72 horas) y tiempos largos (5, 10 y 15 días), se realizó el ensayo colorimétrico de MTT determinado por Mosman[®] (Figura 14). El tratamiento a tiempos cortos con DMSO, ATRA y vitamina A no muestran una disminución en la viabilidad celular con respecto al control; sin embargo, el tratamiento con teofilina, así como la combinación de todos los compuestos induce un efecto citotóxico a partir de las 24 horas de tratamiento. El tratamiento a los 10 de exposición muestra una disminución en el porcentaje de viabilidad celular con DMSO (61%), VPA (45%), ATRA (43%), vitamina A (36%), siendo un efecto citotóxico similar la exposición de las células C6 con los distintos tratamientos a los 15 días (Figura 14).

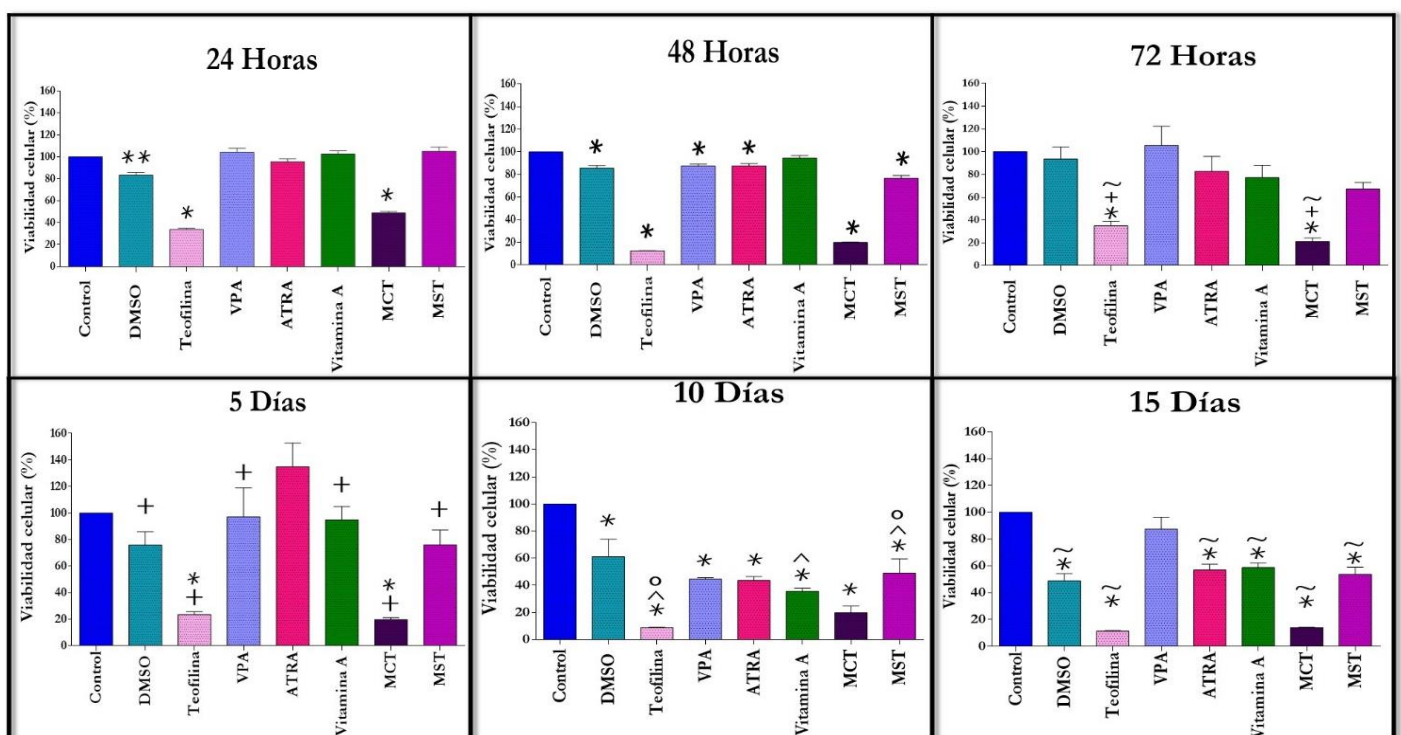


Figura 14. Viabilidad celular por MTT. Efecto sobre la viabilidad celular por MTT de las células de glioma C6 sometidas al tratamiento con DMSO, VPA, ATRA, teofilina y vitamina A, la combinación (ATRA, DMSO, teofilina y VPA) y la combinación sin teofilina, a tiempos cortos y largos. Los valores representan la media aritmética \pm SEM para tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado usando un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y post-hoc (Tukey). Control vs tratamientos (* $p \leq 0.05$ y ** $p \leq 0.01$). Ácido retinoico vs tratamientos (+ $p \leq 0.05$). VPA vs tratamientos ($\sim p \leq 0.05$). DMSO vs tratamientos ($\wedge p \leq 0.05$). MST vs tratamientos ($\circ p \leq 0.05$).

DETECCIÓN DE CICLO CELULAR (YODURO DE PROPIDIO) POR CITOMETRÍA DE FLUJO

El efecto de los tratamientos con DMSO (1%), teofilina (1 mM), VPA (1 mM), ATRA (10 μ M), vitamina A (1010 IU), la combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA y teofilina) y la combinación sin teofilina se evaluó sobre las fases del ciclo celular en células de glioma C6. Los resultados obtenidos con el tratamiento con la teofilina y la combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA y teofilina) en la línea celular de glioma de rata C6 muestran un incremento en la fase SubG0 del ciclo celular a partir de 24 horas de tratamiento, el incremento de esta fase es indicativa de muerte celular. Los tratamientos a tiempo largos con VPA, ATRA, DMSO y vitamina A incrementan la fase SubG0 del ciclo celular. No se mostraron cambios significativos en las otras fases del ciclo celular entre el control y los distintos tratamientos, sugiriendo que los compuestos evaluados no inducen arresto del ciclo del celular. El porcentaje de células en diferentes fases del ciclo celular fueron determinadas utilizando el programa Flow Jo ver.7.6.1.

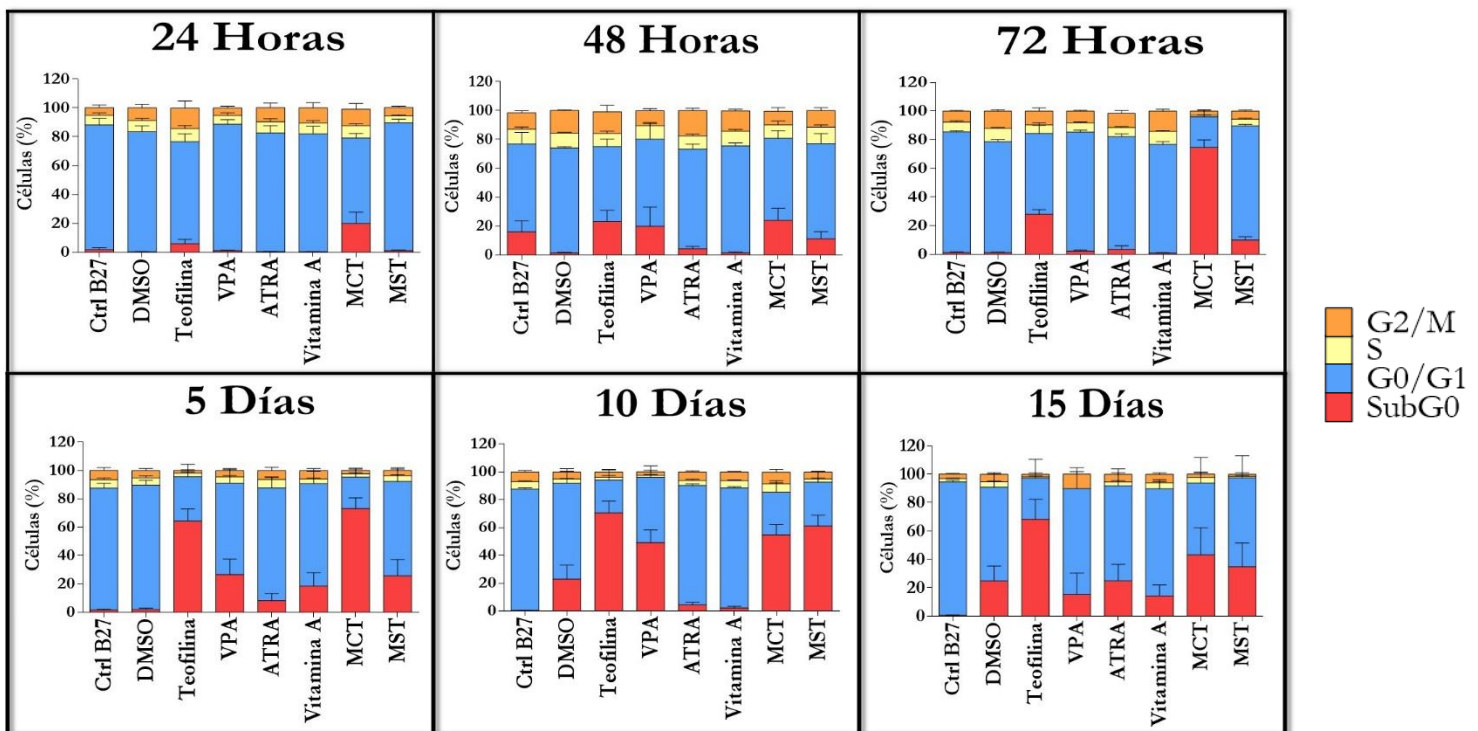


Figura 15. Efecto de los compuestos inductores de diferenciación sobre las fases del ciclo celular en células de glioma de rata C6. Se realizó el tratamiento con los compuestos DMSO, ATRA, VPA, vitamina A, teofilina, la combinación de los compuestos (ATRA, DMSO, VPA, teofilina) y la combinación sin teofilina, a tiempos cortos y tiempos largos. Las células C6 fueron colectadas, teñidas con yoduro de propidio (PI) y analizadas en el FACSCalibur. Los valores representan la media aritmética \pm SEM para dos experimentos independientes realizados por triplicado.

EXPRESIÓN DE MARCADORES DE DIFERENCIACIÓN ESPECÍFICOS DE LINAJE

El análisis de expresión de marcadores de células troncales (nestina) y de diferenciación específico de linaje neural (Tuj-1) y astrocítico (GFAP) en células de glioma de rata C6 sometidas al tratamiento con DMSO (1%), VPA (1 mM), ATRA (10 μ M), vitamina A (1010 IU) y la combinación sin teofilina (DMSO, ATRA, VPA), a distintos tiempos, se realizó por citometría de flujo. La figura 16 muestra que no existen cambios en la expresión del marcador nestina; mientras que la expresión de Tuj-1 se incrementa solo a 10 días en el tratamiento con vitamina A, sin observar cambios en los demás tratamientos a los tiempos evaluados (Figura 17). Se observa que al quinto día de tratamiento con ATRA existe un incremento en la expresión del marcador GFAP con respecto al control, sugiriendo que la población celular se diferencia hacia el linaje astrocítico (Figura 18).

EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE LINAJE TRONCAL: NESTINA

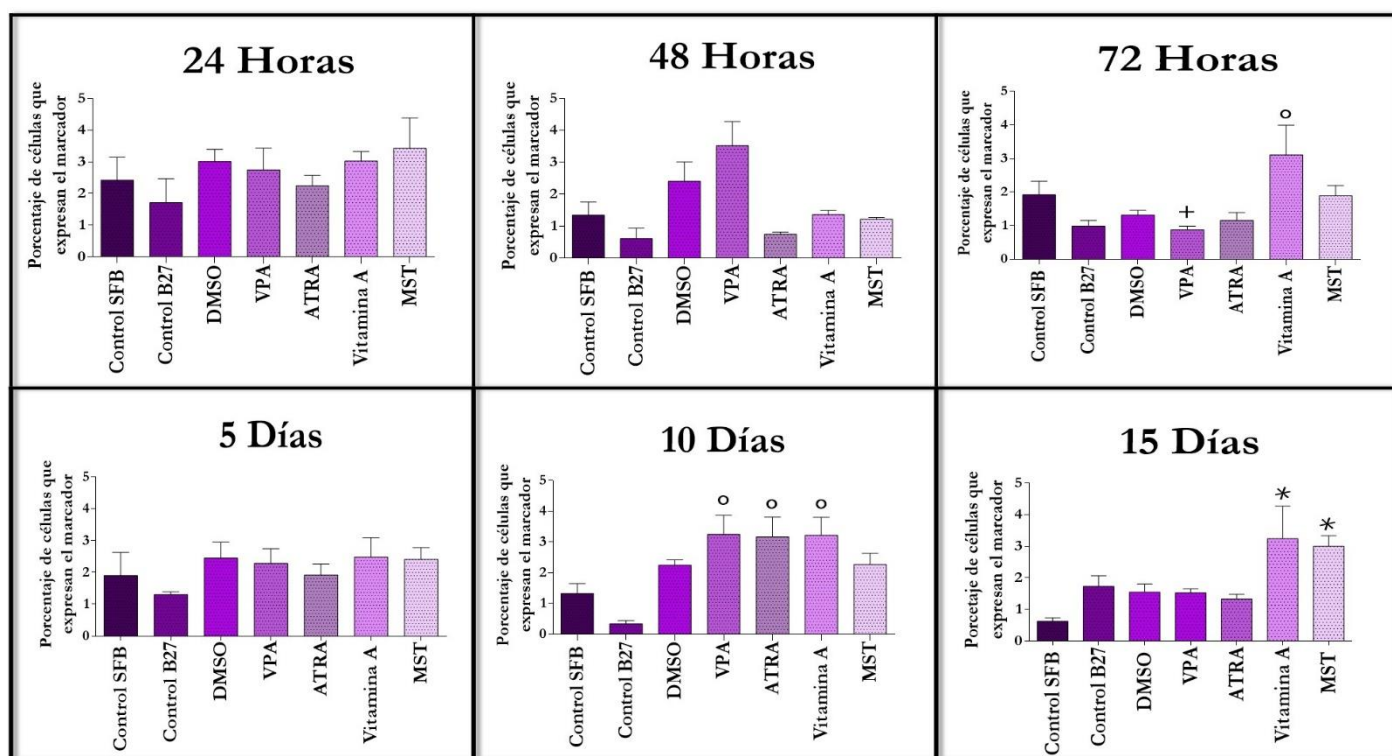


Figura 16. Expresión del marcador troncal nestina. La expresión del marcador de linaje troncal nestina, con el tratamiento con los compuestos DMSO, ATRA, VPA, vitamina A, teofilina, la combinación de los compuestos (ATRA, DMSO, VPA, teofilina) y la combinación sin teofilina, se evaluó a tiempos cortos y tiempos largos de exposición. Los valores representan la media aritmética \pm SEM para un experimento con tres replicas independientes. El análisis estadístico fue realizado usando un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y post-hoc (Tukey). Control SFB vs tratamientos (* $p \leq 0.05$). Control B27 vs tratamientos ($^{\circ} p \leq 0.05$). Vitamina A vs tratamientos (+ $p \leq 0.05$).

EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE LINAJE NEURAL: TUJ-1

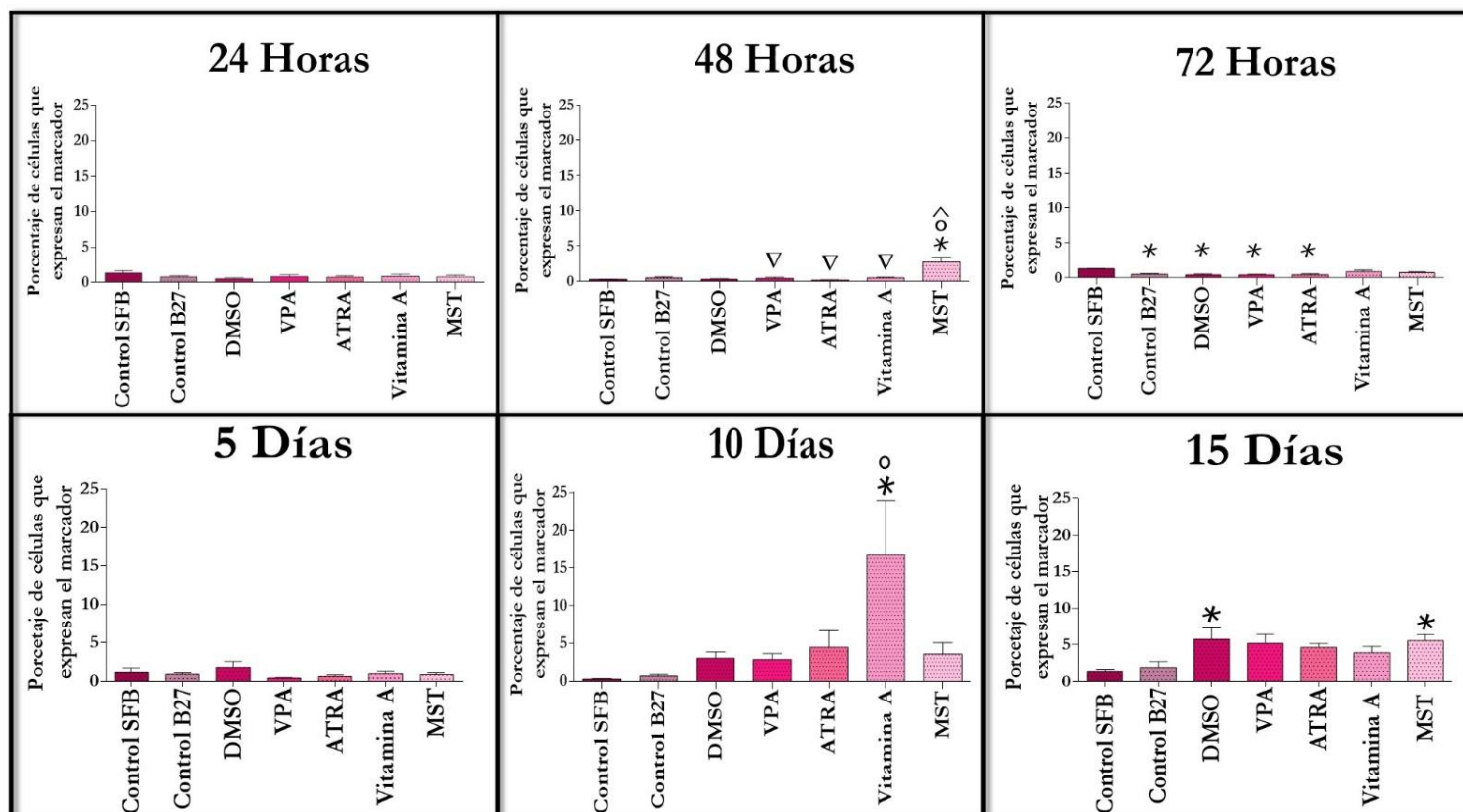


Figura 17. Expresión del marcador TUJ-1. La expresión del marcador de linaje neural TUJ-1, se evaluó con el tratamiento con los compuestos DMSO, ATRA, VPA, vitamina A, teofilina, la combinación de los compuestos (ATRA, DMSO, VPA, teofilina) y la combinación sin teofilina, a tiempos cortos y tiempos largos. Los valores representan la media aritmética \pm SEM para un experimento con tres replicas independientes. El análisis estadístico fue realizado usando un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y post-hoc (Tukey). Control SFB vs tratamientos ($*p \leq 0.05$). Control B27 vs tratamientos ($^{\circ} p \leq 0.05$). DMSO vs tratamientos ($^{\wedge} p \leq 0.05$). MST vs tratamientos ($\nabla p \leq 0.05$).

EXPRESIÓN DEL MARCADOR DE LINAJE ASTROCÍTICO: GFAP

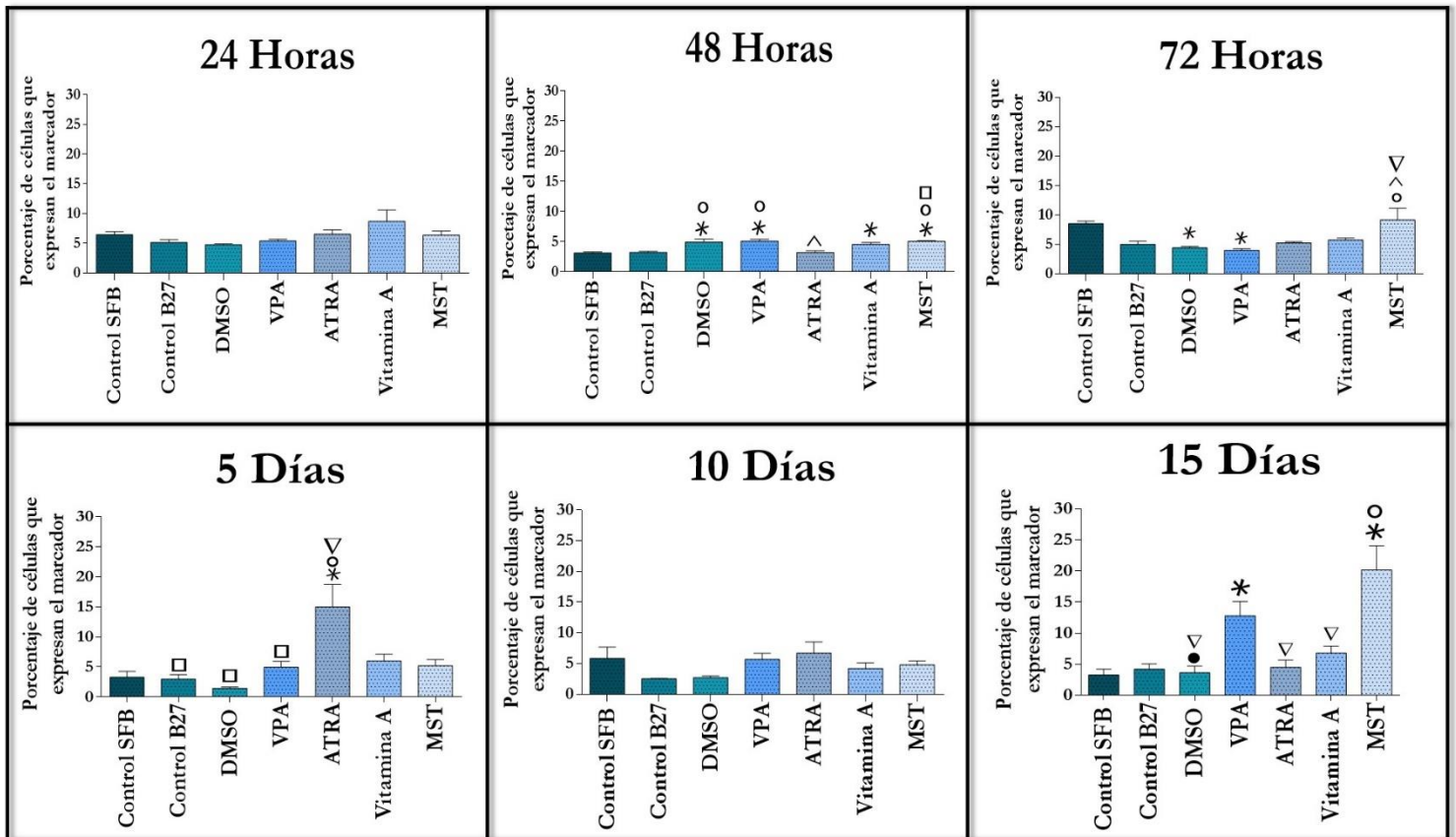
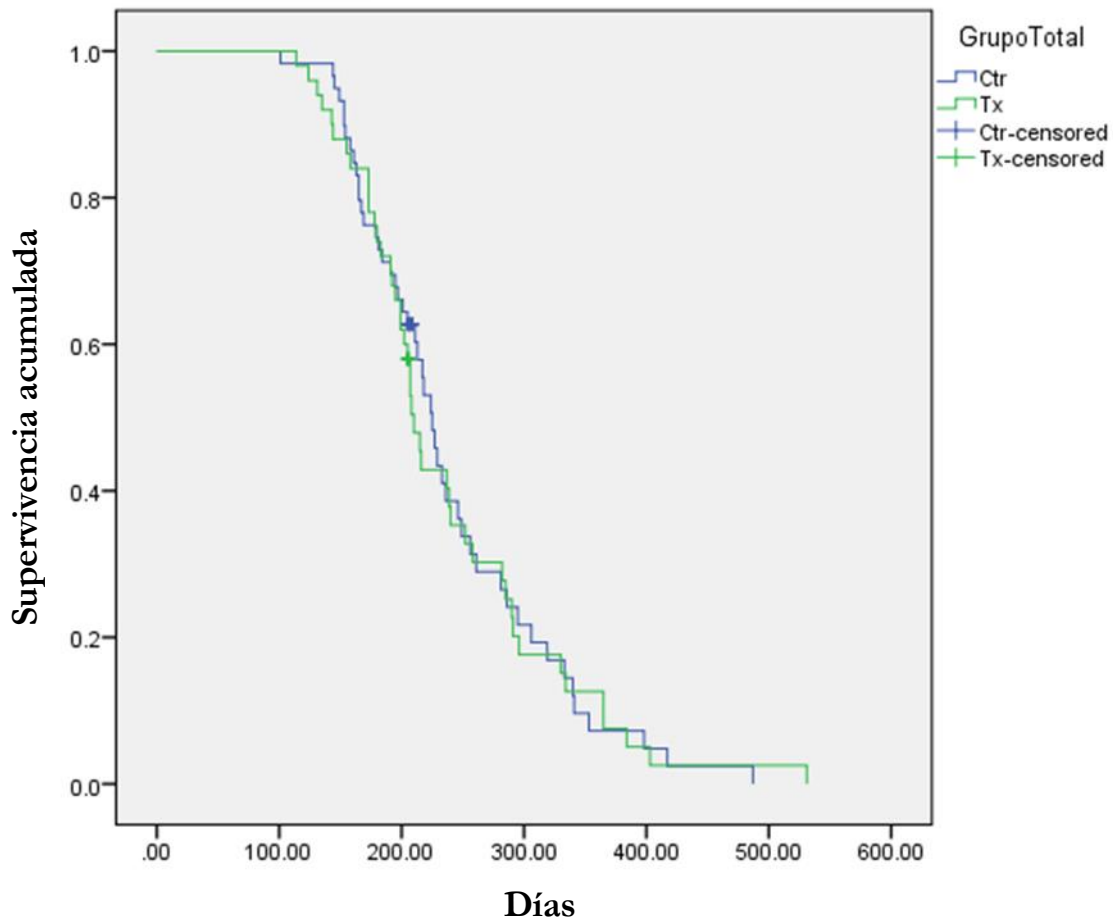


Figura 18. Expresión del marcador GFAP. La expresión del marcador de linaje astrocítico GFAP, se evaluó en células de glioma de rata C6 expuestas a los compuestos DMSO, ATRA, VPA, vitamina A, teofilina, la combinación de los compuestos (ATRA, DMSO, VPA, teofilina) y la combinación sin teofilina, a tiempos cortos y tiempos largos. Los valores representan la media aritmética \pm SEM para un experimento con tres replicas independientes. El análisis estadístico fue realizado usando un análisis de varianza (ANOVA de una vía) y post-hoc (Tukey). Control SFB vs tratamientos (* $p \leq 0.05$). Control B27 vs tratamientos (° $p \leq 0.05$). ATRA vs tratamientos (□ $p \leq 0.05$). VPA vs tratamientos (● $p \leq 0.05$). DMSO vs tratamientos (^ $p \leq 0.05$). MST vs tratamientos (∇ $p \leq 0.05$).

SUPERVIVENCIA DE RATAS WISTAR EXPUESTAS A ENU

El análisis de supervivencia se realizó a través de la curva acumulativa de supervivencia de Kaplan–Meier en ratas expuestas a ENU. Se utilizaron 50 ratas por cada grupo experimental. No se observaron cambios significativos en la supervivencia de ambos grupos (Figura 19).

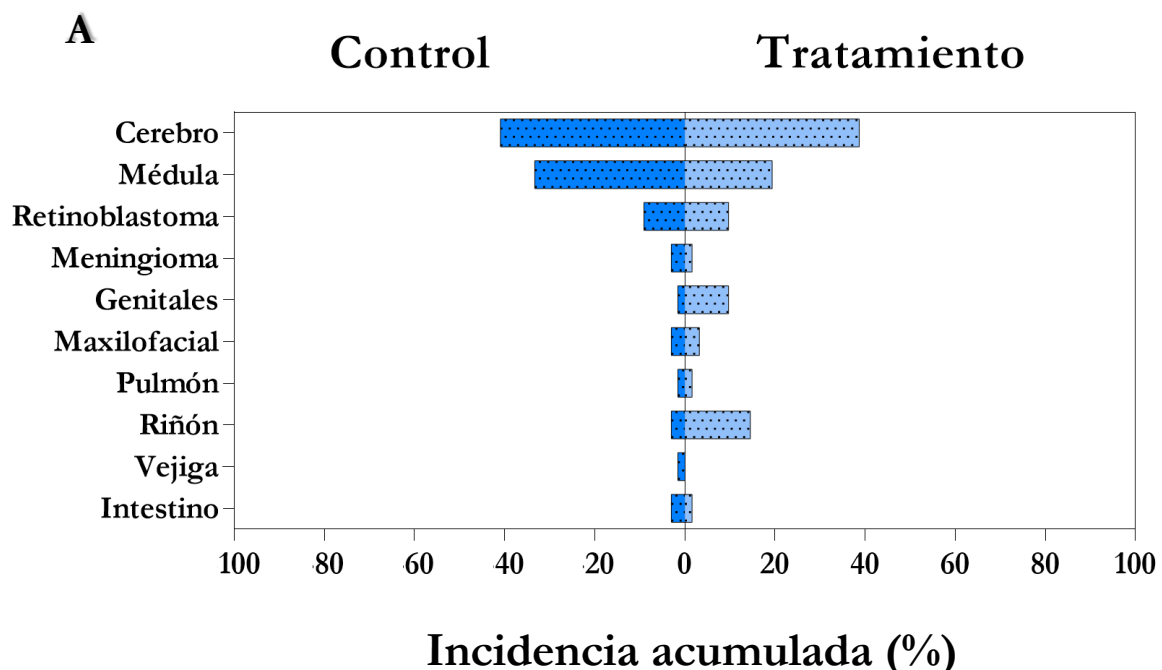


Comparaciones generales			
	X ²	df	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	0.001	1	0.976*
Prueba de distribuciones de igualdad de supervivencia para los diferentes niveles del Grupo H.			

Figura 19. Análisis de supervivencia. Curva acumulativa de supervivencia de Kaplan-Meier en ratas Wistar expuestas a ENU. Administración vía oral con la combinación de los agentes inductores de diferenciación a partir del día 70 hasta que presentaron manifestaciones tumorales. Se utilizaron 50 ratas por grupo experimental.

INCIDENCIA ACUMULADA DE TUMORES DE RATAS WISTAR EXPUESTAS A ENU

La incidencia acumulada de tumores cerebrales fue del 41% en el grupo control con respecto al grupo terapéutico (39%), mostrando un comportamiento similar entre ambos grupos (Figura 20-A); en cuanto a la incidencia de tumores presentados en medula se registró un 33% en el grupo control, mientras que el grupo terapéutico fue del 20%. Se realizó una prueba X^2 , indicando una significancia (* $p < 0.01$) entre ambos grupos experimentales (Figura 20-B).



B

Tabla analizada	Datos de tendencia
X^2	
X^2, df	20,32, 9
Valor de P	0,0160*
Resumen de valor de P	*
Uno o dos lados	NA
¿Estadísticamente significativa? ($\alpha < 0.05$)	SI
Datos analizados	
Número de filas	10
Número de columnas	2

Figura 20. Incidencia acumulada (%). (A) Determinación de la incidencia acumulada de los tumores presentados en el grupo control y en el grupo tratado con la combinación de los agentes inductores de diferenciación (DMSO, VPA, vitamina A y teofilina).

DISCUSIÓN

Es de gran importancia buscar nuevas alternativas de tratamiento contra neoplasias del SNC, por lo que el presente proyecto apoyó el paradigma de transformación de células tumorales hacia estadios de menor malignidad. Durante este trabajo se evaluó la eficacia terapéutica de la combinación de diferentes compuestos (DMSO, VPA, ATRA y teofilina) que poseen propiedades mediadoras de la diferenciación celular. Los compuestos utilizados son relativamente inocuos, económicos, farmacológicamente probados en otros padecimientos, y recientemente se han descrito sus propiedades inductoras de diferenciación.

El retinol y sus derivados han sido ampliamente utilizados como agentes quimioterapéuticos que inhiben blancos moleculares específicos implicados en la carcinogénesis^{102,103}. Su combinación con algunos de los inductores de diferenciación propuestos, ha mostrado una capacidad mediadora de diferenciación en diversas líneas celulares de glioma, entre ellas las líneas U87MG, T98G y células troncales carcinogénicas^{104,105}. Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que la vitamina A y el ácido retinoico no inducen cambios morfológicos en su tamaño o forma con respecto al control basal a tiempos cortos de exposición (24,48 y 72 horas) en la línea celular de glioma C6 (Figura 10). Además, se observó que la vitamina A y ácido retinoico no inducen arresto en el ciclo celular (Figura 14), tal como lo reportado por Shi *et al.*, 2013, donde observaron que la línea celular U87 de glioma tratada con ATRA a distintas concentraciones muestra que no existe arresto en ciclo celular con respecto al control, observando una proporción de células en la fase G0/G1 en el rango de 81.90-87.20% comparado con la expresión (83.65%) del grupo de control. A partir del quinto día de tratamiento con ATRA se observa un incremento en la expresión de GFAP; mientras que el tratamiento con la Vitamina A induce la expresión del marcador de linaje neural TUJ-1 a los 10 días de tratamiento, a tiempos posteriores se observa una disminución de la expresión de estos marcadores (Figura 16-17). No obstante, se observa un efecto citotóxico a partir del décimo día de exposición (Figura 13), lo cual correlaciona con el incremento en la fase SubG0 del ciclo celular a dichos tiempos de tratamiento con ATRA y vitamina A (Figura 14), este comportamiento puede ser atribuido a la activación de mecanismos apoptóticos, tal como lo sugieren los trabajos de Das *et al.*, 2008 y Liang *et al.*, 2015.

El VPA es un fármaco que inhibe la desacetilasa de histonas^{79,80}. Varios estudios han evaluado el potencial terapéutico del VPA en el tratamiento contra gliomas, a través de la modulación de diferenciación de células neoplásicas^{79,81,82}. En este trabajo se observó que las células expuestas con la concentración 1mM de VPA inician con cambios morfológicos a partir de 72 horas de exposición, entrando a una fase de alargamiento diferente al control (Figura 10).

A partir del quinto día de exposición con VPA, comienza la formación de neuritas, similares a lo reportado por Riva *et al.*, en sus trabajos realizados en 2014 y 2016. Sin embargo, se observa una disminución en la viabilidad celular (Figura 13) a partir del décimo día de tratamiento, esto correlaciona con los resultados obtenidos en el análisis de ciclo celular, donde existe un incremento en la fase Sub G0 de las células C6 expuestas a este fármaco (Figura 14). Estos resultados apoyan a lo señalado por Benítez *et al.*, 2008, empleando la concentración de 1mM de VPA disminuye la proliferación celular en la línea celular C6 de glioma de rata a tiempos de 24, 48 y 72 horas después del tratamiento.

El DMSO es un compuesto comúnmente empleado como vehículo terapéutico⁹⁰. Recientemente se ha descrito que interviene como modulador epigenético induciendo cambios en el estado de metilación del ADN⁹². El DMSO ha sido reportado como modulador de crecimiento y diferenciación hepática⁹². Sin embargo, existen pocos reportes que utilicen este compuesto como agente quimioterapéutico contra gliomas. Este trabajo mostró que el DMSO no induce cambios morfológicos en su tamaño y forma en las células de glioma C6 con respecto al control (Figura 10), no induce efectos citotóxicos en las células tratadas (Figura 13), ni arresto en el ciclo celular, este resultado difiere de lo reportado por Fiore & Degrassi, 1999, donde describen que este compuesto arresta el ciclo celular en la fase G0/G1, sugieren que el incremento de cadherinas y los genes p27 y Bcl-2 están implicados en el control del crecimiento y la adhesión celular, ocasionando el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1. Además, al realizar el análisis de expresión de marcadores de células troncales y diferenciación, no observamos cambios en la expresión con respecto al control (Figuras 15-17)

La teofilina es un estimulante del SNC y un broncodilatador, que interviene como antagonista no selectivo de los receptores de la adenosina A₁ y A_{2A} e inhibe las fosfodiesterasas (PDE), dirigiendo la acumulación de AMPc¹⁰⁹. Las metilxantinas han sido reportadas como inductores de apoptosis e inhibidores de la proliferación de células tumorales¹¹⁴. Sin embargo, existen pocos estudios que intervengan sobre la diferenciación de esta población celular¹¹⁰. Los resultados obtenidos con la concentración 1mM de teofilina en la línea celular de glioma de rata C6 muestran un efecto citotóxico a partir de 24 horas de tratamiento, así como un incremento de en la fase SubG0 del ciclo celular, esta fase es indicativa de muerte celular (Figura 15). Estos resultados correlacionan con lo reportado por Eun-Yi *et al.*, 2012, donde mostraron un comportamiento dosis-dependiente de la teofilina sobre la viabilidad de las líneas celulares de glioma de humano A172 y U87MG. En los años 70 Masakatsu & Sato reportaron en sus trabajos que la teofilina a una concentración 1mM induce cambios morfológicos que asemejan a células gliales, así como un incremento en la expresión del marcador glial S-100 en células de glioblastoma humanas y células de glioblastoma inducidas por metilcolantreno en la cepa C57 de ratón.

Estas investigaciones difieren de los resultados obtenidos en este trabajo, atribuido al comportamiento heterogéneo entre un cultivo primario y una línea celular, explicando la susceptibilidad citotóxica de la línea celular C6 a la concentración 1mM de teofilina, lo que sugiere el uso de este fármaco a concentraciones menores, tal como lo reportado por Takanaga *et al.*, 2004 donde empleó la concentración de 0.25 mM teofilina en combinación de Bt₂AMP, este origina la fosforilación retardada del transductor de señal y activador de la transcripción 3 (STAT3) esencial para la activación del promotor GFAP inducida por AMPc promoviendo la diferenciación astrocítica de la línea celular de glioma de rata C6.

Recientemente Chu et al., 2015 han reportado que el tratamiento con la combinación de 1 μ M ATRA y 1mM VPA disminuye la expresión de GFAP e incrementa la expresión de TUJ-1 y MAP-2 sugiriendo que esta combinación induce la diferenciación de CTC hacia linaje neural. En este proyecto se evaluó el efecto *in vitro* de la combinación de los agentes inductores de diferenciación en la línea de glioma C6. Se observó un efecto citotóxico de la mezcla a partir de 24 horas de exposición (Figura 14), este efecto fue atribuido al uso de teofilina. Se realizó un nuevo tratamiento descartando el uso de este compuesto. La combinación del ATRA, DMSO y VPA induce la formación de neuritas similares a las desarrolladas en las células expuestas al VPA a partir de 72 horas (Figura 11). Además, de incrementar la expresión del marcador molecular GFAP a quince días de exposición (Figura 18), sugiriendo que esta combinación estimula mecanismos de diferenciación de células C6 hacia el linaje astrocítico.

Actualmente, se ha descrito que el retinol actúa como un agente quimiopreventivo, incrementando la supervivencia y el tiempo de desarrollo tumoral en ratas Sprague-Dawley expuestas a ENU. Sin embargo, el trabajo de Ross et al., 1998 sugiere que la administración crónica de vitamina A no disminuye la incidencia y el grado de malignidad tumoral. En el presente trabajo se utilizó la combinación de compuestos como una propuesta quimiopreventiva para evitar o retardar el desarrollo de los tumores inducidos con ENU, al estimular la diferenciación de células blásticas gliales al inicio de la transformación tumoral. No obstante, en este trabajo no se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la supervivencia y tiempo de desarrollo de tumores entre ambos grupos experimentales (Figura 18), mostrando una incidencia acumulada de tumores cerebrales del 52% en el grupo control con respecto al grupo terapéutico (48%) (Figura 19). Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la combinación de los diferentes agentes no ejerce un efecto quimiopreventivo en ratas expuestas a ENU que permita la modulación de diferenciación de células neoplásicas, esto atribuido a una posible acción inhibitoria entre los mecanismos de acción de los fármacos.

CONCLUSIÓN

De acuerdo con la hipótesis planteada para el desarrollo de esta Tesis de Licenciatura, se obtuvieron las siguientes conclusiones:

- I.** La combinación de los compuestos (DMSO, VPA, ATRA y teofilina) induce un efecto citotóxico a partir de las 24 horas de tratamiento, lo que correlaciona con el incremento de la fase SubG0 del ciclo celular.
- II.** La combinación de los compuestos sin teofilina (ATRA, DMSO y VPA) induce la expresión del marcador GFAP a los 15 días, lo que sugiere que esta combinación induce la diferenciación de las células de glioma de rata C6 hacia un linaje astrocítico.
- III.** Los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que la combinación de los diferentes agentes no ejerce un efecto quimiopreventivo en ratas expuestas a ENU, hay una disminución en la incidencia de tumores y no existe un incremento en la supervivencia de las ratas.

PERSPECTIVAS

- I.** Realizar la curva de citotoxicidad de la teofilina en la línea celular de glioma C6.
- II.** Determinar por inmunofluorescencia el efecto de los agentes inductores de diferenciación sobre la expresión de los marcadores de diferenciación, en la línea de glioma C6.
- III.** Evaluar el efecto *in vivo* de los agentes de diferenciación (DMSO, teofilina, VPA y ATRA), en el modelo subcutáneo de glioma C6.

LITERATURA CITADA

1. Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev.* 2010;20(4):327-348. doi:10.1007/s11065-010-9148-4.
2. Bayona Rodríguez F. Desarrollo embrionario del sistema nervioso central y órganos de los sentidos : revisión Embryonic Central Nervous System and Sense Organ Development : Review. *Univ Odontológica.* 2012;31(66):125-132.
3. Rodríguez Á, Domínguez S, Cantín M, Rojas M, Rodríguez AR. Embriología del Sistema Nervioso Nervous System Embriology. *Int J Med Surg Sci Int J Med Surg Sci.* 2015;2(21):385-400.
4. Fernández-Sánchez V, Mayani H. BMP4: Importante regulador del desarrollo embrionario y la hematopoyesis. *Rev Investig Clin.* 2008;60(1):68-74.
5. Doetsch F, Caillé I, Lim DA, García-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Subventricular zone astrocytes are neural stem cells in the adult mammalian brain. *Cell.* 1999;97(6):703-716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10380923>.
6. Lizana Arce P, Almagiá Florez AA. Principios de Neuroanatomía: Desarrollo del Sistema Nervioso. 2012:1-38.
7. Ma DK, Ming G-L, Song H. Glial influences on neural stem cell development: cellular niches for adult neurogenesis. *Curr Opin Neurobiol.* 2005;15(5):514-520. doi:10.1016/j.conb.2005.08.003.
8. Capilla-Gonzalez V, Gil-Perotin S, Ferragud A, Bonet-Ponce L, Canales JJ, Garcia-Verdugo JM. Exposure to N-ethyl-N-nitrosourea in adult mice alters structural and functional integrity of neurogenic sites. *PLoS One.* 2012;7(1):e29891. doi:10.1371/journal.pone.0029891.
9. Gonçalves JT, Schafer ST, Gage FH. Adult Neurogenesis in the Hippocampus: From Stem Cells to Behavior. *Cell.* 2016;167(4):897-914. doi:10.1016/j.cell.2016.10.021.
10. Urbán N, Guillemot F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. *Front Cell Neurosci.* 2014;8. doi:10.3389/fncel.2014.00396.
11. Nowakowski TJ, Pollen AA, Sandoval-Espinosa C, Kriegstein AR. Transformation of the Radial Glia Scaffold Demarcates Two Stages of Human Cerebral Cortex Development. *Neuron.* 2016;91(6):1219-1227. doi:10.1016/j.neuron.2016.09.005.
12. Dell'Albani P. Stem Cell Markers in Gliomas. *Neurochem Res.* 2008;33(12):2407-2415. doi:10.1007/s11064-008-9723-8.

-
13. Capilla-Gonzalez V, Gil-Perotin S, Ferragud A, Bonet-Ponce L, Canales JJ, Garcia-Verdugo JM. Exposure to N-ethyl-N-nitrosourea in adult mice alters structural and functional integrity of neurogenic sites. *PLoS One*. 2012;7(1):e29891. doi:10.1371/journal.pone.0029891.
 14. Yap MS, Nathan KR, Yeo Y, et al. Neural differentiation of human pluripotent stem cells for nontherapeutic applications: Toxicology, pharmacology, and in vitro disease modeling. *Stem Cells Int*. 2015;2015. doi:10.1155/2015/105172.
 15. Mertens J, Marchetto MC, Bardy C, Gage FH. Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(7):424-437. doi:10.1038/nrn.2016.46.
 16. Dell'Albani P. Stem Cell Markers in Gliomas. *Neurochem Res*. 2008;33(12):2407-2415. doi:10.1007/s11064-008-9723-8.
 17. Farrell K, Borazjani A, Damaser M, Kothapalli CR. Differential regulation of NSC phenotype and genotype by chronically activated microglia within cocultures. *Integr Biol (Camb)*. 2016;8(11):1145-1157. doi:10.1039/c6ib00126b.
 18. Eng LF, Ghirnikar RS, Lee YL. Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem Res*. 2000;25(9-10):1439-1451. <http://link.springer.com/10.1007/s11064-008-9723-8>.
 19. Alfaro-Cervello C, Soriano-Navarro M, Mirzadeh Z, Alvarez-Buylla A, Garcia-Verdugo JM. Biciliated ependymal cell proliferation contributes to spinal cord growth. *J Comp Neurol*. 2012;520(15):3528-3552. doi:10.1002/cne.23104.
 20. Allen NJ, Barres BA. Neuroscience: Glia — more than just brain glue. *Nature*. 2009;457(7230):675-677. doi:10.1038/457675a.
 21. Eroglu C, Barres BA. Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*. 2010;468(7321):223-231. doi:10.1038/nature09612.
 22. Forsyth R, Fray A, Boutelle M, Fillenz M, Middleditch C, Burchell A. A role for astrocytes in glucose delivery to neurons? *Dev Neurosci*. 1996;18(5-6):360-370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8940607>.
 23. Falkowska A, Gutowska I, Goschorska M, Nowacki P, Chlubek D, Baranowska-Bosiacka I. Energy Metabolism of the Brain, Including the Cooperation between Astrocytes and Neurons, Especially in the Context of Glycogen Metabolism. *Int J Mol Sci*. 2015;16(11):25959-25981. doi:10.3390/ijms161125939.
 24. Yeung MSY, Zdunek S, Bergmann O, et al. Dynamics of oligodendrocyte generation and myelination in the human brain. *Cell*. 2014;159(4):766-774. doi:10.1016/j.cell.2014.10.011.
 25. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.

-
26. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100(1). doi:10.1007/s00262-010-0968-0.
 27. Fragoso LR, Baltasar EH, Esparza JAR. El ciclo celular: características, regulación e importancia en el cáncer. *Biotecnol Apl*. 2004;21(2):60–69. https://www.researchgate.net/profile/Jorge_Reyes_Esparza/publication/255639866_El_ciclo_celular_caracteristicas_regulacion_e_importancia_en_el_cancer/links/53d11cc50cf2a7fbb2e61f43.pdf.
 28. Cajaraville G, Carreras MJ, Massó J, Tamés MJ. Oncología. In: *Libro de Farmacia Hospitalaria*. ; 2002:1171-1226.
 29. De Biología F, Baker M, Díaz S, Grupo L. Protooncogenes, Oncogenes Y Genes Supresores De Tumor. *UNIVERSIDAD DE LA GUN a*. 2013:1-15.
 30. de la Garza Salazar JG, Juárez Sánchez P. *El Cáncer*; 2014.
 31. Gallagher EJ, LeRoith D. Obesity and Diabetes: The Increased Risk of Cancer and Cancer-Related Mortality. *Physiol Rev*. 2015;95(3):727-748. doi:10.1152/physrev.00030.2014.
 32. Louis DN. Molecular Pathology of Malignant Gliomas. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2006;1(1):97-117. doi:10.1146/annurev.pathol.1.110304.100043.
 33. Strojnik T, Duh D, Lah TT. Prevalence of Neurotropic Viruses in Malignant Glioma and Their Oncomodulatory Potential. *In Vivo*. 31(2):221-229. doi:10.21873/invivo.11049.
 34. Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch*. July 2017. doi:10.1007/s00428-017-2181-4.
 35. Lopez-Gonzalez MA, Sotelo J. Brain tumors in Mexico: characteristics and prognosis of glioblastoma. *Surg Neurol*. 2000;53(2):157-162. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10713194>.
 36. Aguirre-Cruz L, Rangel-López E, Cruz-Aguilera DL de la, et al. Historical distribution of central nervous system tumors in the Mexican National Institute of Neurology and Neurosurgery. *Salud Pública Mex*. 2016;58(2):171-178. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27557375>.
 37. Chen W, Silverman DHS. Advances in evaluation of primary brain tumors. *Semin Nucl Med*. 2008;38(4):240-250. doi:10.1053/j.semnuclmed.2008.02.005.
 38. Fouke SJ, Benzinger T, Gibson D, Ryken TC, Kalkanis SN, Olson JJ. The role of imaging in the management of adults with diffuse low grade glioma: A systematic review and evidence-based clinical practice guideline. *J Neurooncol*. 2015;125(3):457-479. doi:10.1007/s11060-015-1908-9.
 39. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol*. 2014;15(9):e395-403. doi:10.1016/S1470-2045(14)70011-7.

-
40. Rasmussen BK, Hansen S, Laursen RJ, et al. Epidemiology of glioma: clinical characteristics, symptoms, and predictors of glioma patients grade I-IV in the the Danish Neuro-Oncology Registry. *J Neurooncol.* 2017;135(3):571-579. doi:10.1007/s11060-017-2607-5.
 41. Palanichamy K, Chakravarti A. Diagnostic and Prognostic Significance of Methionine Uptake and Methionine Positron Emission Tomography Imaging in Gliomas. *Front Oncol.* 2017;7:257. doi:10.3389/fonc.2017.00257.
 42. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-820. doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
 43. Ferris SP, Hofmann JW, Solomon DA, Perry A. Characterization of gliomas: from morphology to molecules. *Virchows Arch.* July 2017. doi:10.1007/s00428-017-2181-4.
 44. Johnson M, O'Connell M, Walter K, Silberstein H. mTOR activation is increased in pilocytic astrocytomas from older adults compared with children. *Surg Neurol Int.* 2017;8(1):85. doi:10.4103/sni.sni_367_16.
 45. Sharma I, Singh A, Sharma KC, Saxena S. Gene Expression Profiling of Chemokines and Their Receptors in Low and High Grade Astrocytoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2017;18(5):1307-1313. doi:10.22034/APJCP.2017.18.5.1307.
 46. Bryukhovetskiy I, Manzhulo I, Mischenko P, et al. Cancer stem cells and microglia in the processes of glioblastoma multiforme invasive growth. *Oncol Lett.* 2016;12(3):1721-1728. doi:10.3892/ol.2016.4886.
 47. Cho D-Y, Lin S-Z, Yang W-K, et al. The role of cancer stem cells (CD133(+)) in malignant gliomas. *Cell Transplant.* 2011;20(1):121-125. doi:10.3727/096368910X532774.
 48. Dimov I, Tasic-Dimov D, Conic I, Stefanovic V. Glioblastoma Multiforme Stem Cells. *Sci World J.* 2011;11:930-958. doi:10.1100/tsw.2011.42.
 49. Bryukhovetskiy I, Manzhulo I, Mischenko P, et al. Cancer stem cells and microglia in the processes of glioblastoma multiforme invasive growth. *Oncol Lett.* 2016;12(3):1721-1728. doi:10.3892/ol.2016.4886.
 50. Cho D-Y, Lin S-Z, Yang W-K, et al. The role of cancer stem cells (CD133(+)) in malignant gliomas. *Cell Transplant.* 2011;20(1):121-125. doi:10.3727/096368910X532774.
 51. Alvarez AA, Field M, Bushnev S, Longo MS, Sugaya K. The effects of histone deacetylase inhibitors on glioblastoma-derived stem cells. *J Mol Neurosci.* 2015;55(1):7-20. doi:10.1007/s12031-014-0329-0.
 52. Lathia J, Mack S. Cancer stem cells in glioblastoma. *Genes & Development.* 2015:1203-1217. doi:10.1101/gad.261982.115.tumors.

-
53. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* 2015;106(7):803-811. doi:10.1111/cas.12691.
 54. Dimov I, Tasic-Dimov D, Conic I, Stefanovic V. Glioblastoma Multiforme Stem Cells. *Sci World J.* 2011;11:930-958. doi:10.1100/tsw.2011.42.
 55. Neradil J, Veselska R. Nestin as a marker of cancer stem cells. *Cancer Sci.* 2015;106(7):803-811. doi:10.1111/cas.12691.
 56. Tanaka S, Kamachi Y, Tanouchi A, Hamada H, Jing N, Kondoh H. Interplay of SOX and POU Factors in Regulation of the Nestin Gene in Neural Primordial Cells. *Mol Cell Biol.* 2004;24(20):8834-8846. doi:10.1128/MCB.24.20.8834-8846.2004.
 57. Bulnes-Sesma S, Ullibarri-Ortiz de Zárate N, Lafuente-Sánchez J V. [Tumour induction by ethylnitrosourea in the central nervous system]. *Rev Neurol.* 43(12):733-738. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17160924>.
 58. Sotelo J, Palencia G, Rosas N, Perez R. Effect of Chronic Stress on ENU-Induced Tumors. 1988:690-694.
 59. Ross, Donald; Kish, Phillip; Muraszko, Karin; Blaivas, Mila & Strawderman M. Effect of dietary vitamin A or N- acetylcysteine on ethylnitrosourea- induced rat gliomas. *J Neurooncol.* 1998;40:29-38.
 60. Huang G, Ashton C, Kumbhani DS, Ying Q-L. Genetic manipulations in the rat: progress and prospects. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2011;20(4):391-399. doi:10.1097/MNH.0b013e328347768a.
 61. Cordes SP. N-Ethyl-N-Nitrosourea Mutagenesis: Boarding the Mouse Mutant Express. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2005;69(3):426-439. doi:10.1128/MMBR.69.3.426-439.2005.
 62. Dreosti IE, McMichael AJ, Bridle TM. Teratogenic effect of extended administration of N-nitrosoethylurea and ethylurea/nitrite in rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1983;41(2):265-281. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6635320>.
 63. Aleksandrov VA. [Characteristics of the action of N-nitrosoethylurea in rat embryogenesis]. *Vopr Onkol.* 1979;25(6):60-65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/462875>.
 64. Leonard JR, Sa CD, Klocke BJ, Roth KA. Neural precursor cell apoptosis and glial tumorigenesis following transplacental ethyl-nitrosourea exposure. 2001:1-6.
 65. Katayama K, Ishigami N, Suzuki M, Ohtsuka R. Teratologic Studies on Rat Perinates and Offspring from Dams Treated with Ethylnitrosourea (ENU). 2000;49(November 1999):181-187.
 66. Sotelo J. The antimalarials quinacrine and chloroquine potentiate the transplacental carcinogenic effect of ethylnitrosourea ... The antimalarials quinacrine and chloroquine potentiate the transplacental carcinogenic effect of ethylnitrosourea on ependymal cells. 2017;(August). doi:10.1007/BF02479420.

-
67. Sundarraj N, Schachner M, Pfeiffer SE. Biochemically differentiated mouse glial lines carrying a nervous system specific cell surface antigen (NS-1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1975;72(5):1927-1931. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/168583>.
 68. Benda P, Lightbody J, Sato G, Levine L, Sweet W. Differentiated Rat Glial Cell Strain in Tissue Culture. *Science (80-)*. 1968;161(3839):370-371. doi:10.1126/science.161.3839.370.
 69. Guichet P-O, Guelfi S, Ripoll C, et al. Asymmetric Distribution of GFAP in Glioma Multipotent Cells. Park DM, ed. *PLoS One*. 2016;11(3):e0151274. doi:10.1371/journal.pone.0151274.
 70. Mertens J, Marchetto MC, Bardy C, Gage FH. Evaluating cell reprogramming, differentiation and conversion technologies in neuroscience. *Nat Rev Neurosci*. 2016;17(7):424-437. doi:10.1038/nrn.2016.46.
 71. Biswas D, Jiang P. Chemically Induced Reprogramming of Somatic Cells to Pluripotent Stem Cells and Neural Cells. *Int J Mol Sci*. 2016;17(2):226. doi:10.3390/ijms17020226.
 72. Chu T, Zhou H, Wang T, et al. In vitro characteristics of Valproic acid and all-trans-retinoic acid and their combined use in promoting neuronal differentiation while suppressing astrocytic differentiation in neural stem cells. *Brain Res*. 2015;1596:31-47. doi:10.1016/j.brainres.2014.11.029.
 73. Hernández-Pedro N, Granados-Soto V, Ordoñez G, et al. Vitamin A increases nerve growth factor and retinoic acid receptor beta and improves diabetic neuropathy in rats. *Transl Res*. 2014;164(3):196-201. doi:10.1016/j.trsl.2014.04.002.
 74. Liu X, Yang J-M, Zhang SS, Liu X-Y, Liu DX. Induction of cell cycle arrest at G1 and S phases and cAMP-dependent differentiation in C6 glioma by low concentration of cycloheximide. *BMC Cancer*. 2010;10(1):684. doi:10.1186/1471-2407-10-684.
 75. Chu T, Zhou H, Wang T, et al. In vitro characteristics of valproic acid and all-trans-retinoic acid and their combined use in promoting neuronal differentiation while suppressing astrocytic differentiation in neural stem cells. *Brain Res*. 2015;1596:31-47. doi:10.1016/j.brainres.2014.11.029.
 76. Hernández-Pedro N, Ordóñez G, Ortiz-Plata A, et al. All-trans retinoic acid induces nerve regeneration and increases serum and nerve contents of neural growth factor in experimental diabetic neuropathy. *Transl Res*. 2008;152(1):31-37. doi:10.1016/j.trsl.2008.05.007.
 77. Arrieta O, García-Navarrete R, Zúñiga S, et al. Retinoic acid increases tissue and plasma contents of nerve growth factor and prevents neuropathy in diabetic mice. *Eur J Clin Invest*. 2005;35(3):201-207. doi:10.1111/j.1365-2362.2005.01467.x.
 78. Arrieta Ó, Hernández-Pedro N, Fernández-González-Aragón MC, et al. Retinoic acid reduces chemotherapy-induced neuropathy in an animal model and patients with lung cancer. *Neurology*. 2011;77(10):987-995. doi:10.1212/WNL.0b013e31822e045c.

-
79. Alvarez AA, Field M, Bushnev S, Longo MS, Sugaya K. The effects of histone deacetylase inhibitors on glioblastoma-derived stem cells. *J Mol Neurosci*. 2015;55(1):7-20. doi:10.1007/s12031-014-0329-0.
 80. Benítez JA, Arregui L, Cabrera G, Segovia J. Valproic acid induces polarization, neuronal-like differentiation of a subpopulation of C6 glioma cells and selectively regulates transgene expression. *Neuroscience*. 2008;156(4):911-920. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.065.
 81. Benítez JA, Arregui L, Cabrera G, Segovia J. Valproic acid induces polarization, neuronal-like differentiation of a subpopulation of C6 glioma cells and selectively regulates transgene expression. *Neuroscience*. 2008;156(4):911-920. doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.065.
 82. Cornago M, Garcia-Alberich C, Blasco-Angulo N, et al. Histone deacetylase inhibitors promote glioma cell death by G2 checkpoint abrogation leading to mitotic catastrophe. *Cell Death Dis*. 2014;5(10):e1435. doi:10.1038/cddis.2014.412.
 83. Abematsu M, Tsujimura K, Yamano M, et al. Neurons derived from transplanted neural stem cells restore disrupted neuronal circuitry in a mouse model of spinal cord injury. *J Clin Invest*. 2010;120(9):3255-3266. doi:10.1172/JCI42957.
 84. Hsieh J, Nakashima K, Kuwabara T, Mejia E, Gage FH. Histone deacetylase inhibition-mediated neuronal differentiation of multipotent adult neural progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(47):16659-16664. doi:10.1073/pnas.0407643101.
 85. Bacon CL, Gallagher HC, Haughey JC, Regan CM. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J Neurochem*. 2002;83(1):12-19. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12358724>.
 86. Gallagher HC, Bacon CL, Odumeru OA, Gallagher KF, Fitzpatrick T, Regan CM. Valproate activates phosphodiesterase-mediated cAMP degradation: relevance to C6 glioma G1 phase progression. *Neurotoxicol Teratol*. 2003;26(1):73-81. doi:10.1016/j.ntt.2003.07.013.
 87. Morita K, Gotohda T, Arimochi H, Lee M-S, Her S. Histone deacetylase inhibitors promote neurosteroid-mediated cell differentiation and enhance serotonin-stimulated brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat C6 glioma cells. *J Neurosci Res*. 2009;87(11):2608-2614. doi:10.1002/jnr.22072.
 88. Riva G, Baronchelli S, Paoletta L, et al. In vitro anticancer drug test: A new method emerges from the model of glioma stem cells. *Toxicol Reports*. 2014;1:188-199. doi:10.1016/j.toxrep.2014.05.005.
 89. Riva G, Butta V, Cilibrasi C, et al. Epigenetic targeting of glioma stem cells: Short-term and long-term treatments with valproic acid modulate DNA methylation and differentiation behavior, but not temozolomide sensitivity. *Oncol Rep*. 2016;35(5):2811-2824. doi:10.3892/or.2016.4665.

-
90. Santos NC, Figueira-Coelho J, Martins-Silva J, Saldanha C. Multidisciplinary utilization of dimethyl sulfoxide: pharmacological, cellular, and molecular aspects. *Biochem Pharmacol.* 2003;65(7):1035-1041. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12663039>.
 91. Jacob SW, Herschler R. Pharmacology of DMSO. *Cryobiology.* 1986;23(1):14-27. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3007027>.
 92. Iwatani M, Ikegami K, Kremenska Y, et al. Dimethyl Sulfoxide Has an Impact on Epigenetic Profile in Mouse Embryoid Body. *Stem Cells.* 2006;24(11):2549-2556. doi:10.1634/stemcells.2005-0427.
 93. Fiore M, Degrassi F. Dimethyl Sulfoxide Restores Contact Inhibition-Induced Growth Arrest and Inhibits Cell Density-Dependent Apoptosis in Hamster Cells. *Exp Cell Res.* 1999;251(1):102-110. doi:10.1006/excr.1999.4542.
 94. Oh J, Karlmark KR, Shin J, et al. Differentiation of neuroblastoma cell line N1E-115 involves several signaling cascades. *Neurochem Res.* 2005;30(3):333-348. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16018577>.
 95. Deng F, Lei H, Hu Y, et al. Combination of retinoic acid, dimethyl sulfoxide and 5-azacytidine promotes cardiac differentiation of human fetal liver-derived mesenchymal stem cells. *Cell Tissue Bank.* 2016;17(1):147-159. doi:10.1007/s10561-015-9514-9.
 96. Cornic M, Guidez F, Delva L, Agadir A, Degos L, Chomienne C. [Mechanism of action of retinoids in a new therapeutic approach to acute promyelocytic leukemia]. *Bull Cancer.* 1992;79(7):697-704. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1334741>.
 97. Bushue N, Wan Y-JY. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1285-1298. doi:10.1016/j.addr.2010.07.003.
 98. Mawson A. Retinoids in the treatment of glioma: a new perspective. *Cancer Manag Res.* August 2012;233. doi:10.2147/CMAR.S32449.
 99. Cornic M, Guidez F, Delva L, Agadir A, Degos L, Chomienne C. [Mechanism of action of retinoids in a new therapeutic approach to acute promyelocytic leukemia]. *Bull Cancer.* 1992;79(7):697-704.
 100. Bushue N, Wan Y-JY. Retinoid pathway and cancer therapeutics. *Adv Drug Deliv Rev.* 2010;62(13):1285-1298. doi:10.1016/j.addr.2010.07.003.
 101. Fukasawa H, Shudo K. [Retinoid signalling pathways]. *Gan To Kagaku Ryobo.* 1993;20(5):555-566. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8470912>.
 102. Das A, Banik NL, Ray SK. Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *J Neurooncol.* 2008;87(1):9-22. doi:10.1007/s11060-007-9485-1.

-
103. Karsy M, Albert L, Tobias ME, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner. *Anticancer Res.* 2010;30(12):4915-4920. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21187470>.
 104. Das A, Banik NL, Ray SK. Retinoids induced astrocytic differentiation with down regulation of telomerase activity and enhanced sensitivity to taxol for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. *J Neurooncol.* 2008;87(1):9-22. doi:10.1007/s11060-007-9485-1.
 105. Karsy M, Albert L, Tobias ME, Murali R, Jhanwar-Uniyal M. All-trans retinoic acid modulates cancer stem cells of glioblastoma multiforme in an MAPK-dependent manner. *Anticancer Res.* 2010;30(12):4915-4920.
 106. Ying M, Wang S, Sang Y, et al. Regulation of glioblastoma stem cells by retinoic acid: role for Notch pathway inhibition. *Oncogene.* 2011;30(31):3454-3467. doi:10.1038/onc.2011.58.
 107. Zhang S, Wan F, Hu F, et al. [Differentiation treatment by all-trans retinoic acid reduces phenotype of glioma stem cells]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2013;93(1):19-22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23578447>.
 108. Shi Z, Lou M, Zhao Y, Zhang Q, Cui D, Wang K. Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation of U87 glioma stem/progenitor cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2013;33(7):943-951. doi:10.1007/s10571-013-9960-5.
 109. Gallelli L, Falcone D, Cannataro R, et al. Theophylline action on primary human bronchial epithelial cells under proinflammatory stimuli and steroidal drugs: a therapeutic rationale approach. *Drug Des Devel Ther.* 2017;11:265-272. doi:10.2147/DDDT.S118485.
 110. Moratalla R. Neurobiología de las metilxantinas. *Trastor Adict.* 2008;10(3):201-207. doi:10.1016/S1575-0973(08)76368-2.
 111. Nagai M, Teraoka A, Matsutani M, et al. B-6. Effect of Cyclic AMP on the Malignant Brain Tumor Cells. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 1971;11:231-231. doi:10.2176/nmc.11.231.
 112. Sato S, Sugimura T, Yoda K, Fujimura S. Morphological Differentiation of Cultured Mouse Glioblastoma Cells Induced by Dibutyl Cyclic Adenosine Monophosphate. *J Biol Chem.* 1975;35(September):2494-2499.
 113. Takanaga H, Yoshitake T, Hara S, Yamasaki C, Kunimoto M. cAMP-induced astrocytic differentiation of C6 glioma cells is mediated by autocrine interleukin-6. *J Biol Chem.* 2004;279(15):15441-15447. doi:10.1074/jbc.M311844200.
 114. Moon E-Y, Lee G-H, Lee M-S, Kim H-M, Lee J-W. Phosphodiesterase inhibitors control A172 human glioblastoma cell death through cAMP-mediated activation of protein kinase A and Epac1/Rap1 pathways. *Life Sci.* 2012;90(9-10):373-380. doi:10.1016/j.lfs.2011.12.010.



Es importante luchar y luchar, y seguir luchando, porque sólo entonces el mal puede mantenerse a raya, aunque nunca se erradique.

Albus Dumbledore

