



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

ANÁLISIS DE TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO
CENTRAL (EPENDIMOMAS) MEDIANTE HIBRIDACIÓN
GÉNOMICA COMPARATIVA (CGH) EN NIÑOS MEXICANOS.

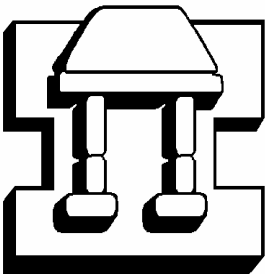
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

FELIPE DE JESÚS ARGUIJO PÉREZ



IZTACALA

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA

LOS REYES IZTACALA, EDO. DE MEX.

2006



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.

La experiencia religiosa cósmica es la fuerza más poderosa y más noble que impulsa la investigación científica. Nadie que no conozca los terribles esfuerzos y sobre todo, la devoción sin la cual las creaciones innovadoras del pensamiento científico no llegarían a ver la luz, puede imaginar la fuerza del sentimiento que hace surgir tales obras, y que es lo único capaz de hacerlas surgir, desligadas como están de la vida práctica inmediata.

¡Que fe tan profunda en la racionalidad de la estructura del mundo y que deseo de entender incluso el más pequeño atisbo de la razón que se revela en el mundo tienen que profesar las personas que emprendan estas tortuosas tareas!

A. Einstein.

DEDICATORIA

A mis papás Felicitas Pérez Reyes y Felipe de Jesús Arguijo Morales, que sean sacrificado por darme lo mejor de sí; que con su amor, ejemplo y cariño me han enseñado que la vida es hermosa, y sobre todo que se debe de luchar con determinación por lo que se quiere; todos mis logros personales se los debo a ellos, gracias por todo papás y sobre todo por quererme tanto. Los admiro y los amo con todo mi corazón

A mis hermanos Carlos y Lupita por ser mis mejores amigos, por apoyarme en todos los buenos y malos momentos. Los quiero mucho.

A mi gordita linda Dennis por todo su apoyo durante todo este tiempo, por su amor y su paciencia, te admiro y te amo como no tienes idea.

A mi nena Fátima Arleth Arguijo Rico, que amo y adoro, que con su ternura y amor me vuelve loco, ella es el motor de mi vida y que sin ella no sería la persona que soy ahora.

“Gracias por todo”

AGRADECIMIENTOS.

Mil gracias a mi querida familia por ser el pilar de mi vida. A mi abuelita Lupita por ser su nieto consentido, por el amor que me tiene y por tenerme siempre en sus bendiciones. A mis tíos y amigos Jorge y Carlos que con su cariño y consejos me han ayudado y enseñado mucho, los quiero mucho.

A mi suegra por aguantarme todos los días, y quererme como otro de sus hijos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y sobre todo a la FES-Iztacala por darme y enseñarme tantas cosas. A mis profesores de la Facultad.

A mi Tutor el Dr. Diego Julio Arenas Aranda sin quien hubiera sido imposible la realización de este trabajo, gracias por brindarme su confianza y apoyo.

A mis dos grandes profesoras Irma Elena Dueñas García y Laura Castañeda Partida, gracias por todas sus enseñanzas, por su paciencia, apoyo y amistad.

Con respeto y cariño a mis maestros y sinodales, por su orientación en la tesis.

A mis amigos de la FESI Mario, Viko, Renato, Beto(ju), Cesar, Fabián, Moy, Cristian, Paco, Miguel, Chucho(jomi), Yinet, Yolo, Janet, Ariana, Kikue, Adriana, Esmeralda, Izzel, Julio, Darío, los Roñas, los Calentosaurios, mis amigas de Psicología, Enfermería y Medicina, y todos los que por falta de espacio me faltó mencionar, gracias por su amistad.

A mis amigos del laboratorio del CMN SXXI Isra, Mario, Normand, Charli, David, Elena, Bety, Fernando, Neri, Miryam, Carlos, Alondra y Carmen.

Índice del contenido.

Resumen	1
1. Introducción.	2
1.1. El Cáncer.	2
1.2. El cáncer en los niños	3
1.3. Tumores del Sistema Nervioso Central (SNC) en niños.	4
1.4. Ependimomas.	6
1.5. Hibridación Genómica Comparativa (CGH).	9
2. Antecedentes.	10
3. Justificación	13
4. Objetivos.	14
4.1. Objetivo general.	14
4.2. Objetivos particulares.	14
5. Metodología.	15
5.1. Recolección de las muestras.	16
5.2. Extracción del DNA del tejido embebido en parafina (técnica orgánica de fenol-cloroformo modificada).	16
5.3. Cuantificación e integridad del DNA extraído.	17
5.4. Preparación del CGH.	17
5.4.1. Marcaje con "Nick Translation Kit".	17
5.4.2. Preparación de la sonda (mezcla de sondas referencia y del paciente)	18
5.4.3. Hibridación de las sondas sobre las laminillas con cromosomas en metafase.	
5.4.4. Lavado de la laminilla hibridadas.	
5.4.5. Visualización de la hibridación.	
5.4.6. Interpretación y análisis.	
5.5. Relación de los datos obtenidos por medio de CGH con los datos histológicos.	21
6. Resultados.	22
7. Discusión.	38
8. Conclusiones.	45
9. Bibliografía.	46
Anexo I	51

Índice de figuras y tablas.

	Pag.
Figura 1. Clasificación de los tumores del SNC según Sierrasúmaga 1992.	5
Tabla 1. Clasificación de los tumores del SNC por la OMS 2000 (modificada para pediatría).	5
Figura 2. Cortes histológico de tejido neoplásico (ependimoma clásico)	6
Figura 3. Anatomía del Sistema Ventricular.	7
Figura 4. Principio de la Hibridación Genómica Comparativa (CGH).	10
Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología.	15
Tabla 2. Características clínicas de los pacientes y año de diagnóstico tumor.	22
Figura 6. Proporción de pacientes por género.	23
Figura 7. Localización del ependimoma, número de pacientes que lo presenta y su sexo.	23
Figura 8. Tipo de tumor (clasificación histológica), y número de pacientes que lo presento por género.	24
Figura 9. Comparación de la integridad del DNA extraído de las muestras de los Ependimomas contra los resultados obtenidos por Liborio et al. en el 2005 de diferentes tejidos incluidos en parafina.	25
Tabla 3. Concentración y pureza del DNA extraído de las muestras tumorales.	26
Figura 10. Marcaje con " <i>Nick traslation</i> " del DNA del paciente PQy del del DNA control (DNA norma).	28
Figura 11. Micrografía vista con distintos filtros de una metafase hibridada, del paciente 424 obtenida mediante CGH.	30
Figura 12. Cariograma de una metafase del paciente PQ 25.	31
Figura 13. Análisis de la proporción de la hibridación para cada uno de los cromosomas del paciente PQ 149.	32
Figura 14. Promedio total para cada par de cromosomas analizados por " <i>software</i> " del PQ 149.	33
Tabla 4. Regiones cromosómicas con alteración presentes en cada paciente	34
Figura 15. Resumen de las alteraciones cromosómicas encontradas en el presente estudio.	36
Tabla 5. Regiones cromosómicas alteradas y algunos genes presentes en ellas.	37

Resumen.

En México el cáncer en edad pediátrica ocupa la segunda causa de mortalidad; y de tras de las leucemias los Tumores del Sistema Nervioso Central (TSNC) son los más frecuentes. Dentro de los TSNC los ependimomas ocupan un 10%. Una de las fuentes más populares para almacenar y analizar material biológico de diagnóstico es la inclusión en parafina, sin embargo es conocido que el DNA de estos tejidos es a menudo de menor calidad, por lo cual estudios de biología molecular sobre tumores especialmente sobre ependimomas en nuestro país son nulos. El objetivo del presente trabajo fue Determinar a nivel cromosómico alteraciones estructurales, como son ganancias y pérdidas en el material genético, en los distintos cromosomas, en los diferentes tipos de ependimoma de pacientes mexicanos en edad pediátrica; entre los 3 meses y 14 años de edad utilizando la técnica de CGH. Ya que la identificación del cáncer como un trastorno de genes da la posibilidad de clasificar los tumores de acuerdo a alteraciones genéticas, y a su vez idear nuevas formas de tratamientos para estas enfermedades. Se utilizaron 9 muestra de ependimomas embebidas en parafina proporcionadas por el departamento de Oncología del Hospital de Pediatría del CMNS XXI, las cuales se analizaron con CGH mediante un "software" especializado para identificar pérdidas y ganancias en todo el cariotipo. Los resultados obtenidos señalan que los cromosomas 11,13 y 19 no presentaron ganancias, mientras que los cromosomas 1, 2, 5, 7 no demostraron pérdidas . En tanto el cromosoma 7 no presento ninguna alteración.

1. Introducción.

1.1. El Cáncer.

Con el término cáncer se agrupan muchas enfermedades diferentes, bajo esta expresión se amparan más de 100 formas de padecimientos, lo que suele significar que existen grandes diferencias entre los carcinomas de distintos órganos, como la mama o el colon. También es cierto que hay una variedad significativa entre los tumores que asientan en el mismo órgano de diferentes pacientes y que existe una importante heterogeneidad fenotípica entre las células de un mismo carcinoma. Aunque cada cáncer tiene características únicas, los procesos básicos que los originan son muy similares, (Rubin, 2003).

Lo común del cáncer es que se trata de enfermedades en las que se producen una proliferación inadecuada y, en el último de los casos, incontrolada de células. Las células normales solo se dividen cuando reciben las instrucciones adecuadas que les envían otras células vecinas, tal colaboración permanente asegura que cada tejido u órgano mantenga el tamaño y la arquitectura adecuada a las necesidades de cuerpo, sin embargo las células cancerosas vulneran ese esquema. Ignoran los controles normales de proliferación y siguen sus propias instrucciones internas de división, e incluso gozan de una propiedad más perniciosa: son capaces de emigrar del sitio donde se producen (Weinberg, 1996).

La carcinogénesis se concibe entonces como un proceso con múltiples fases, en el que suceden una serie de alteraciones genéticas en el interior de la célula, la transformación maligna de una célula acontece pues, por acumulación de mutaciones en algunos genes específicos (protooncogenes y genes supresores de

tumores), y la pérdida de control del crecimiento celular es el resultado de estas alteraciones que mediante los procesos de promoción y regresión, conducen a la malignización; y se origina en un largo proceso de selección y variación similar al que se produce en la propia evolución (Darnell et al, 2003).

La variación es el resultado de la tendencia de las células tumorales a desarrollar procesos de cambios epigenéticos (es decir, son genéticamente inestables), mientras que la selección proviene de las variadas condiciones microambientales a las que se ven sometidas las células durante el crecimiento tumoral. Así, el crecimiento del tumor y su desarrollo son procesos celulares y tisulares.

1.2. El cáncer en los niños.

El cáncer en la edad pediátrica ocupa la segunda causa de mortalidad en los países industrializados. Sin embargo en la República Mexicana en el año de 1977 ocupaba el cuarto lugar entre los 5 a 14 años de edad únicamente antecedida por padecimientos gastrointestinales, procesos infecciosos y congénitos. No fue sino hasta 1996 en el que se reporta un aumento en la frecuencia de estos padecimientos; hasta el 2003 era la segunda causa de muerte en México entre los 5 a 14 años de edad únicamente antecedido por accidentes (Rivera, 2003).

La incidencia del cáncer en pediatría muestra un aumento en el periodo de 1975 a 1995 en la República Mexicana, (Secretaría de Salud, 2000). Se estima que la incidencia de cáncer infantil en México (0 a 18 años de edad) es de 120 nuevos casos por millón de habitantes por año. Indiscutiblemente que las neoplasias más frecuentes en este tipo de estudios y en otros similares continúa siendo la leucemia aguda seguida de neoplasias del sistema nervioso central y de linfomas (Abdullaev et al, 2001).

1.3. Tumores del Sistema Nervioso Central (TSNC) en niños.

Como ya se mencionó, los tumores del SNC ocupan, tras las leucemias, el segundo lugar en frecuencia entre las neoplasias del niño y adolescente, con una incidencia de 2,5 pacientes por 100,000 menores de 15 años por año. La media de edad en el momento del diagnóstico es de 6 años, con un pico de incidencia a los 3 años y existe una predisposición mayor en los varones (Rivera, 2003).

A pesar de su elevada incidencia, los estudios genéticos, epidemiológicos y patológicos son escasos en comparación de otros tumores pediátricos, probablemente debido a la gran dispersión de estos pacientes a la hora de ser tratados y principalmente a la diversidad histológica que abarca este grupo de tumores (Eiser, 2004).

Los factores más relacionados con el desarrollo de tumores cerebrales y mejor conocidos son las radiaciones ionizantes. En cuanto a carcinogénesis química, diferentes drogas, como nitrosaminas, nitrosureas, hidrocarburos policíclicos, hidracinas y triacenos, han demostrado una capacidad de inducción tumoral en tejidos cerebrales. También se ha señalado la relación entre estados de inmunodeficiencia, tanto congénitos (síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia), como adquiridos (inmunodepresión en pacientes sometidos a trasplantes renales o cardíacos, y SIDA), con el desarrollo de tumores cerebrales primitivos (Sierrasesúmaga, 1992).

Existen varios tipos de tumores del SNC y su gran diversidad histológica hace complejo cualquier intento de clasificación. Sierrasesúmaga en 1992 dio una clasificación para los TSNC en la infancia, según su histología y su frecuencia en un total de 830 pacientes conforme a los datos del registro del SEER americano (Figura 1).

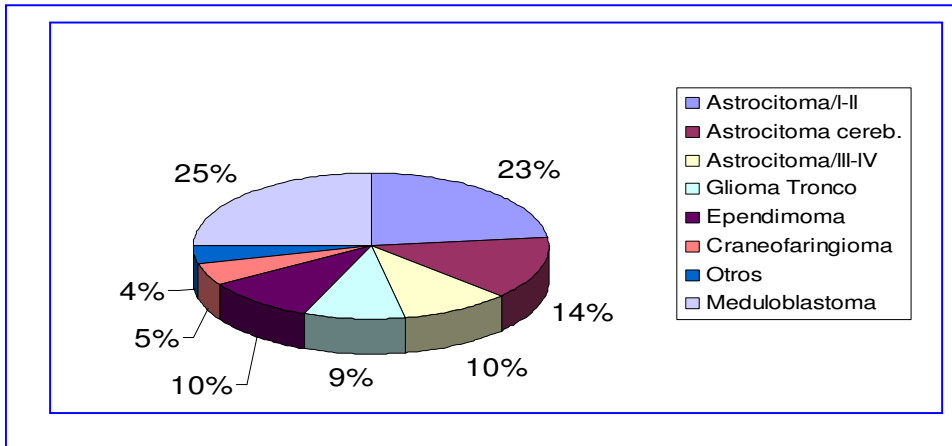


Figura 1. Clasificación de los tumores del SNC según Sierrasúмага 1992.

La clasificación más reciente para los tumores del SNC es la proporcionada por la Organización Mundial de Salud (OMS) en el año 2000 que se muestra a continuación (tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de los tumores del SNC por la OMS 2000(modificada para pediatría).

Tumores gliales
1. Astrocitoma astrocítico
Astrocitoma anaplásico
Tumor subependimal de células gigantes
Glioma gigantocelular
2. Tumores oligodendrogliales
Oligodendroglioma
Oligodendroglioma anaplásico
3. Tumores ependimales
Ependimoma
Ependimoma anaplásico
Ependimoma mixopapilar
4. Tumor de plexos coroides
Papiloma de plexos coroides
Tumor anaplásico de plexos coroides
5. Glioma mixto
6. Glioblastoma multiforme
Tumores neuronales
1. Gangliocitoma
2. Ganglioglioma
3. Ganglioglioma anaplásico
Tumores neuroectodérmicos primitivos (TNEP)
1. TNEP
2. TNEP con diferenciación astrocítica, ependimal, neuronal
3. Meduloepitelioma

1.4. Ependimomas.

Los ependimomas constituyen un importante grupo dentro de los tumores cerebrales, ocupan el tercer lugar de frecuencia. De manera general se trata de tumores bien circunscritos, de superficie granulosa, de color rojo grisáceo y consistencia firme; usualmente son menos fibrilares y menos vasculares que los meduloblastomas, y a menudo la superficie aparece jaspeada, con áreas rojas y grises, (Salas, 1983). Representa entre 8% y 15% de los casos en la mayoría de de los artículos publicados (Dyer et. al., 2002).

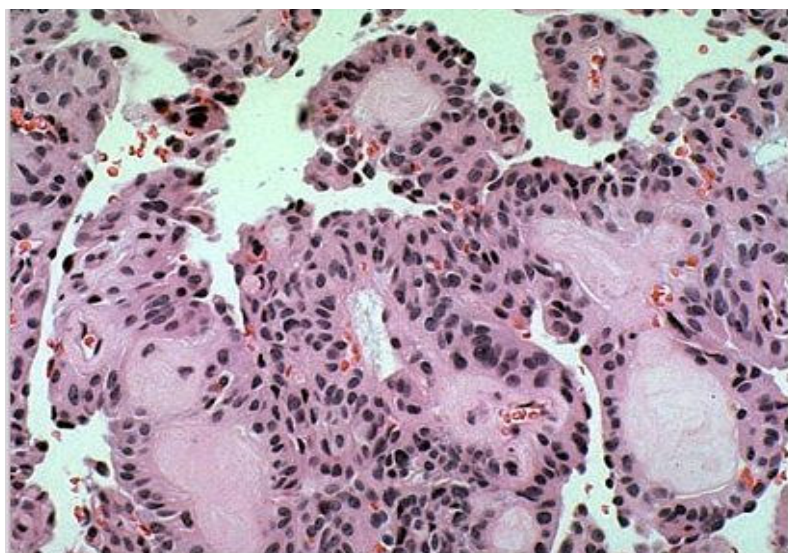


Figura 2. Corte histológico de tejido neoplásico (ependimoma clásico).

Los ependimomas derivan de las células del epéndimo, y en consecuencia tienen la capacidad de originarse en cualquier lugar del sistema ventricular o del canal espinal y el *filum terminale*, aunque el sitio más común es en la fosa posterior, en el IV ventrículo (figura 3) . El 60% de los tumores intracraneanos son infratentoriales y el 40% supratentoriales (Muñoz et. al. 2001).

Los niños tienen la incidencia más elevada de ependimomas con edad de presentación más frecuente en menores de 5 años (50% de los casos), y los ependimomas del neuroeje son raramente encontrados en niños menores de 12 años (Dyer et. al., 2002).

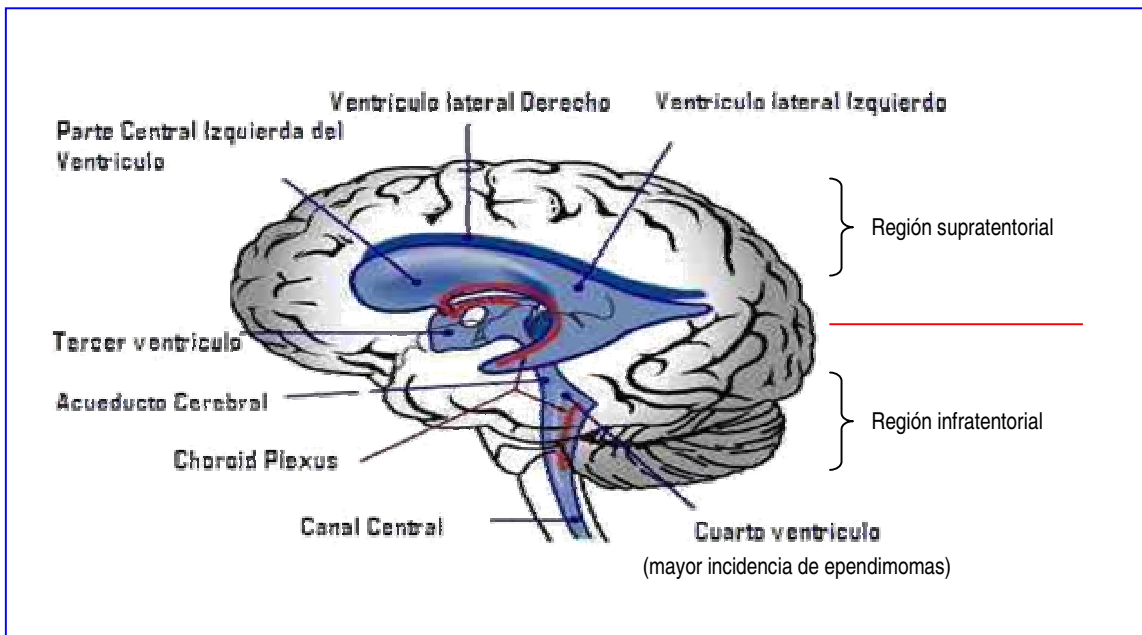


Figura 3. Anatomía del Sistema Ventricular. Se muestra en la parte inferior del lado derecho el cuarto ventriculo en la región infratentorial (donde se presenta con mayor incidencia los ependimomas).

La agresividad biológica se clasifica en grados de malignidad como grado I, subependimoma (intraventricular y frecuentemente sintomático) y ependimoma mixopapilar que frecuentemente ocurre en la cauda equina. Los ependimoma grado II, que tiene un grado de variantes histopatológicas, muestran zonas evidentes de un fenotipo celular ependimario (por formación de rosetas ependimarias y algunas veces en canales), (Dyer et. al., 2002).

Los ependimomas se pueden clasificar de varias maneras. El sistema de clasificación actual y más frecuentemente utilizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000), reconoce dos variantes principales en niños:

Ependimomas mixopapilar o clásico (grado II) que son tumores que crecen típicamente en el *filum terminale* y cono medular, se trata de tumores de crecimiento lento que pueden alcanzar un gran tamaño. Afectan más a varones que a mujeres (2:1).

Los ependimomas anaplásicos (grado III) tienen más características de anaplasia y aparecen mitóticamente más activos que los ependimomas clásicos. Suelen ser intramedulares. Sin embargo a pesar de numerosos estudios la relación entre grado histológico y agresividad de tumor permanece incierta (Dyer et. al., 2002).

Por otra parte los estudios citogenéticos revelan numerosas aberraciones cromosómicas en los ependimomas. En particular la incidencia de un 30 a 50% de aberraciones involucradas con el cromosoma 22, incluyendo monosomía 22 así como deleciones de 22q (Korshunov et. al. 2003).

Recientemente se ha demostrado que dichos tumores disponen de diversos patrones de comportamiento clínico y anormalidades cromosómicas, dependiendo de su localización, lo que sugieren que son una colección de diferentes enfermedades desde el punto de vista molecular (Gilbertson, 2005).

Existen estudios que apoyan la creencia de que la clasificación de los ependimomas basadas en sus características citogenéticas, puede ayudar a la identificación útil de un marcador pronóstico y proveer pistas para el entendimiento del desarrollo de estos tumores, y evidencias, además de que los ependimomas intracraneales y de la médula espinal podrán ser subdivididos (Yuichi et. al., 2001).

1.5. Hibridación Genómica Comparativa (CGH).

Una de las técnicas de citogenética más útiles para identificar cambios cromosómicos en neoplasias es la llamada CGH (por sus siglas en inglés) que significa Hibridación Genómica Comparativa. Los métodos de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) en su mayoría no pueden interpretar los complejos cariotipos de los tumores sólidos, y para superar estos inconvenientes la CGH fue inducida (Gray et. al., 2000).

Fue diseñada para detectar alteraciones cromosómicas como amplificaciones y pérdidas de material genómico. Consiste en hibridar simultáneamente DNA de referencia tumoral y no tumoral marcados con dos fluoróforos en rojo y verde respectivamente (figura 4), en laminillas con cromosomas en metafase, revelándose a través de un programa computacional (Kallioniemi et. al., 1992).

A pesar de su gran utilidad como herramienta en citogenética molecular, tiene la limitante de una resolución de 10-20 Mb lo cual no provee una información cuantitativa acerca de las mutaciones de genes específicos, sin embargo se pueden visualizar regiones cromosómicas emparentadas a genes relacionados con distintos tumores neoplásicos (Kallioniemi et. al., 1992; Gray et. al., 2000).

Por otro lado, la prueba de hibridación genómica comparativa (CGH) es altamente utilizada para la identificación de alteraciones cromosómicas en una amplia variedad de tumores cerebrales. Esta técnica evita algunas de las limitaciones asociadas con la citogenética convencional, además, la CGH no requiere de muestras de tumores frescos y pequeñas muestras de tumor pueden ser analizadas de manera exitosa por esta metodología: por lo tanto, es una poderosa metodología para la descripción citogenética de las células tumorales con fines de pronóstico (Grill et al., 2002).

2. Antecedentes.

Los endimomas fueron agrupados en celulares, epiteliales y mixopapilares de acuerdo a los criterios microscópicos establecidos en 1937 por Kernohan. Sin embargo como esta variabilidad histológica no predecía alguna forma de comportamiento biológico, más adelante Mabon en 1949 los clasificó sobre la base del grado de anaplasia relacionándolos con el tiempo de supervivencia posterior a la cirugía.

En observaciones realizadas en 1997 por Kramer y colaboradores, en 23 casos de pacientes pediátricos con endimomas intracraneales supratentoriales y de la fosa posterior en búsqueda de cambios genéticos implicados en el desarrollo de estos tumores del SNC; encontraron una región del cromosoma 6q la cual se piensa que puede estar involucrada en el desarrollo de los endimomas en los niños.

Estudiando el gen supresor de tumor localizado en 22q11, Graus y colaboradores en el año 2001, observaron que en 60% de los casos estudiados este gen estaba alterado, provocando una neurofibromatosis tipo 2.

Para detectar anomalías cromosómicas en los endimomas Cartel y colaboradores realizaron en el 2002 un estudio con la técnica de citogenética molecular CGH en estos tumores, concluyendo que estas neoplasias del SNC muestran un perfil balanceado significativo más frecuente en niños que en los adultos; y que los endimomas clásicos y anaplásicos con ganancia de 1q tienden a ocurrir en la fosa posterior de niños y son más agresivos.

En un estudio retrospectivo realizado en la ciudad de Praga en el 2003, de 31 pacientes pediátricos con endimomas intracraneales, Zamecnik y colaboradores estudiaron las implicaciones pronósticas del sistema actual de

clasificación, características de inmunohistoquímica e histológicas y estado de ploidia estimado por citometría de flujo. Concluyendo que la inmunopositividad del gen p53 y/o MIB-1 LI de >5% (después de resección parcial) o MIB-1 LI de >15% (después de resección completa) fueron los indicadores más fuertes de agresividad del tumor y pobre pronóstico de la enfermedad, con disminución de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a 7 años.

Gilbertson demostró en el 2005 que los ependimomas disponen de diversos patrones de comportamiento clínico y anormalidades cromosómicas, dependiendo de su localización, lo anterior realizado por el estudio de hibridación genómica comparativa para describir las alteraciones moleculares en los ependimomas pediátricos comparados con los de los adultos

Lo anterior confirmado por Gilhuis y su grupo (2004) quienes observaron que los ependimomas mixopapilares a nivel genético eran muy diferentes a los ependimomas cerebrales y espinales (grado II, OMS) y los ependimomas anaplásicos cerebrales (grado III, OMS).

3. Justificación.

A pesar de los estudios moleculares realizados sobre los ependimomas (que son muy pocos y que en la población mexicana son nulos) no se tiene bien definida la relación entre el grado histológico y la agresividad del tumor, esto quiere decir que el comportamiento biológico de los ependimomas aún permanece incierto. Se sabe que los ependimomas de grado II de malignidad son diferentes de los del grado III con bases al porcentaje mitótico y al bajo nivel de polimorfismo nuclear, sin embargo las líneas base entre grado II y III permanece sin ser definida. Por otro lado se piensa que los ependimomas son una colección de diferentes enfermedades desde un punto de vista molecular, además existen estudios que apoyan la creencia de que una nueva clasificación de los ependimomas basadas en sus características citogenéticas pueden ayudar a la identificación útil de un marcador pronóstico y a la vez proveer pistas para el entendimiento del desarrollo de estas neoplasias. Nuevas metodologías al momento están siendo introducidas para permitir un análisis detallado del genoma y transcriptoma de los distintos tumores, para la posterior integración a la información histológica de estos.

Con base en nuestros antecedentes y a lo dicho precedentemente, planteamos la necesidad del estudio de los ependimomas a nivel molecular en la población pediátrica mexicana; en 9 muestras de pacientes del Departamento de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNS XXI por medio de Hibridación Genética Comparativa (CGH).

Por lo cual los objetivos del presente trabajo fueron:

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Determinar a nivel cromosómico alteraciones estructurales, como son ganancias y pérdidas en el material genético, en los distintos cromosomas, en los diferentes tipos de ependimoma de pacientes mexicanos en edad pediátrica; entre los 3 meses y 14 años de edad utilizando la técnica de CGH.

4.2. Objetivos particulares.

- Identificar si existen relaciones entre los diferentes tipos de ependimomas (clasificación histológica), y las alteraciones genéticas que puedan presentar, en edad pediátrica.
- Observar las regiones cromosómicas con ganancias y pérdidas de material, y verificar si estas regiones se encuentran asociadas con genes.
- Si éste fuera el caso determinar si los mismos genes están asociados al mismo tipo de ependimoma.

5. Metodología.

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo se realizó la siguiente metodología:

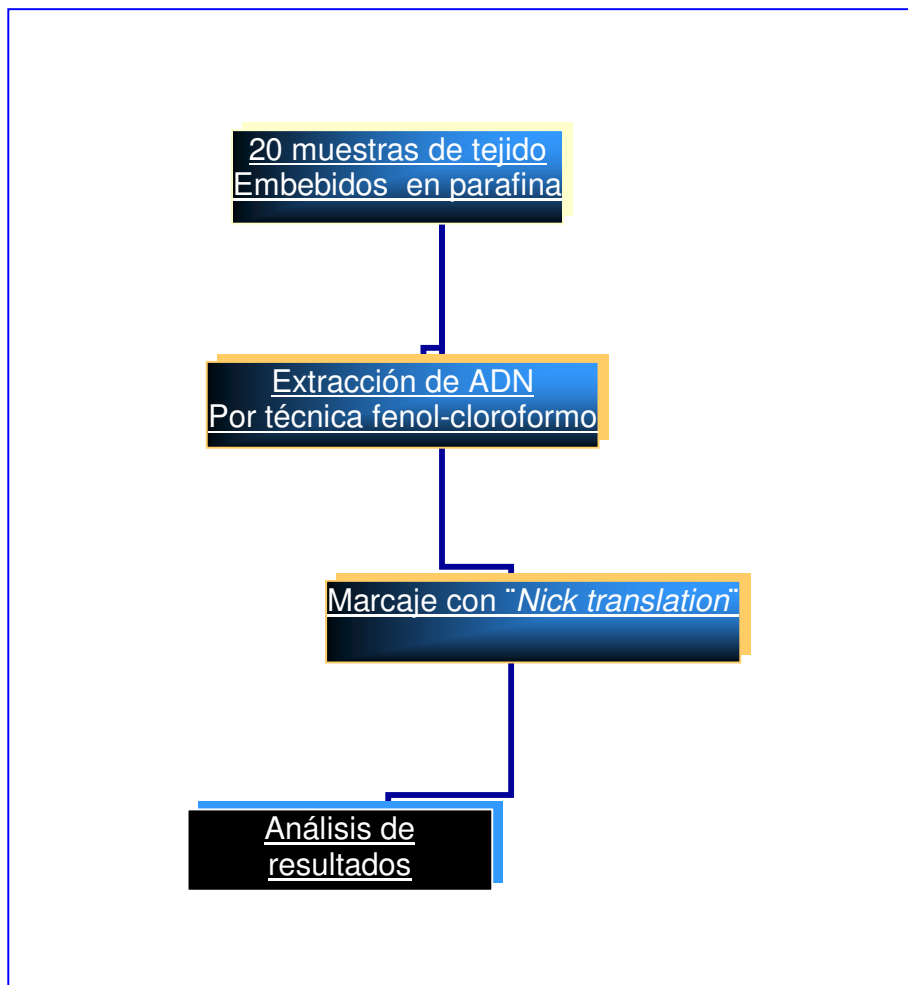


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología. En este trabajo, se obtuvo el DNA de ependimomas embebidos en parafina de 20 pacientes, solo se procesaron 9 para el análisis con CGH.

5.1. Recolección de las muestras.

Se obtuvieron 20 muestras que fueron proporcionadas por el Departamento de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI. Estas fueron recolectadas de distintos pacientes entre los años de 1996 y 2006 en un estudio retrospectivo; las biopsias de los ependimomas fueron clasificadas por sus características histopatológicas por el Departamento de Patología del hospital, e incluidas en parafina para su conservación y manipulación. Cabe señalar que solo se ocuparon 9 muestras del total para el estudio con CGH.

5.2. Extracción del DNA del tejido embebido en parafina (técnica orgánica de fenol-cloroformo modificada).

De los bloques de parafina, se tomaron 50mg de tejido tumoral y se colocaron en un tubo eppendorf. Se añadió un 1ml de xileno durante 30 min. realizando 2 cambios. Luego se agregó etanol al 100% y 75%, realizado igualmente 2 cambios (durante 30 min.). Se lavó con PBS durante 15 min., se añadió 500µl de buffer de lisis (con proteinasa K, 16.5 mg/ ml), e incubó a 52° C toda la noche hasta disolver por completo todo el tejido. Se adicionó 500µl de fenol-cloroformo-isopropanol en una proporción de 25:24:1 respectivamente, y se mezcló con vortex. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min. y se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf agregándole un volumen igual de cloroformo, se volvió a mezclar por vortex y nuevamente se centrifugó 12,000 rpm durante 5 min. Se recogió la fase superior del sobrenadante cuidadosamente y se depositó en un tubo tipo microcon con membrana de hemicelulosa y se centrifugó a 6,000 rpm hasta que todo el sobrenadante traspasó la membrana y se depositó en el fondo del tubo. Después se lavó la membrana (donde se concentró el DNA)

de 2 a 3 veces con agua destilada libre de nucleasas para limpiarla de cualquier disolvente que aun pudiera encontrarse en ella. Finalmente se obtuvo el DNA invirtiendo la columna que contenía la membrana con el DNA y se le colocó de 30 a 50µl de agua destilada libre de nucleasas (para resuspender el DNA), centrifugando durante 5 min.

5.3. Cuantificación e integridad del DNA extraído.

Posteriormente se analizó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA, pH 8, 0.002 M), el proceso se llevó a cabo durante 40 minutos a 100 volts. Se cargaron 2µl de cada una de las muestras de DNA con 1µl de azul bromoxifeno y se usó bromuro de etidio (1 microg/ml) como revelador de las bandas de DNA en un transluminador de luz UV de onda corta y se utilizó Alphamager como sistema de cómputo para tomar las imágenes. Se utilizó un marcador de peso molecular de DNA (1 Kb *“Plus”* DNA *“Ladder”*) para calcular el peso del DNA extraído. La cuantificación del DNA genómico se realizó por medio de espectrofotometría a 260 nm de absorbancia en luz UV para obtener la concentración del mismo (asumiendo que una densidad óptica equivale a 50µg/ml), y a 280 nm en luz UV para establecer su pureza con la relación 260/280.

5.4. Preparación de la CGH.

5.4.1. Marcaje con *“Nick Translation Kit”*.

Se colocó un tubo eppendorf (por cada una de las muestra de DNA) en hielo permitiendo que el tubo se enfriara, al tubo se le adicionó 25µl de agua libre de

nucleasas, 3µg de DNA genómico extraído (con los µl que eran necesarios, con relación a la concentración de cada DNA muestra) , 2.5µl a 0.2 mM de “*Spectrum Green*” dUTP (para el DNA de cada paciente) o “*Spectrum Red*” dUTP (para el DNA control), 5µl a 0.1 mM de dTTP, 10µl de dNTP, 5µl de buffer “*nick translation*” 10x, 2.5µl de la enzima de “*nick translation*”, se mezcló brevemente por vortex e inmediatamente después se incubó 50 minutos en el caso del “*Spectrum Red*” dUTP, y 15 minutos en el caso del “*Spectrum Green*” dUTP a 15°C (iniciando así la reacción). Se calentó los tubos por baño María a 90°C durante 10 min. (parando así la reacción), posteriormente se colocó en hielo y en la oscuridad.

5.4.2. Preparación de la sonda (mezcla de sondas de referencia y del paciente).

Se realizó una mezcla para cada tubo DNA marcado con “*nick translación*” agregando a cada uno: 10µl (200ng) de “*Spectrum Green*” (etiquetado con “*nick translation*”), 10µl (200ng) del DNA genómico total de referencia con “*Spectrum Red*”, 10µl (10µg) de human Cot 1-1, 2.1µl de acetato de sodio 3 M, 52.5µl de etanol al 100% para precipitar el DNA, se mezcló en vortex brevemente y se depositó sobre hielo seco durante 15 min. al termino de los cuales se centrifugo a 12,000 rpm por 30 min. a 4°C para obtener la pastilla de DNA, se removió el sobrenadante y se dejó secar la pastilla por 15 min. a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 3µl de agua libre de nucleasas y 7µl de buffer de hibridación para CGH (del Kit para CGH 32-801023 de “*Vysis*”), después se desnaturalizó la mezcla por calentamiento en baño de agua a 73°C.

5.4.3. Hibridación de las sondas sobre las laminillas con cromosomas en metafase.

Se utilizaron laminillas con metafases de individuos sanos del sexo masculino, de la marca "Vysys".

Se marcó el área de hibridación sobre las laminillas usando un lápiz con punta de diamante, se sumergió las laminillas en una solución desnaturalizante (49ml de formamida, 7ml de SSC 20X, y 14ml de agua purificada mezclados) durante 5 min. (se aseguro de que la temperatura de la solución desnaturalizante fuera de 72-73°C). Se deshidrató las laminillas por dos minutos en etanol al 70%, seguido por dos minutos en etanol al 85% y dos minutos en etanol al 100%, posteriormente se colocaron las laminillas a 50°C para permitir que el etanol se evaporara, y se agrego 10µl de la mezcla de sonda desnaturalizada a las laminillas en metafase, se colocó un porta objetos y se sellaron con cemento de goma; las laminillas se colocaron dentro de una cámara húmeda en una incubadora a 37°C durante 72 horas para permitir su hibridación.

5.4.4. Lavado de la laminilla hibridadas.

Se retiró el sello de cemento de goma a cada laminilla y se colocó en una solución de lavado (0.4 x SSC / 0.3 % NP-40) a una temperatura de 75°C, se agitaron las laminillas por algunos segundos y se dejaron reposar en esta solución durante 2 minutos. Luego se cambiaron a una nueva solución de lavado a temperatura ambiente y se agitaron nuevamente por 3 a 5 segundos dejándolas reposar por un minuto, se saco la laminilla y sobre esta, se realizo un goteo de agua libre de nucleasas, finalmente se dejaron secar en la oscuridad a 50°C.

5.4.5. Visualización de la hibridación.

Para visualizar la hibridación se aplicó 15µl de DAPI II (diclorhidrato de 4',6-diamino-2-fenilindol) sobre cada metafase y se colocó un cubreobjetos a cada una de las áreas de hibridación, y se selló con cemento de goma. Se almacenaron a -20°C para su posterior uso.

Las laminillas se visualizaron con el microscopio de fluorescencia, teniendo cuidado de no exponer las laminillas a la luz por un tiempo prolongado. Con el *“software Quips Genetic Imaging”* se seleccionaron de 15 a 20 metafases por paciente, se capturaron las imágenes con diferentes filtros, permitiendo así ver los dos fluoróforos por separado (*“Spectrum Green”* y *“Spectrum Red”*), la contratinción (DAPI II) y los tres colores simultáneamente.

Se clasificaron los cromosomas de cada una de las metafases de acuerdo a patrón de bandeo presente en ellos (con la contratinción con DAPI se observa un patrón parecido al bandeo GTG).

5.4.6. Interpretación y Análisis.

Se conjuntaron los datos de cada una de las metafases capturadas para cada paciente (de 15 a 20 metafases), realizándose por medio del *“software”* un promedio de la proporción de la hibridación entre las dos sondas marcadas con *“Spectrum Green”* (DNA del paciente) y *“Spectrum Red”* (DNA de referencia). Esto se basa en una proporción de los colores verde/rojo, con valores en un intervalo menor a 1.20 y mayor a 0.80 para lo normal; una proporción mayor a 1.20 para ganancias de material cromosómico (predominio del verde sobre el rojo) y una

proporción menor de 0.75 para pérdidas del material cromosómico (predominio del rojo sobre el verde).

5.5. Relación de los datos obtenidos por medio de CGH con los datos histológicos.

Por ultimo se relacionó los datos obtenidos por la técnica de CGH con los datos proporcionados por el departamento de oncología pediátrica del hospital de pediatría del CMN SXXI (como son localización del tumor, edad del paciente y clasificación histológica). Se buscaron en las bases de datos existentes en la red, genes que se localizaron en las regiones cromosómicas que presentaron pérdidas o ganancias de material genético, para investigarlos en futuros trabajos.

6. Resultados.

En el presente trabajo se incluyeron a 20 pacientes. A continuación se muestra algunas de sus características como su edad, año de diagnóstico (Dx), sitio de localización del tumor e histología (datos proporcionados por el Departamento de Oncología del Hospital de Pediatría del CMSXXI) , así como el número de paciente, y el número de muestra asignado en el laboratorio (tabla 2).

Tabla 2. Características clínicas de los pacientes y año de diagnóstico del tumor. Se muestra el número de muestra y del paciente, edad, sexo, fecha de diagnóstico y recopilación, localización del tumor y tipo histológico.

No. DE MUESTRA	No. DE PACIENTE	EDAD	SEXO	AÑO DE Dx	SITIO	HISTOLOGIA
1	PQ-1245	2 años 5 meses	M	2005	Supra e intratentorial	Celular
2	PQ-379	4 años	M	2005	4to ventrículo	Celular clásico
3	PQ-424	14 años	F	1996	Fosa posterior	Anaplásico
4	PQ-86	8 años	M	2005	Supratentorial	Anaplásico
5	PQ-252	3 años	M	2006	Fosa posterior	Celular II
6	PQ-795	2 años 6 meses	F	1998	Supratentorial	Anaplásico
7	PQ-93	13 años	M	2006	Supratentorial	Anaplásico
8	PQ-1067	11 años	F	2003	Infratentorial	Celular clásico
9	PQ-25	3 meses	F	1997	Supratentorial	Anaplásico
10	PQ-1339	4 años	F	2004	Fosa posterior	Anaplásico
11	PQ-1833	12 años	M	1998	Fosa posterior	Anaplásico
12	PQ-571	1 año 8 meses	F	2003	Fosa posterior	Anaplásico
13	PQ-1411	5 años 7 meses	M	2005	Fosa posterior	Anaplásico
14	PQ-1353	5 años	M	2005	Cerebelo	Celular
15	PQ-149	6 años	F	2000	Supratentorial	Anaplásico
16	PQ-144	11 años	M	1997		Celular
17	PQ-836	9 años	M	2001	Frontal	Celular
18	PQ-906	8 años	F	2004	Fosa posterior	Celular clásico
19	PQ-1267	1 año	M	1998	Cerebelo	Celular
20	PQ-742	12 años	M	2000	Supratentorial	Anaplásico

La edad del total de los pacientes se situó entre los 3 meses a los 14 años con una media de 6 años. Y el porcentaje de edad se muestra en la figura 6.

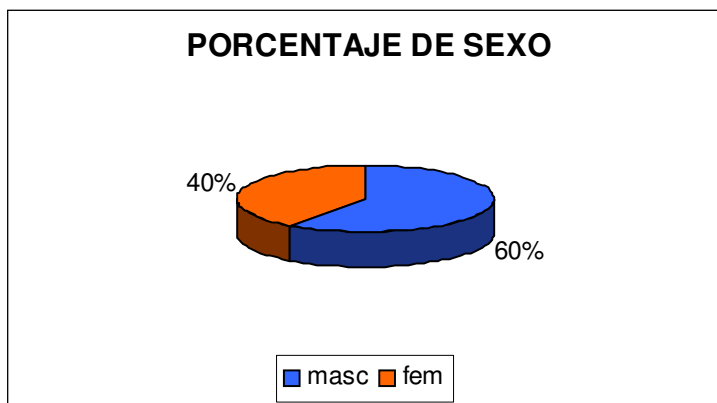


Figura 6. Proporción de pacientes por genero.

La mayoría de los pacientes (el 45%) desarrollaron el tumor en la fosa posterior, siendo el sexo femenino el que presento la mayor frecuencia de estos. Los endimomas localizados en la zona supratentorial representaron el 25% (figura 7).

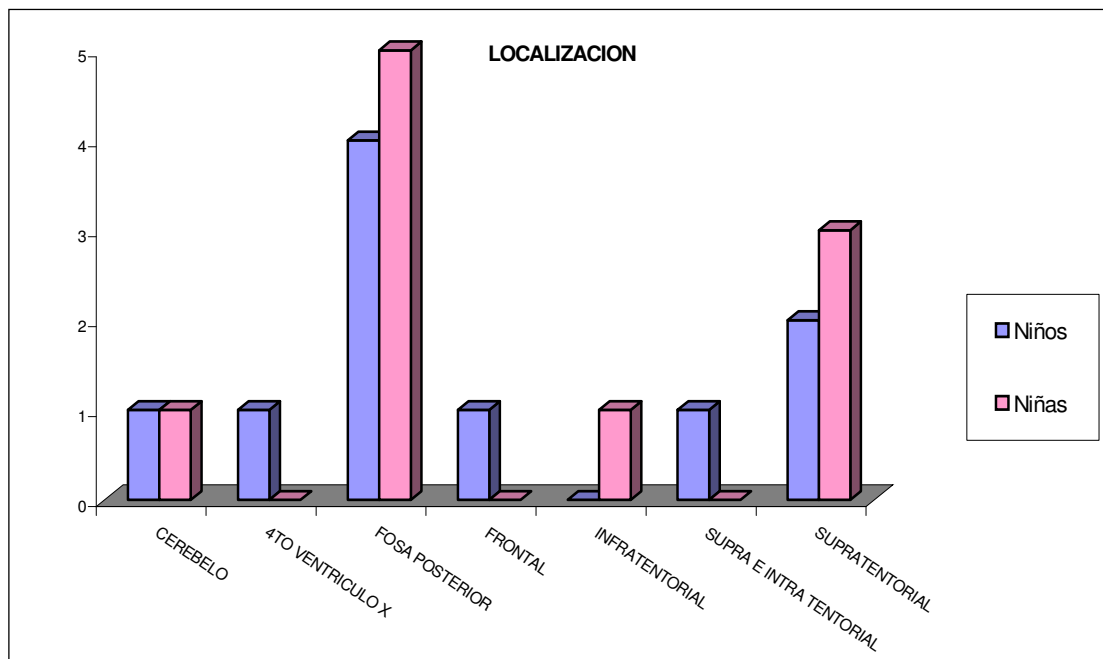


Figura 7. Localización del endimoma, número de pacientes que lo presenta y su sexo. En azul los pacientes de sexo masculino, y en rosa los pacientes de sexo femenino.

En cuanto a la clasificación histológica, se observó que el ependimoma anaplásico fue el más frecuente con 11 casos (de los cuales 7 se presentaron en pacientes de sexo femenino y 4 en pacientes de sexo masculino) lo que representa el 55% del total, seguido por el ependimoma celular con 5 casos con el 25% (todos pacientes de sexo masculino), 3 casos de ependimomas celular clásico (2 de sexo femenino y 1 de sexo masculino) que se refiere al 15% y por último el ependimoma celular II con un solo caso con el 5%. En la figura 8 se observa el número de pacientes que presentan cada tipo de ependimoma.

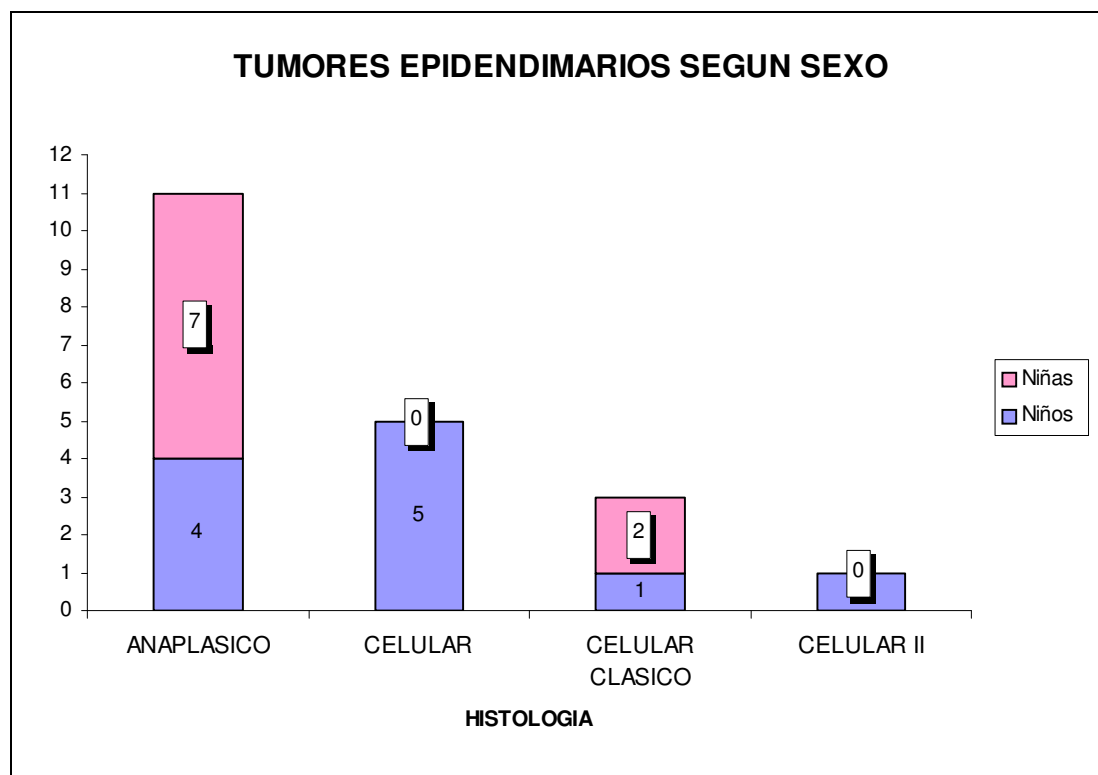


Figura 8. Tipo de tumor (clasificación histológica), y número de pacientes que lo presentan por genero. En azul los pacientes de sexo masculino y en rosa los pacientes de sexo femenino.

En la figura 9, podemos observar la integridad del DNA extraído de las 20 muestras de ependimomas incluidas en parafina, y el tamaño de los fragmentos de DNA (peso

molecular en pares de bases: pb) que fue obtenido al intrapolar las muestras de DNA con un marcador de peso molecular (1 Kb DNA “Ladder” de Invitrogen). En la misma figura se observa la comparación de los resultados obtenidos en el laboratorio contra los resultados reportados por Liborio al extraer DNA de tejidos igualmente incluidos en parafina de diferentes años. El tamaño del DNA obtenido en nuestro laboratorio está muy por encima de los obtenidos por Liborio y su grupo; mientras ellos presentaron valores apenas superiores de 800 pb el valor presentado por nosotros es de hasta 12,216 pb.

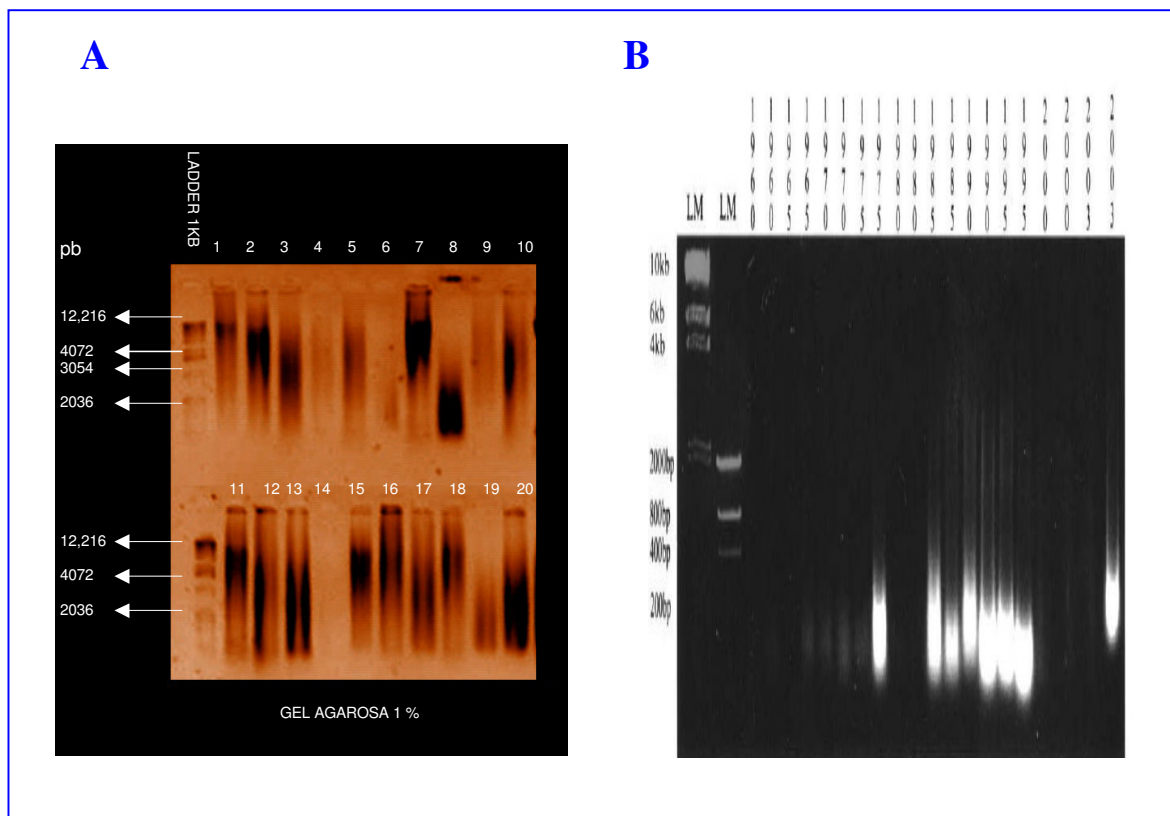


Figura 9. Comparación de la integridad del DNA extraído de las muestras de ependimomas contra los resultados obtenidos por Liborio et al. en el 2005 de tejidos incluidos en parafina. A: Gel de agarosa al 1%; en el primer pozo del lado izquierdo de ambas filas se encuentra el marcador de peso molecular (de una 1kb), los números del 1 al 20 son los asignados a los DNA de las muestras tumorales . B: Gel de agarosa presentado por Liborio et al., en la parte superior se muestra los años en los cuales los tejidos fueron incluidos y del lado izquierdo se observa el marcador de peso molecular.

La concentración del DNA obtenido de los ependimomas en parafina, la pureza que presenta cada uno de ellos, así como el año de colecta de las muestras tumorales se indica en la tabla 3.

Tabla 3. Concentración y pureza del DNA extraído de las muestras tumorales. En la tabla se presenta el numero asignado a los pacientes, año de colecta; concentración obtenida con electrofotometría de UV y pureza observada del DNA extraído .

No. de paciente	Año de colecta	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Pureza
PQ 1245	2005	1616.6	1.66
PQ 379	2005	700.9	1.80
PQ 424	1996	2020.7	1.64
PQ 86	2005	175.5	1.58
PQ 252	2006	3370.2	1.74
PQ 795	1998	471.2	1.60
PQ 93	1999	6968.2	1.56
PQ 1067	2003	1844.7	1.74
PQ 25	1997	744.2	1.52
PQ 1339	2003	2678.7	1.60
PQ 1833	1999	1792.1	1.62
PQ 571	2005	2042.6	1.62
PQ 1411	2005	1661.9	1.74
PQ 1353	2005	408.8	1.63
PQ 149	2000	756.8	1.77
PQ 144	1999	912.6	1.62
PQ 836	2001	851.4	1.80
PQ 906	2004	1098	1.63
PQ 1267	1998	374.9	1.76
PQ 742	2000	1396.9	1.79

Como se indica en la tabla anterior la muestra tumoral a la cual se le extrajo la menor cantidad de DNA fue la PQ 86 que presento 175.5 $\mu\text{g/ml}$, la muestra con mayor concentración fue la del paciente PQ 93 con 6968.2 $\mu\text{g/ml}$, las 18 muestras restantes tuvieron una concentración dentro de este rango, el valor medio fue de 1594.34 $\mu\text{g/ml}$. Mientras la media de la pureza del DNA obtenida fue de 1.67. Tanto la integridad del DNA como el peso molecular (figura 9A) y la concentración y pureza (tabla 3) estuvieron dentro de los valores requeridos para realizar el CGH. El DNA de los pacientes (PQ) subrayados con amarillo (424, 795, 93, 1067, 25, 1339, 571, 149 y 906) fue el que se utilizo para el análisis con CGH ; al haber presentado los mejores valores de concentración, pureza e integridad. De estas 9 muestra, 8 fueron de niñas y 1 de varón.

La figura 10 muestra el marcaje con "*Nick traslation*" del DNA del paciente PQ 149 (marcado con "*Spectrum Green*") y del DNA control (marcado con "*Spectrum Red*"). A su vez se observa en el primer carril (de izquierda a derecha) el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, en el segundo carril el DNA normal (DNA control) sin marcar, y en el tercer carril el DNA del PQ 149 sin marcar; estos carriles (2 y 3) muestran los DNA que se marcarían posteriormente. En la imagen (figura 9) se puede observar que al mismo tiempo de que la enzima adhiere los fluoroforos al DNA también lo corta en fragmentos de menor peso. El tamaño de los fragmentos obtenidos al cortar el DNA (de los pacientes y control) con la enzima de "*Nick traslation*" se observa en los carriles 4 y 5. Estos fragmentos deberían ser lo más parecido posible (entre el DNA control y los DNA de los pacientes) en cuanto al tamaño y en cuanto al peso molecular, para ser hibridados.

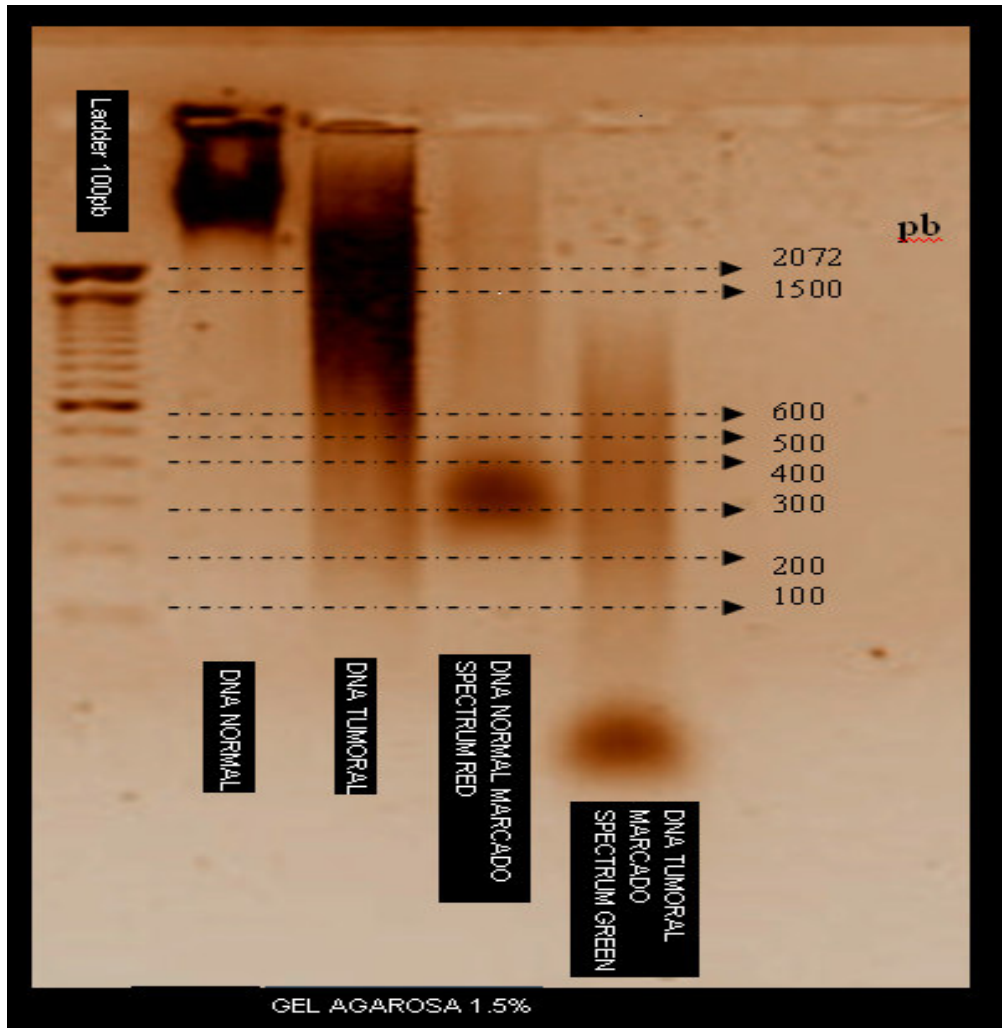


Figura 10. Marcaje con “*Nick traslation*” del DNA del paciente PQ 149 y del DNA control (DNA normal).

Posteriormente, en la figura 11 se presenta una micrografía, de una metafase hibridada con el DNA del paciente PQ 424 y con el DNA del control, tomada por el microscopio de fluorescencia que contiene filtros tricromáticos permitiendo observar los dos fluoróforos (verde y rojo) y la contratinción (en azul); al combinar los dos fluoróforos se observa una imagen con un color compuesto (verde opaco) y finalmente se puede observar la metafase con un patrón de bandas GTG con el cual se clasifican los cromosomas por su patrón de bandeado. Se seleccionaron de 15 a 20 metafases por paciente para el análisis con el *“software”*. Las metafases deben de presentar la menor cantidad de grumos posibles, deben de tener un revelado no opaco y lo más uniformemente visible.

Los grumos se presentan cuando los fragmentos obtenidos al realizar el marcado de las sondas son muy grandes.

La imagen compuesta es la que el “software” utiliza para realiza el análisis de la hibridación; mediante los píxeles que detecta, obtiene las pérdidas y ganancias en cada región, como ya se dijo un predominio del verde sobre el rojo da como resultado una ganancia, y un predominio del rojo sobre el verde es una pérdida.

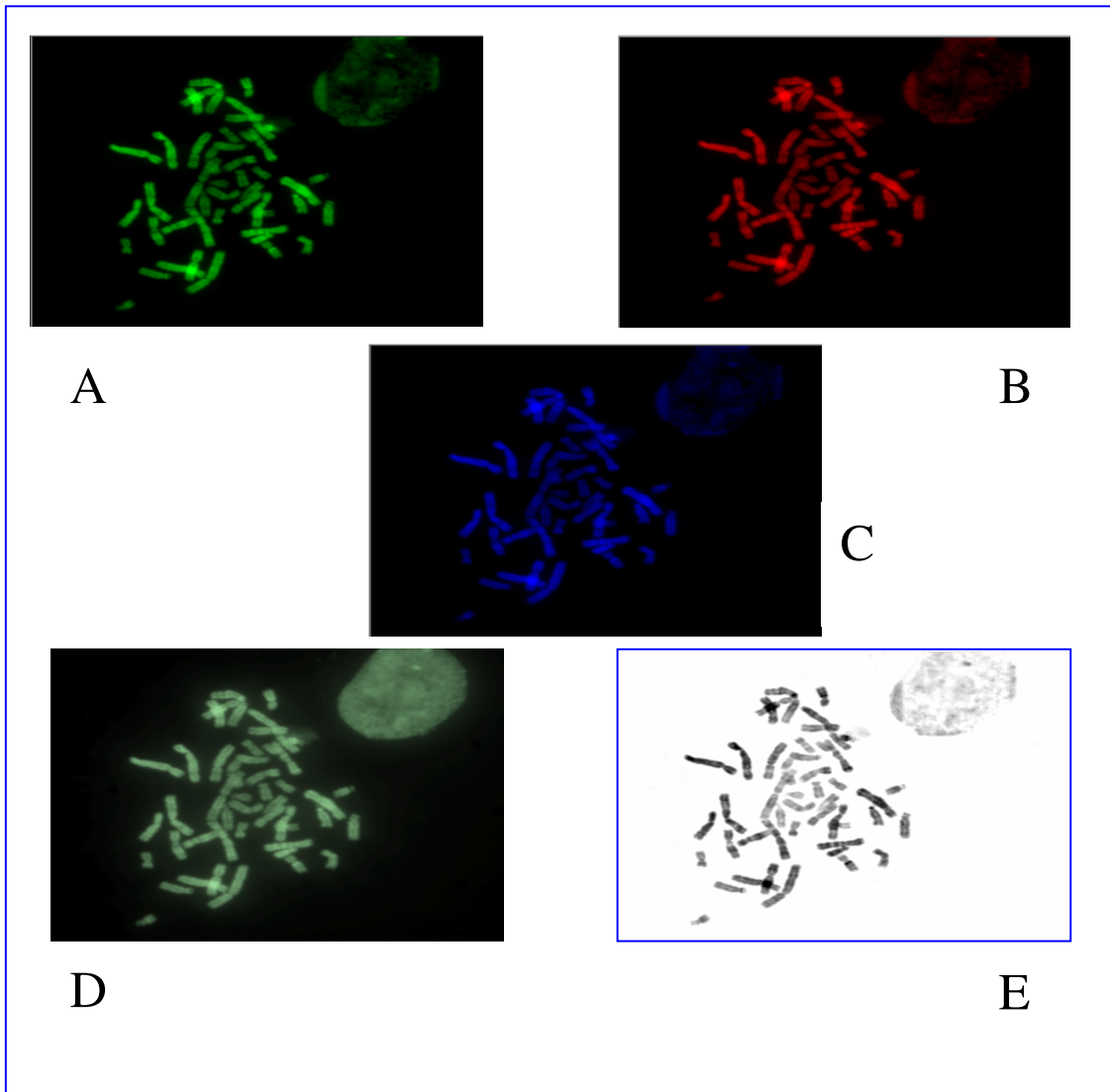


Figura 11. Micrografía vista con distintos filtros de una metafase hibridada, del paciente 424 obtenida mediante CGH. A: Con Spectrum Green (DNA del paciente). B. Spectrum Red (DNA control). C: Con DAPI II. D: Imagen compuesta. E: Patrón de bandas GTG. Corresponden al paciente PQ 424.

En la figura 12 se presenta el cariotipo realizado a una de las metafases hibridadas, en distintos colores (verde, rojo, azul, compuesto y patrón GTG), como sea mencionado se toma como referencia el patrón de bandas GTG para realizar el cariotipado. Cada par cromosómico analizado tienen un promedio de cromosomas seleccionados (de 14 a 16), por lo que en la mayoría de las metafases seleccionadas es muy difícil ver la dotación diploide completa, debido a los criterios mencionados en el párrafo anterior; en la metafase presentada en la figura 12 solo se observan 38 cromosomas.

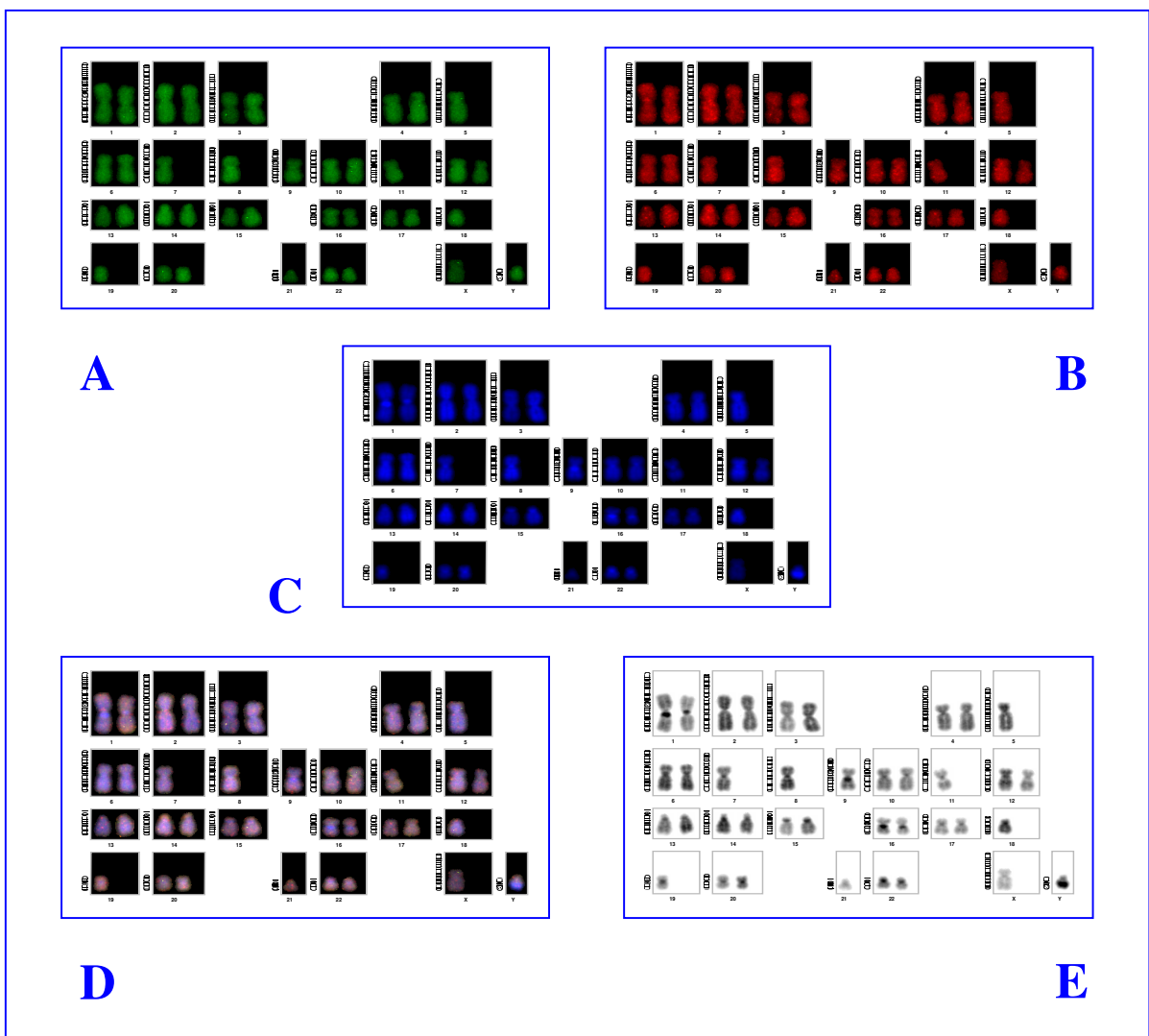


Figura 12. Cariogramas de una metafase hibridada del paciente PQ 25. A: Hibridación con “Spectrum Green”. B: Hibridación con “Spectrum Red”. C: Con DAPI II. D: Imagen compuesta. E: Patrón de bandeado tipo GTG.

Se muestra la proporción del total de cromosomas analizados (figuras 13 y 14) indicando el numero de cromosoma (clasificación al realizarse el cariotipo) y el total de cromosomas utilizados para cada uno de ellos; en la figura 13 se especifica cada uno de los cromosomas con una línea de color rosa, mientras que en la figura 14 solo se muestra el promedio de los cromosomas utilizados (14 a 16 para cada cromosoma) con una línea azul.

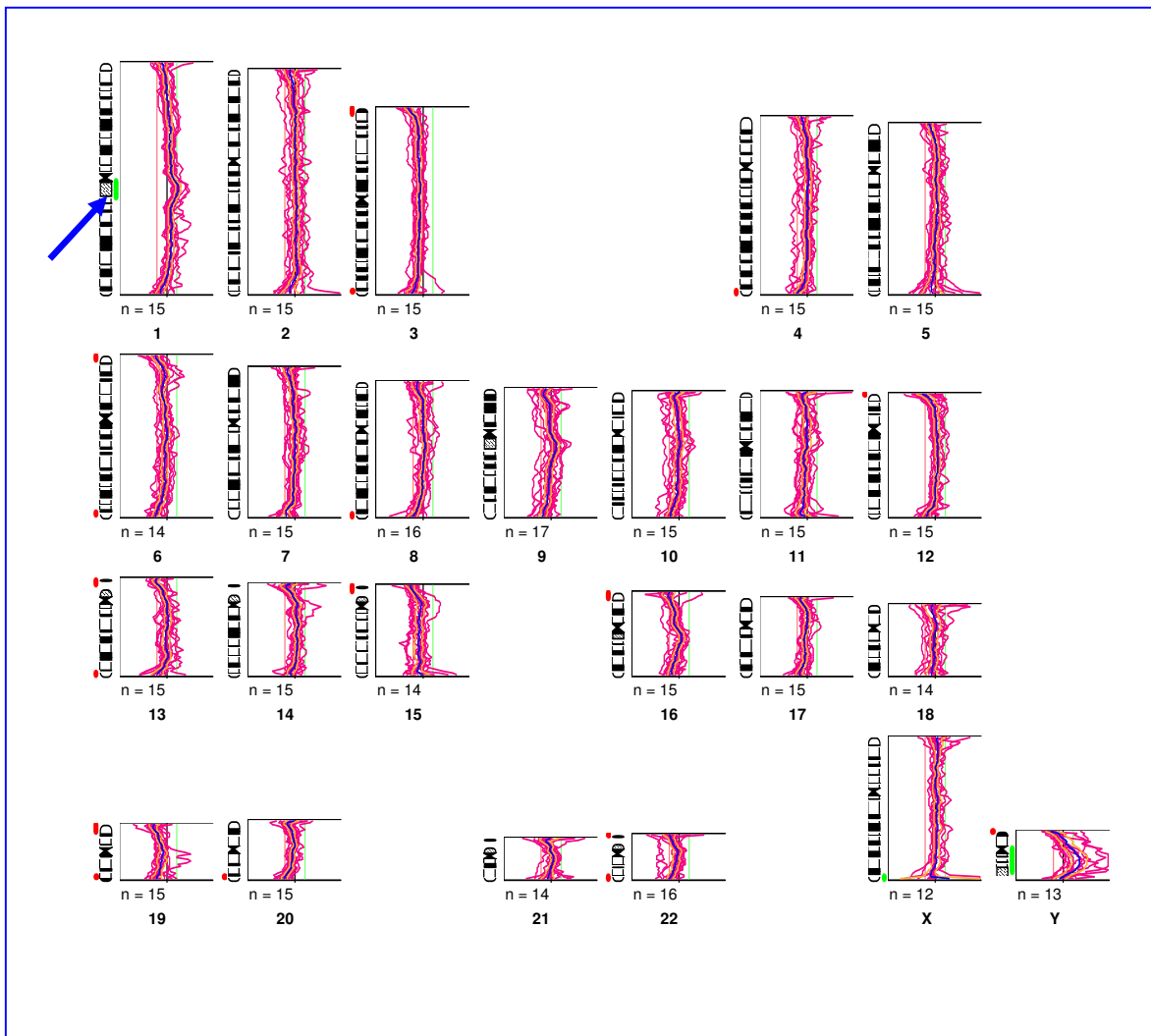


Figura 13. Análisis de la proporción de la hibridación para cada uno de los cromosomas del paciente PQ 149. Las barras a la derecha del cromosoma indican niveles altos de amplificación (verde: relación paciente/control > 1.2). Barras a la izquierda indican pérdidas (rojo: relación paciente/control < 0.8). La líneas rosas corresponden a valores para cada metafase analizada. n: Numero total de cromosomas analizados para ese cromosoma. La flecha azul indica una alteración (ganancia) interesante.

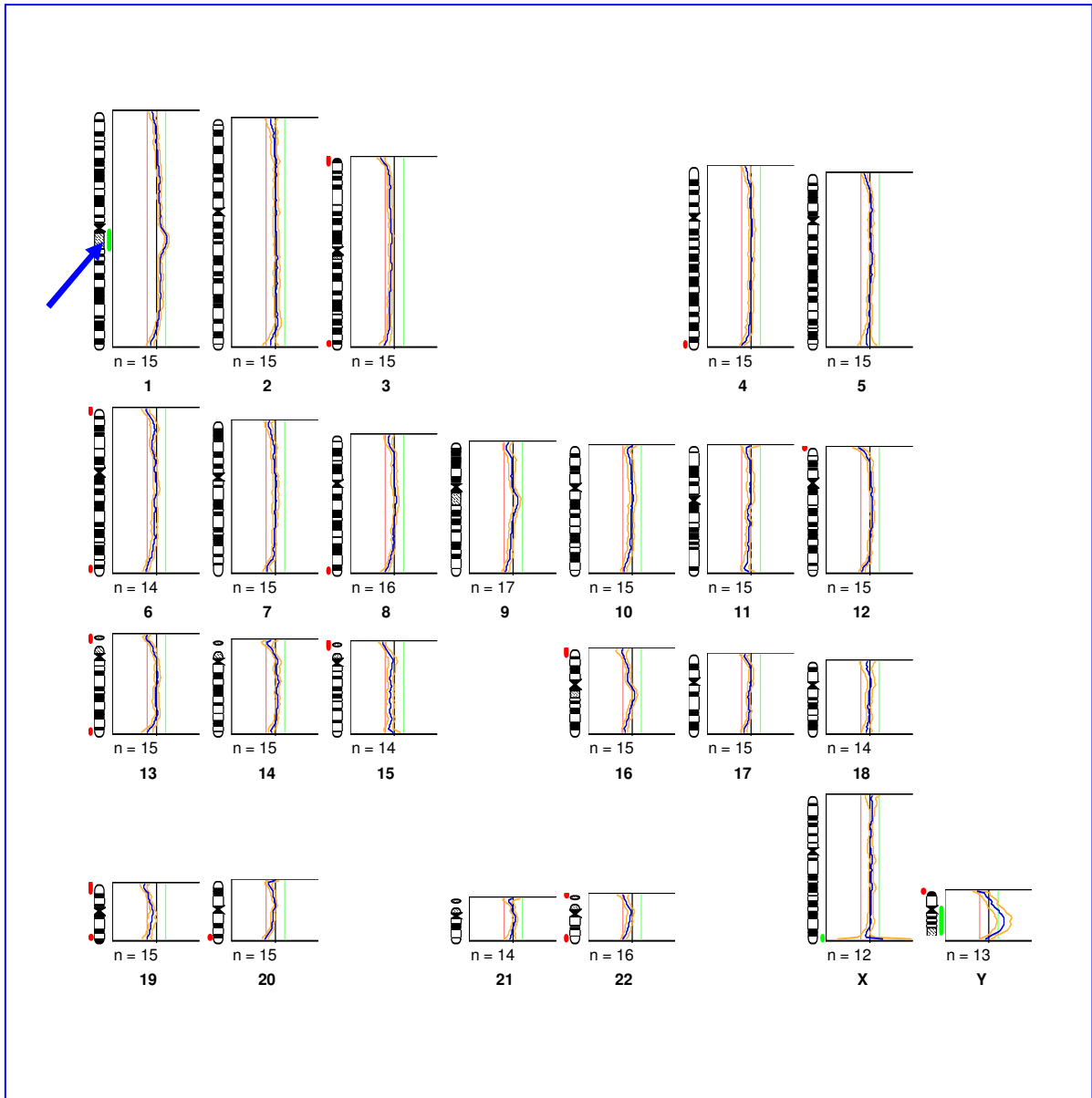


Figura 14. Promedio total para cada par de cromosomas analizados por “software” del PQ 149. Las barras a la derecha del cromosoma indican niveles altos de amplificación (verde: relación paciente/control > 1.2). Barras a la izquierda indican pérdidas (rojo: relación paciente/control < 0.8). Si la media tiende hacia la izquierda el *software* representa como una pérdida (banda color rojo del lado izquierdo), si la media tiende hacia la derecha la detecta como una ganancia (banda color verde del lado derecho).

En la tabla siguiente (tabla 4) se muestra el total de las alteraciones cromosómicas encontradas en el presente trabajo. Se indica en verde las regiones repetidas en el telomero, en rojo las alteraciones localizadas en regiones de interés (regiones que se presentaron repetidas en más de 2 pacientes o que no se encontraron localizadas en telomero o en regiones centroméricas). El único paciente que no presentó alteraciones en el estudio con CGH fue el PQ 906. Mientras que en el paciente PQ 149 se presentaron la mayor cantidad de alteraciones, en 18 regiones diferentes; lo que representa el 20.93% del total de anomalías.

Tabla 4. Regiones cromosómicas con alteración presentes en cada paciente. Se muestra el número de paciente, histología del tumor y localización, alteraciones (ganancias y pérdidas) cromosómicas encontradas en los 9 paciente.

No. PQ	HISTOLOGÍA	LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	REGIÓN CROMOSOMICA CON ALTERACIÓN	
			GANANCIAS	PERDIDAS
25	Anaplásico	Supratentorial	15p13	10q26.3; 11p15.5; 14q32.3; 20p13; 21q22.3; 22q13.3
93	Anaplásico	Supratentorial	4q12; 9q12 ; 12p13.3; 15p13; 21p13; 22p13	
149	Anaplásico	Supratentorial	1p11-1q11- 4q12-4q21 ; 1q44; 3p12-3p11.2-3p11.1-3q11.1; 3p26,3q25.3-3q26.1; 5p11-5q11.1-5q11.2; 9q12 9q13; 14p11.1-14q11.1-14q11.2; 15p11.2-15p11.1-15q11.1-15q11.2; 16q11.1-16q11.2-16q12.1; 18p11.2-18p11.1-18q11.1; 20p11.1-20q11.1-20q11.2	6p25; 16p13.3; 17p13, 17q25; 20q13.3; 22q13.3
424	Anaplásico	Fosa posterior	14q32.3; 18p11.32	19p13.3
571	Anaplásico	Fosa posterior	8p23.3; 12p13.3	3q29; 11p15.5; 12p13.3, 12q24.33; 14q32.3; 19p13.3, 19q13.3, 19q13.4; 21p13-21p12; Xq27-Xq28
795	Anaplásico	Supratentorial	4q12-4q21 ; 15q26.3; Xq28	3p26-3p25, 3q29; 4q35; 6p25, 6q27; 8q24.3; 10q26.3; 12p13.3; 13p13-13p12, 13q34; 15p13-15p12; 16p13.3; 19p13.3-19p13.2, 19q13.4; 20q13.3; 22p13, 22q13.3; Xq28
906	Celular clasico	Fosa posterior		
1067	Celular clasico	Infratentorial	1p36.3; 2q37.3; 6p25; 17p13, 17q25; 21p13	3q29
1339	Anaplásico	Fosa posterior	4q35; 5q35.3; 9q34.3; 10p15; 14q32.3; 15q26.3; 18q23.; 21p13; 22p13	1p36.3; 13p13, 17q25; 18p11.32

XX	Regiones de interes
XX	Regiones repetidas en telomeros
XX	Regiones de interes repetidas

En la figura 15 se resume las alteraciones cromosómicas encontradas en el presente trabajo, además de indicar con flechas de color azul las más interesantes y con flechas de color rojo las alteraciones que se repiten en regiones teloméricas.

Se observaron 86 alteraciones cromosómicas (tabla 4 y figura 15), de las cuales 41 fueron ganancias y 45 fueron pérdidas; el cromosoma que presentó la mayor cantidad de regiones alteradas fue el cromosoma 3 con 7 alteraciones que representan el 8.13% del total, seguido de los cromosomas 1, 19 y 22 con el 6.97%, posteriormente los cromosomas 12, 14, 15, 17 y 21 con el 5.81%; mientras tanto el cromosoma 7 no presentó ninguna anomalía.

En los cromosomas 1, 2, 5 y 9 no se observaron pérdidas, en tanto en los cromosomas 11, 13 y 19 no hubo ganancias.

Las regiones cromosómicas con el mayor porcentaje de anomalías fueron la 14q32.3 y la 21p13 con el 4.65% cada una, seguidas de las regiones 1q12, 3q29, 6p25, 15p13, 19p13.3, 22p13 y 22p 13.3 cada una con 3.48%.

Las alteraciones localizadas en regiones teloméricas representan el 79.06%, en cuanto las localizadas en regiones centroméricas o subcentroméricas tienen el 12.79% del total.

Las regiones que presentaron alteraciones y que son consideradas de interés por su localización en el cromosoma son: 1q12, 3q25.3, 9q12, 12p13.3, 14q32.3, 19p13.2, 19q13.3 y Xq27 que se señalan con flechas azules en la figura 14.

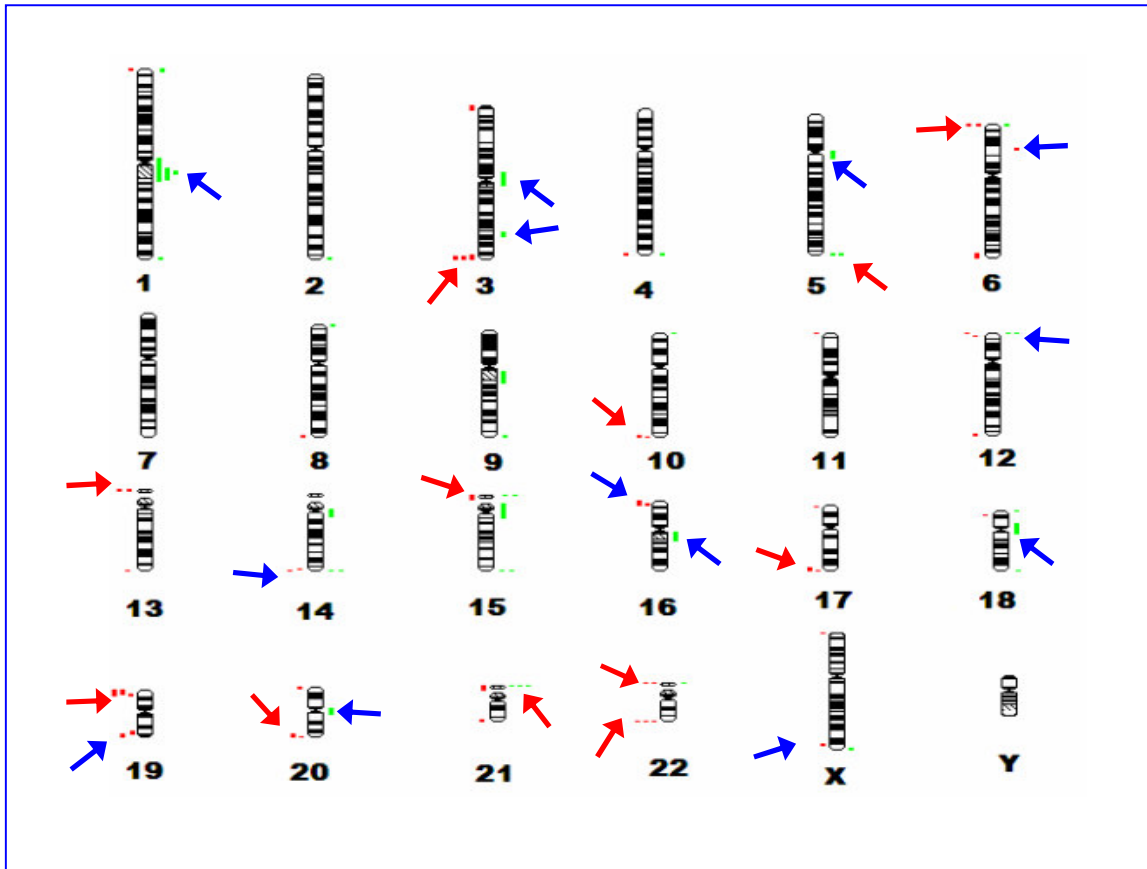


Figura 15. Resumen de las alteraciones cromosómicas encontradas en el presente estudio. Las barras a la derecha del cromosoma indican niveles altos de amplificación (verde: relación paciente/control > 1.2). Barras a la izquierda indican pérdidas (rojo: relación paciente/control < 0.8). Las flechas azules indican las alteraciones que son de interés por el sitio y cromosoma en donde se localizan, algunas de estas se repiten en dos o más pacientes. Las flechas rojas muestran regiones teloméricas con alteraciones que se repiten dos o más veces.

En la siguiente tabla (tabla 5) se presenta algunas regiones que por su localización, el número de veces que se repitieron y/o por tener algún gen que participe en el ciclo celular o en el algún tipo de desarrollo tumoral, resultaron de interés en el presente estudio.

Tabla 5. Regiones cromosómicas alteradas y algunos genes presentes en ellas. Se presenta el número de cromosoma, la región alterada, así como el tipo de alteración (perdida o ganancia) y algunos genes particulares presentes en estas regiones.

CROMOSOMA	REGIÓN CROMOSOMICA	ALTERACIÓN	GENES
1	1q21	ganancia	NOTCH2
	1p11-1p13	ganancia	NOTCH2
	1q21	ganancia	CLK2
	1q21	ganancia	MCL1
3	3p12-3q11.2	ganancia	ILI2A
	3q25.32	ganancia	CCNL1
	3q25.32	ganancia	MLF1
4	4q34-4q35	ganancia y perdida	HPGD
6	6p25	ganancia y perdida	HUS1B
8	8q24.3	perdida	LY6E
	8q24.3	perdida	LY6H
9	9q11-9q13	Ganancia	PDGFA
11	11p15.5	Perdida	P57
12	12p13.32	ganancia y perdida	CCND2
13	13q34	Perdida	LOC122258
14	14q32.32	ganancia y perdida	ELK2P1
19	19q13.2	perdida	JUNB
	19q13.2	perdida	JUND
	19p13.3	perdida	TNFAIP8L1
	19p13.3	perdida	VAV1
	19p13.3	perdida	NOVA2
	19p13.3	perdida	PTOV1
	19q13.3	perdida	RRAS
21	21q21.3-21q22.1	perdida	RIPK4
	21q21.3	perdida	SNFILK
22	22q13.33	Perdida	RABL2B
X	Xq28	ganancia y perdida	RAB39B
	Xq27.3	perdida	CTAG2
	Xq27.3	perdida	MAGEA5

A groso modo algunos de estos genes participan en el ciclo celular, o son factores de crecimiento, participan en el desarrollo tumoral, son oncogenes y/o participan en algún carcinoma en específico. También se presentan diversos genes que participan en el desarrollo particularmente en diferenciación o se expresan en el SNC.

7. Discusión.

El tamaño de muestra programado inicialmente en este trabajo, se recolecto mediante un método de muestreo en el periodo que abarca de junio de 1996 a enero del 2006 en el Departamento de Oncológica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI. Como se menciona anteriormente en el apartado de metodología durante este periodo se recopilaron 20 biopsias de ependimomas que fueron incluidas en parafina; dentro de estos 20 pacientes predomino el genero masculino en una proporción 1.5:1, datos que congenian con la literatura reportada en donde la frecuencia de ependimomas es mayor en los niños que en las niñas; para ambos géneros la edad de mayor incidencia se presenta en menores de 5 años (Coulon y Hill, 1977).

En cuanto a la localización de los ependimomas la mayoría (45%) se presento en la fosa posterior y solo el 5% en el cuarto ventrículo. Estos tumores tienen la capacidad de originarse en cualquier lugar del sistema ventricular o del canal espinal, aunque el sitio más común es en la fosa posterior (abarcando cuarto ventrículo principalmente), seguido de el nivel supratentorial, en una relación 2:1. Entre ambas localizaciones abarca el 90%;(Dyer et. al. 2002). Lo cual concuerda con los resultados presentados en este trabajo.

Cabe señalar que con los características preliminares descriptivas como son la proporción de pacientes por genero, localización del tumor, etc de los 9 pacientes utilizados para CGH no fueron representativas del total de la muestra.

Por otro lado la extracción y cuantificación del DNA mostró rendimientos lo bastante buenos para realizar la técnica del CGH; para lo cual se requiere fragmentos de DNA superiores a 200 pb (Kallioniemi et al. 1995), con las técnicas

convencionales de extracción de DNA para tejidos incluidos en parafina estos fragmentos eran imposibles de obtener como indico Liborio et al. en el 2005; sin embargo con la técnica modificada en nuestro laboratorio se obtuvieron rendimientos muy por encima de los obtenidos por Liborio y su grupo, obteniendo fragmentos de más de 12, 000 pb; y concentraciones por arriba de 6000 µg/ml.

Sin embargo no hubo relación entre el año de recolección de la muestra con los valores de concentración y rendimientos de integridad que presento el DNA de las muestras; probablemente esto se deba al tiempo que se tardó en fijar el tejido; puesto que importantes alteraciones bioquímicas ocurren en los tejidos después de 10 minutos de sufrir anoxia (Kingsbory et al. 1995 y Labat-Moleur et al. 1998). Por tanto, la fijación debe ser rápida para minimizar la degradación de los ácidos nucleicos y proteínas. Otro factor que pudo contribuir es el tiempo de fijación con formalina o formamida. La formalina causa algunos daños en el DNA como son: cross-linking entre las hebras, modificaciones de base, como otros factores, que ocurren durante el almacenamiento, que progresan con el tiempo, por tanto la cantidad de DNA que puede ser obtenida de estos tejidos reduce la longitud de los fragmentos de DNA obtenidos (Weirich et al. 1997 y Pawlowski 1995).

Posteriormente al marcar el DNA extraído de las muestras y del DNA control con Nick translation, utilizando los DNA con mayor peso molecular (superior a 3000 pb) ya que al marcar los DNA con los fluoróforos la enzima de nick translation también corta a estos en fragmentos, estos fragmentos deben de medir entre 200 a 3000 pb para la hibridación posterior; de no estar en este rango, los fragmentos menores a 200 pb son inespecíficos, y los mayores a 3000 pb no hibridan en los cromosomas ocasionando grumos (Kallioniemi et al. 1995). Los tamaños de los fragmentos del DNA control marcado (con spectrum red) y los de los DNA muestra marcados (con spectrum green) fueron lo más similares en cuanto al tamaño. Al mismo tiempo cuando se mezclaron los dos DNA marcados con los dos

fluoroforos, se depositaron en la misma concentración y en la misma cantidad equimolecular, para que pudieran competir de igual forma al momento de la hibridación en los cromosomas. La hibridación fue exitosa como se muestra en los resultados (figura 11).

En este estudio, la presencia de alteraciones cromosómicas fueron observadas en todos los cromosomas en los distintos pacientes exceptuando el cromosoma 7; el número de alteraciones en las copias cromosómicas detectadas por citogenética clásica y CGH en los ependimomas incluyen cromosomas 1, 6, 7, 9, 10, 13, 17, 19 y 22 (Lamszus et al. 2003). Estos hallazgos se han confirmado por datos de genética molecular que han identificado pérdidas en 6q, 9p, 10, 11q, 13q, 17p y 19q. Los genes específicos para estas pérdidas y ganancias alélicas son desconocidos, en la mayoría de los casos (Collins, 2004).

Como se menciona en los resultados los cromosomas que no presentaron pérdidas (delección) fueron 1, 2, 5 y 9; mientras que en los cromosomas 11, 13 y 19 no se encontraron ganancias (duplicaciones). Las regiones cromosómicas pericéntricas de los cromosomas 1, 9 y 16 presentaron duplicaciones, esto se debe a la presencia de heterocromatina en estas regiones (Kallioniemi O-P et al., 1994).

Además se presentaron un gran número de alteraciones en las regiones teloméricas que representa el 79.06% de todas las alteraciones localizadas en el presente trabajo, mientras las encontradas en las regiones centroméricas y subcentroméricas constituyeron el 12.79%. El diseño del genoma humano, comprende elementos repetitivos que pueden estar dispersos o agrupados. Dentro de los primeros, se encuentran los repetidos de bajo número de copias (LCR por sus siglas en inglés) y los repetidos asociados a telómero (denominados TARs por sus siglas en inglés), entre otros. Los segundos comprenden a los elementos interespaciados largos (LINEs), y los interespaciados cortos (SINEs). Dentro de los LINEs se encuentran los elementos Alu, los cuales representan el 10% del

genoma, constituyendo 1 millón de copias, estos elementos, se localizan principalmente en secuencias con alta densidad génica, en unión de genes y pseudogenes, y en secuencias con alto contenido de GC, en donde las sondas pueden hibridar en mayor cantidad al ser regiones inespecíficas (Sharp, 2006; Inove, 2002; Shaw, 2004 y Shaffer, 2000).

Por otro lado estos elementos favorecen los mecanismos más frecuentes en la generación de rearrreglos cromosómicos, procesos alterados durante el proceso de recombinación en la meiosis o bien por un mecanismo de reparación anómalo. Estos procesos incluyen a la recombinación homóloga no alélica (NAHR por sus siglas en inglés) y la unión de extremos no homólogos (Palacios y Arena 2006).

En el caso de deleciones que abarcan más de 1 Mb de material genómico, generalmente se generan a partir de NAHR entre repetidos de bajo número de copias (LCR), con homología mayor al 95% (Sharp, 2006; Inove, 2002; Shaw, 2004 y Shaffer, 2000). Las regiones subtelo méricas, son ricas en repetidos y tienen una alta densidad génica, estos repetidos tienen una alta homología entre las regiones subtelo méricas de diversos cromosomas no homólogos, hasta el grado de compartir secuencias similares de hasta 100 kb (Palacios y Arena 2006).

7 de las 9 muestras presentaron ganancias en gran parte del eje del cromosoma Y (anexo), sin embargo esto es normal ya que sobre este cromosoma se encuentra una gran región de heterocromatina (Kallioniemi O-P et al., 1994). Otra de las razones por la que probablemente este fenómeno ocurre, son las regiones autosómicas muy similares entre los cromosomas X y Y. Cabe señalar nuevamente que 8 de las 9 muestras utilizadas para el CGH fueron de niñas; y las metafases ocupadas en la metodología fueron de varón. Así que el material sobrante de uno de los cromosomas X pudiera estar hibridando sobre el cromosoma Y.

El cromosoma 22, ha sido reportado relacionado con los ependimomas; la incidencia de un 30 a 50% de aberraciones involucran al cromosoma 22, incluyendo monosomía y deleciones de 22q (Korshunov et al.2003), lo que concuerda perfectamente con los datos reportados en este estudio. Además se observó que los pacientes que presentaron pérdidas en la región 22q13.3 tenían un ependimoma de tipo anaplásico y se localizaba en la zona supratentorial. En esta región cromosómica se localiza el gen RABL2B miembro de la familia RAS de oncogenes.

Se encontraron deleciones en las regiones 6q27 y 13q34 y ganancias en la región 1q11-1q21.1 en tumores anaplásicos localizados en la parte supratentorial; los ependimomas clásicos y anaplásicos con ganancia de 1q tienden a ocurrir en la fosa posterior de niños y son más agresivos (Carter et al. 2002). Los resultados mostrados son similares a lo reportado en el 2003 por Korshunov quien indica ganancias en 1q y pérdidas en los brazos cortos de los cromosomas 6 y 13, en tumores intracraneales detectadas también por CGH.

Sin embargo Korshunov asimismo reconoció ganancias en el cromosoma 7 en tumores espinales, que nosotros no pudimos corroborar por no tener tumores de este tipo.

Kramer y colaboradores de 23 casos de pacientes pediátricos con ependimomas intracraneales supratentoriales y de fosa posterior; demostraron una región del cromosoma 6q la cual puede estar involucrada en el desarrollo y/o progresión de los ependimomas en niños. No obstante nosotros encontramos solo en un paciente esta región alterada (6q27).

La región con mayor incidencia en nuestro estudio fue la 14q32.3 con 4 repeticiones de las cuales tres se presentaron en la fosa posterior y solo uno se encontró en la parte supratentorial, los cuatro tumores fueron de tipo anaplásico.

En esta región se presenta el gen ELK2 (ELK2, "*member of ETS oncogen family pseudogene 1*") miembro de la familia de oncogenes ETS que probablemente pueda estar relacionado con el desarrollo de los ependimomas.

Otra región de interés en este trabajo fue ubicada en el brazo largo del cromosoma 1, la región 1q12 que se presentó en 3, no obstante esta zona cromosómica no presenta ningún gen, pero esta región está relacionada con rearrreglos en cáncer humano principalmente la banda de heterocromatina ubicada en esta zona (Surralles et al. 1997 y Callen et al. 2002)

Mientras tanto en el paciente cuyo resultado fue normal, no se puede descartar alguna alteración de menor cantidad de material cromosómico ya que la técnica de CGH tiene una capacidad de resolución limitada; los cambios que impliquen segmentos inferiores a 7-10 Mb no los detecta y segmentos de este tamaño pueden contener miles de genes (Cigudosa, 2004)

En las regiones cromosómicas con alteraciones encontradas se localizan diversos genes, varios de ellos asociados al desarrollo particularmente en la diferenciación y regulación del ciclo celular; también abarca algunos factores de transcripción como dedos de zinc y figuran cuantiosos marcos de lectura abiertos que si bien, todavía no se sabe su funcionamiento no se puede descartar que pudieran funcionar en el desarrollo o en el proceso de carcinogénesis celular.

En este trabajo se sugiere estudiar algunas regiones cromosómicas, así como algunos genes (la tabla 5) que son buenos candidatos para el desarrollo de este tipo de tumores por localizarse en regiones reportadas por otros autores, o por repetirse en más de 2 pacientes en este estudio.

Al margen de los datos obtenidos en presente trabajo se considera permisible puntualizar y determinar ciertas particularidades relevantes, y de alguna forma

válidas, para una clasificación tumoral en un marco molecular de la posible actividad neoplásica en células ependimales, al explorar los cambios cromosómicos en toda la longitud del genoma , y el entendimiento de los mecanismos que rompen la regulación y función normal de la célula. Sin embargo, tomando en cuenta el grado de resolución de la técnica, para obtener los cambios o variantes reales en la estructura y función genómica, es necesario alternar el CGH con otros métodos moleculares de estudio analíticos que establezcan con mayor amplitud la interacción de dichas modificaciones, como puede ser los microarreglos, CESH, PCR tiempo real, FISH de algunos genes en específico, detección de SNP, etc; aclarando así, a nivel celular y molecular los mecanismos que dirigen y regulan la transformación oncogénica celular, al mismo tiempo generar un estudio detallado de esos cambios en el pool genético, permitiendo inclusive en función de los datos obtenidos las condiciones idóneas para un diagnóstico oportuno de la enfermedad e incluso la aplicación de un tratamiento a nivel molecular en un futuro próximo como la terapia génica iniciada hace algunos años para enfermedades específicas.

8. Conclusiones.

Aunque se alcanzaron adecuadamente los objetivos, es cierto que el número empleado de muestras para el análisis con la técnica de CGH no es representativo del total de la población que presenta este tipo de tumor en México, sin embargo también es cierto que constituye un número importante para el estudio molecular prospectivo de los ependimomas, y observar de manera global las asociaciones que existen entre la clasificación de este tipo de neoplasia (clasificación histopatológica) y las regiones que resultaron alteradas.

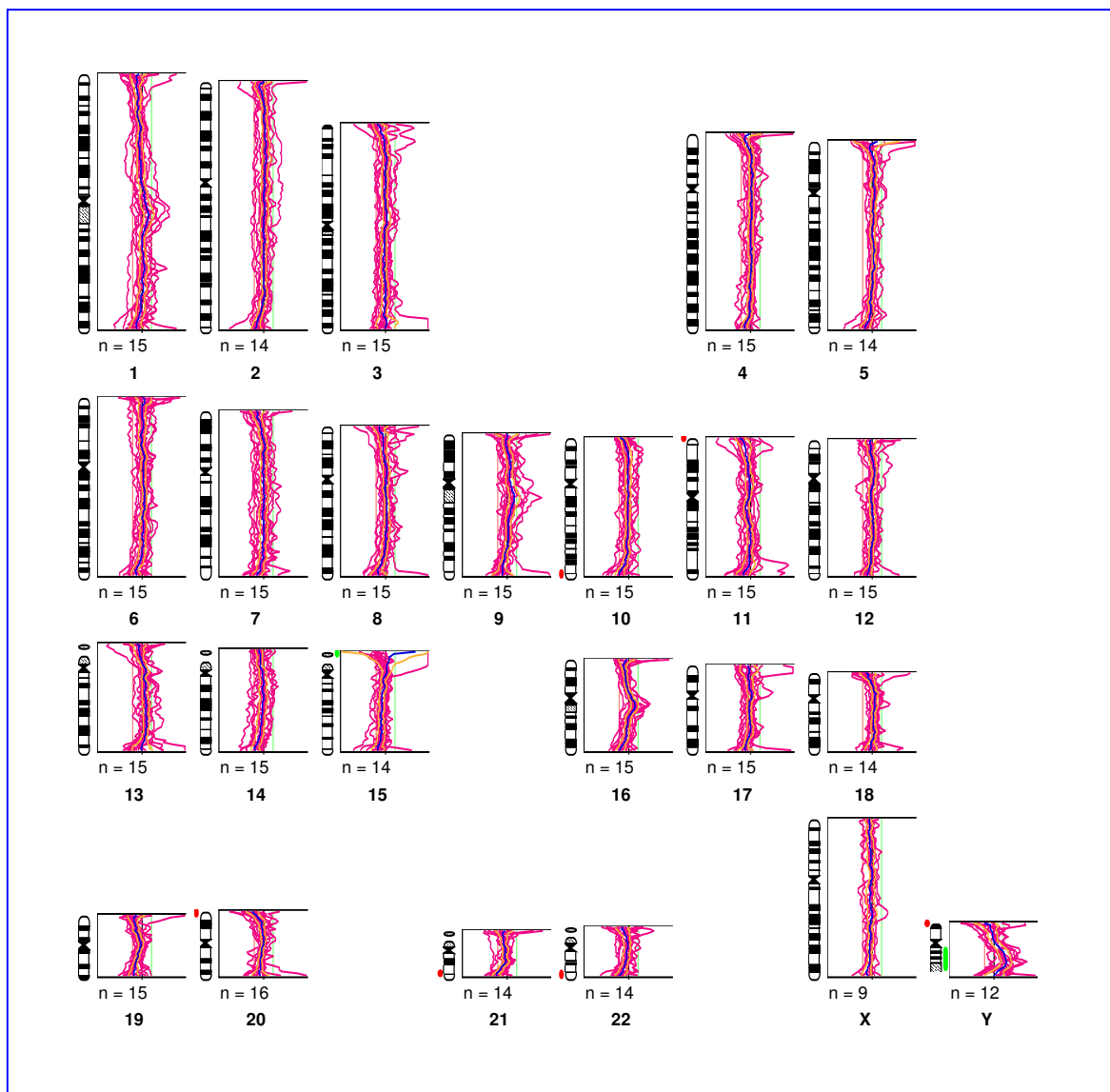
La mayoría de las regiones que presentaron alteraciones cromosómicas estuvieron asociadas con una gran diversidad de genes, por lo cual se seleccionó una cantidad pequeña de genes que por su función y participación en el desarrollo embrionario, intervención en la transformación oncogénica y/o participación en el ciclo celular son fuertes candidatos para ser estudiados en trabajos posteriores.

Los resultados mostrados en esta tesis; empleando una población Mexicana, concuerdan en lo general con los estudios citados. Pero cabe señalar que estos trabajos se realizaron con otro tipo de poblaciones.

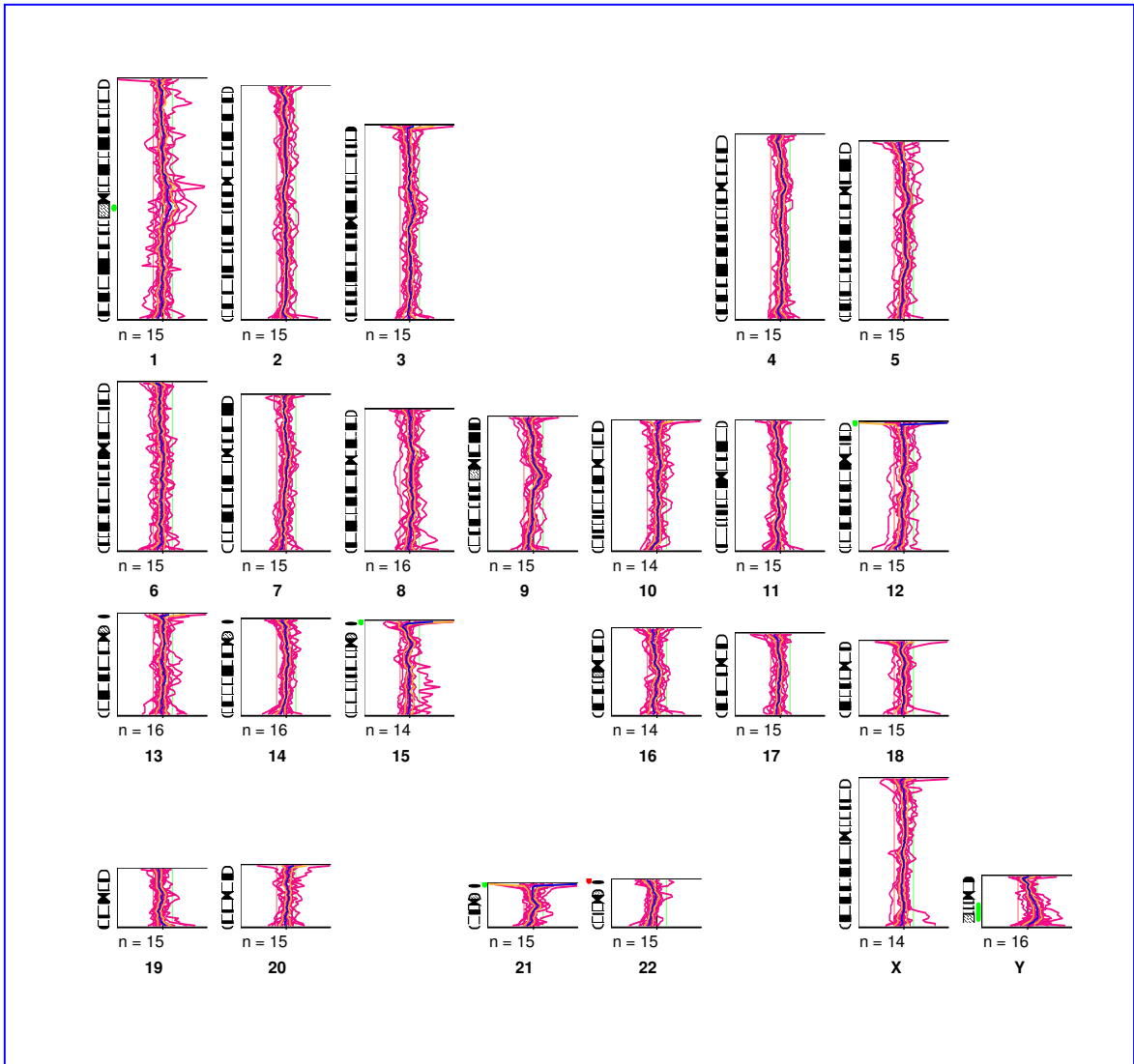
Por último, no se encontró ningún gen dentro de las regiones afectadas asociado con este tipo de carcinoma, lo que sugiere que se necesitan mucho más trabajos referentes a esta enfermedad para entender por completo su mecanismo de desarrollo, pero principalmente para realizar un diagnóstico oportuno e inclusive la aplicación de un tratamiento a nivel molecular.

Se pretende analizar con CGH las 11 muestras que no fueron ocupadas, para anexarlas a los resultados y con ello mejorar la representatividad del estudio.

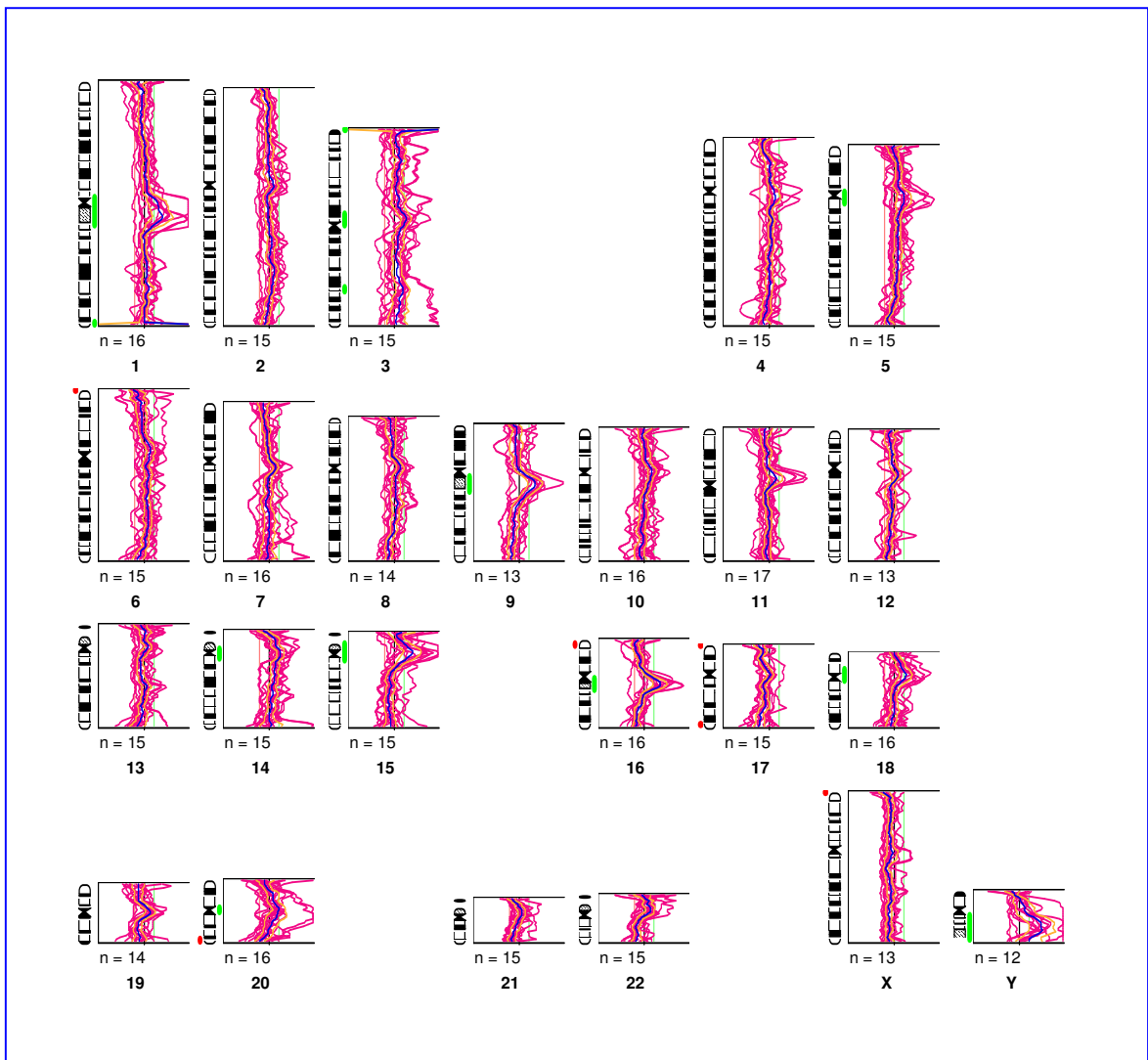
Anexo I.



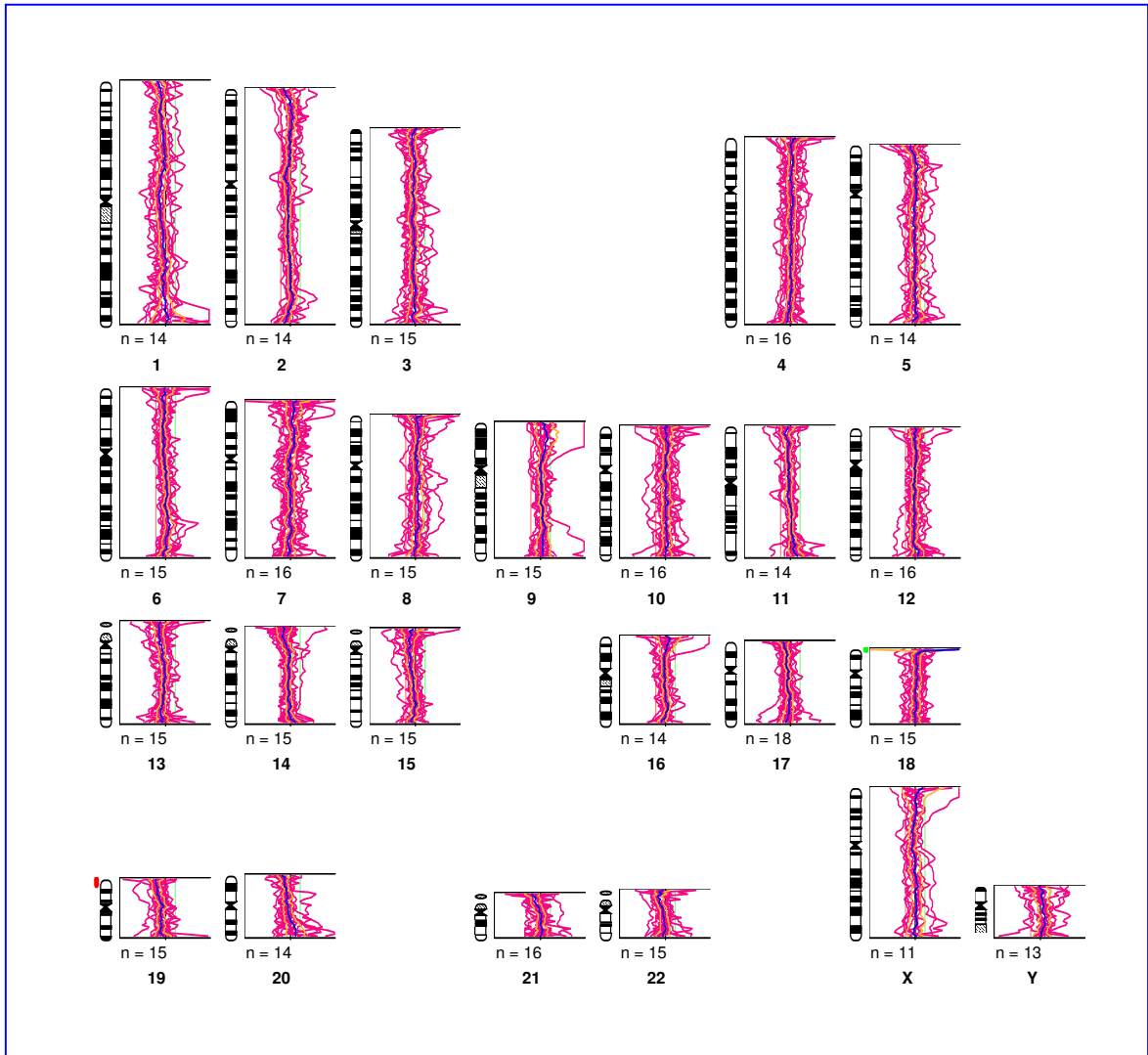
Cariograma del paciente PQ 25. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el "software Quips Genetic Imaging".



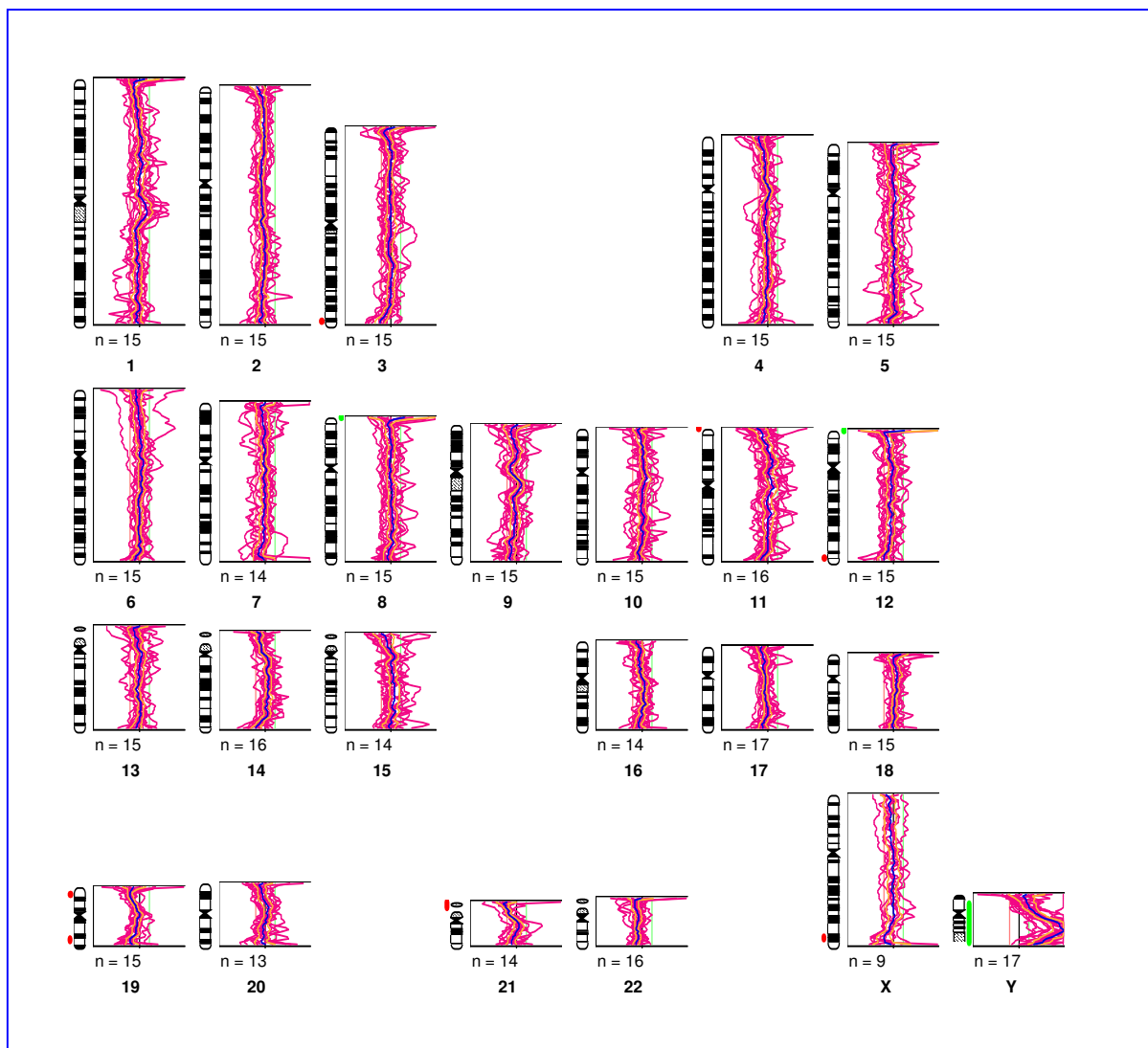
Cariograma del paciente PQ 93. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el "software Quips Genetic Imaging".



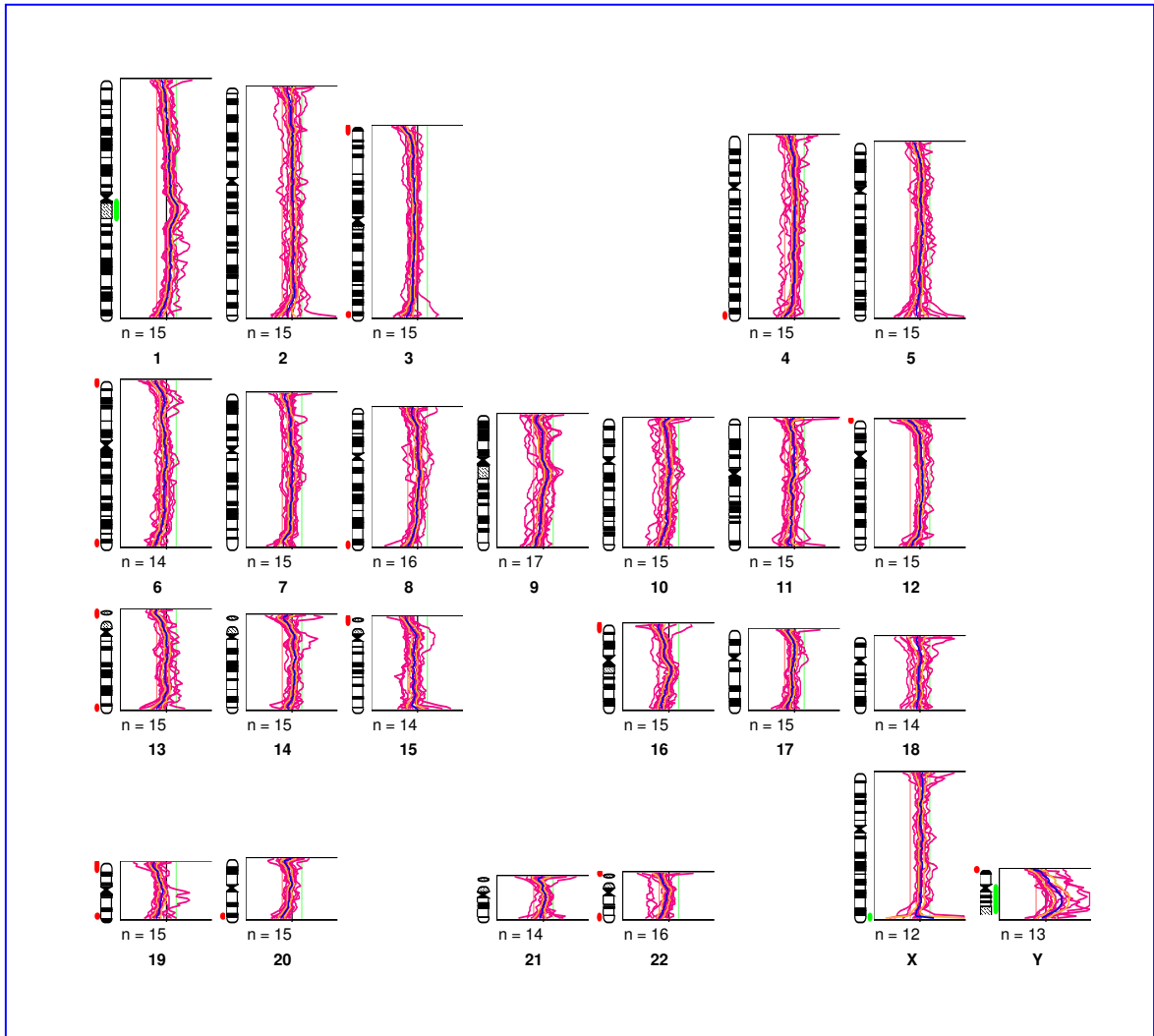
Cariograma del paciente PQ 149. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el “software Quips Genetic Imaging”.



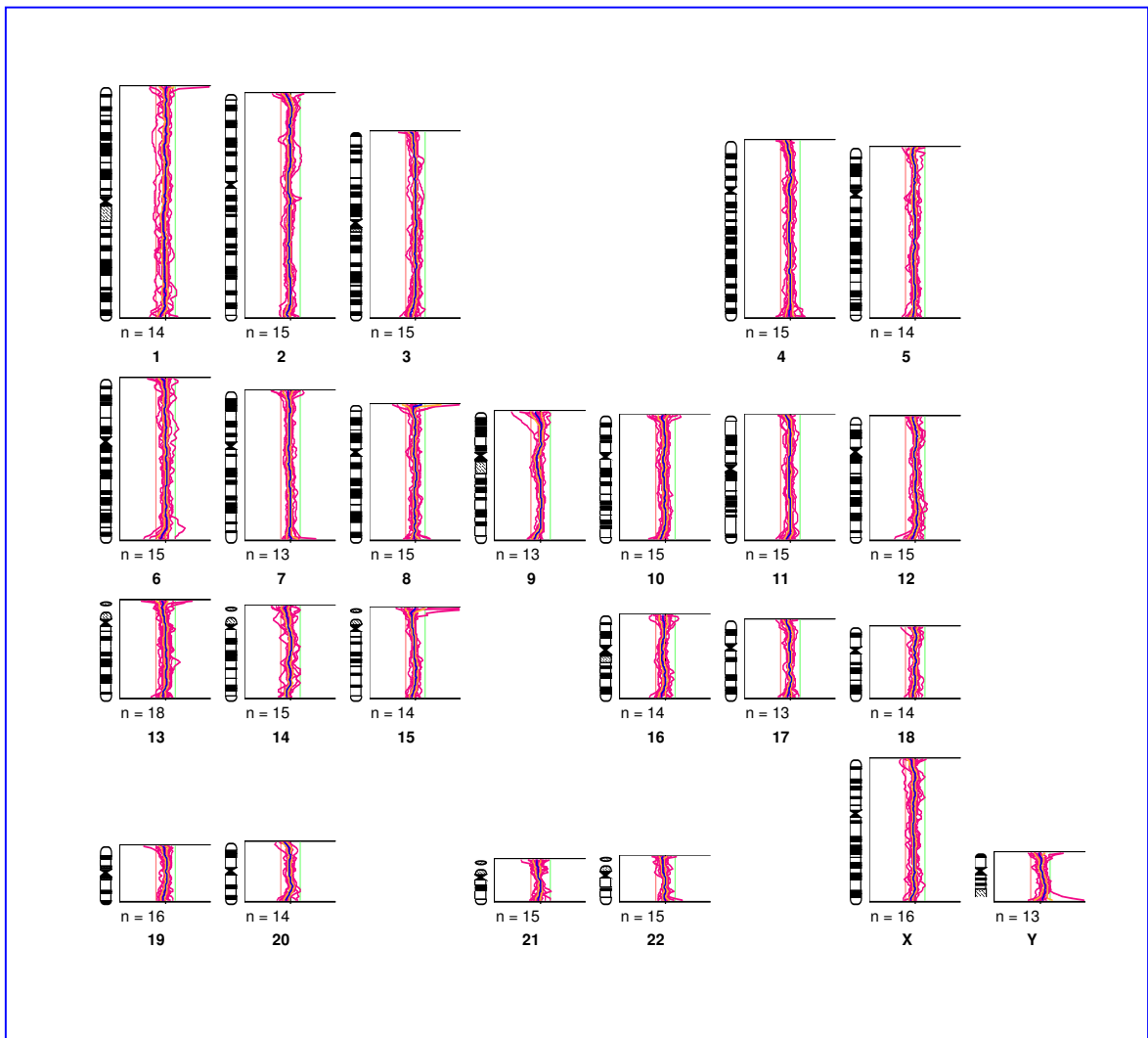
Cariograma del paciente PQ 424. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el "software Quips Genetic Imaging".



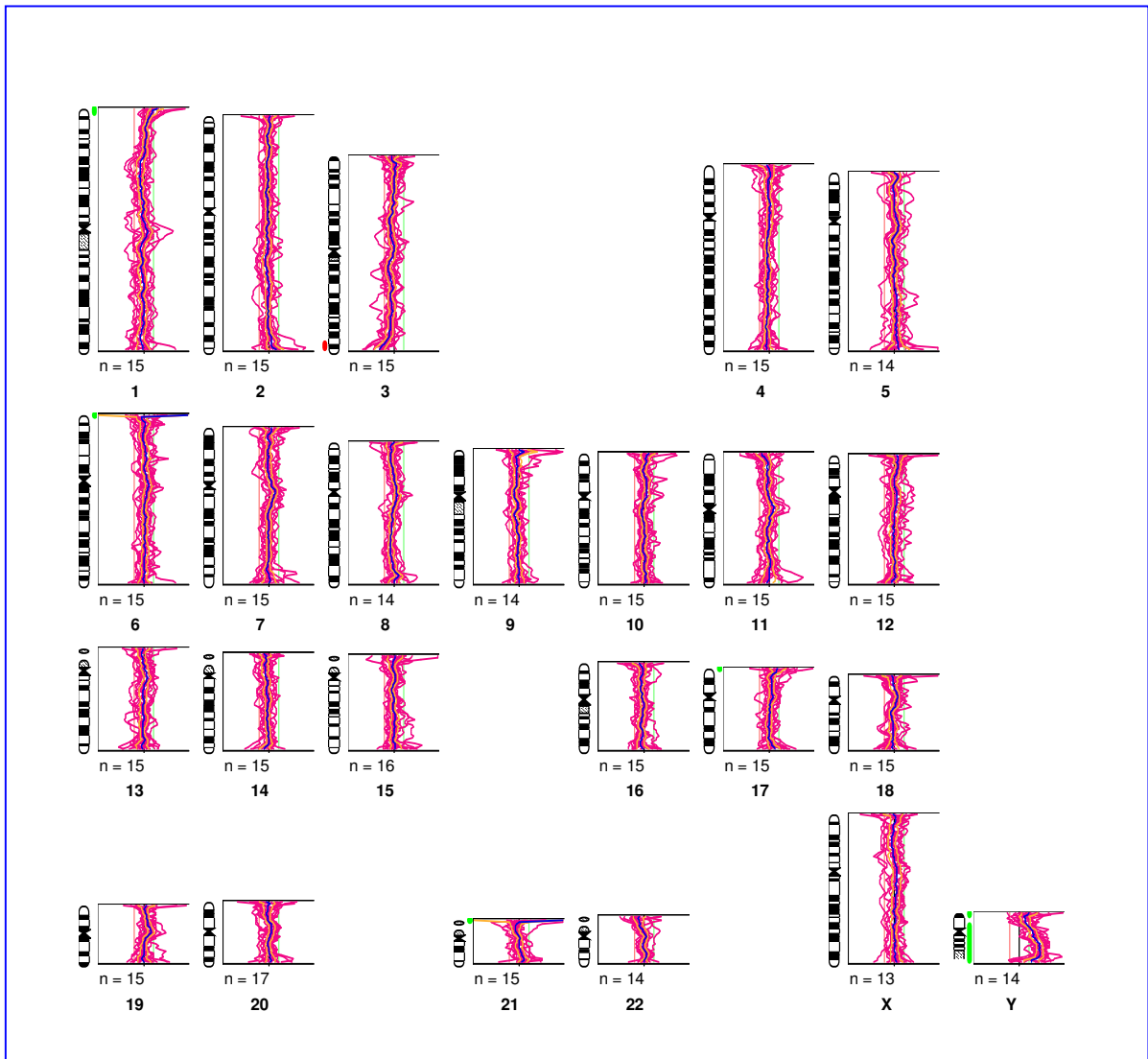
Cariograma del paciente PQ 571. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el “software *Quips Genetic Imaging*”.



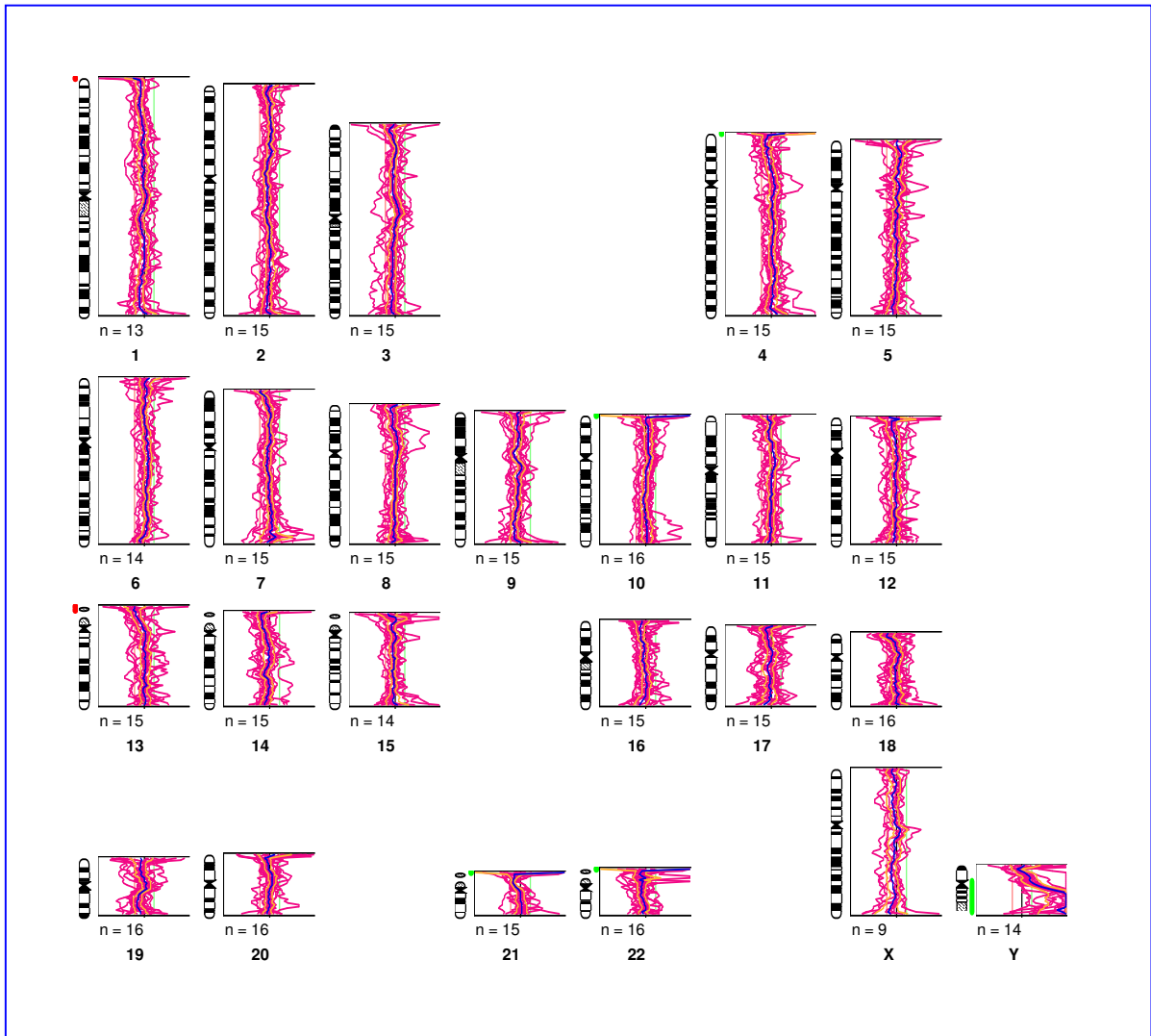
Cariograma del paciente PQ 795. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el "software Quips Genetic Imaging".



Cariograma del paciente PQ 906. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el “software *Quips Genetic Imaging*”.



Cariograma del paciente PQ 1067. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el *“software Quips Genetic Imaging”*.



Cariograma del paciente PQ 1339. Resultados obtenidos al analizar 16 metafases mediante el “software *Quips Genetic Imaging*”.

9. Bibliografía.

Weinberg AR. "Así se produce el cáncer." *Inv. and science* 1996: 9(4) 10-17.

Darnell J, Lodish H, Baltimore D. "Molecular cell Biology." 4ª ed. Ed Oxford Scientific American Books. 2003: USA. 1027-1072.

Rivera LR. "Oncología pediátrica: conceptos básicos y clínicos." Ed. Intersistemas. Mex. 2003: 1-12, 15-32, 103-132.

Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. "Morbilidad, regionalización 1993-1996 y mortalidad tendencias 1985-1998." 2000: México: Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología.

Adullaev FI, Rivera LR, Roitenbeurd BV, Espinosa J. "Mortality pattern in childhood cancer in Mexico." *Arch Med Res* 2001: 31:526.

Dyer S, Prebble E, Davison V. "Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups". *Am J Pathol* 2002: 161(6): 2133-2141.

Korshunov A, Neben K, Wrobel G. "Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age". *Am J Pathol* 2003: 163 (5): 1721-27.

Eiser C. "Children with Cancer: The Quality of life." Ed. LEA. Inglant. Lon. 122-126.

Sierrasesúmaga L, Calvo F, Villa EI, Cañadell J. "Oncología Pediátrica" Ed. Interamericana. Esp. Mad. 406-407.

Yuichi H, Kenneth A, Andrew B. "Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups". Am J Pathol 2001; 158: 1137-1143.

Salas MM. "Las neoplasias en los niños." Ediciones Medicas del Hospital Infantil de México. 1983: 240-251.

Muñoz HA, Del Moral RE, Uberos FJ. "Oncología Infantil". Ed Formación Alcala. Esp. Mad. 2001: 271-290.

Gilbertson RJ, Taylor MD, Poppleton H, Fuller C, Su X et al. "Distinct origins and subtypes of ependymoma revealed by genomic profiling of human and mouse tissues". Twentieth Schweisguth prize, Vancouver 2005: Société

Yuichi H, Kenneth A, Andrew B. "Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups". Am J Pathol 2001; 158: 1137-1143 Internationale D'Oncologie Pédiatrique & International Society of Paediatric Oncology.

Gray J, Collins C "Genome changes and gene expression in human solid tumors." Carcinogenesis 2000; 21(3): 443-452.

Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, Pinkel D. "Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumor." Science 1992; 258: 818-821.

Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch- Tubiana. "Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas." Cancer Genet Cytogenet 2002; 136: 121-125.

Kernohan, J.W., Mabon, R.F., Svien, H.J., Adson, A.W. A simplified classification of the gliomas. Mayo 1949: Clinic Proc. 24,71 -74.

Lamszus K, Lachenmayer L, Heinemann U, Kluwe L. "Molecular genetic alterations on chromosomes 11 and 22 in ependymomas". Int J Cancer 2001: 91 (6): 803-8.

Debiec- Rychter M, Biernat W, Zakrzewski K. "Loss of chromosome 22 and proliferative potential in ependymomas". Folia Neuropathol 2003: 41(4): 191-5.

Kramer DL, Wentz EL, Parmiter AH, Biegel JA. "Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas: #666". J Pediatr Hematol Oncol 1996: 18(4): 460.

Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J. "Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation". British J of Cancer 2002: 86: 929- 939.

Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T. "Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors". Mod Pthol 2003: 16(10): 980-91.

Gilhuis HJ, van der Laak J, Wesseling P. "Inverse correlation between genetic aberrations and malignancy grade in ependymal tumors: a paradox?" J Neurooncol 2004: 66(1-2): 111-6.

Liborio TN, DA Costa NA, Alves MR, Daumas NF. "Evaluation of the genomic DNA extracted from formalin-fixed, paraffin-embedded oral samples archived for the past 40 years". Bras Patol Med Lab 2005: 41: 405-410.

Coulon RA, Hill K. "Intracranial ependimomas in childrens". Childs Brain 1977; 3: 154-68.

Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Citro G. "Identification of gain and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization". Genes Chrom Cancer 1995: 12:213-219.

Kingsbury AE, Foster OJ, Nisbet AP, Cairns N, Bray L, Eve DJ, Lees AJ, Marsden CD. "Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain". Brain Res Mol Brain Res 1995: 28:311-318

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. "TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement". J Histochem Cytochem 1998: 46:327-334.

Weirich G, Hornauer MA, Bruning T, Hofler H and Brauch H. "Fixed archival tissue". Purify DNA and primers for good PCR yield! Mol Biotechnol 1997: 8: 299-301.

Pawlowski R. "Badania identyfikacyjne metoda PCR tkanek swiezych oraz utrwalonych i zatopionych w blokach parafinowych". Pol Tyg Lek 1995: 50: 16-20.

Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J. "Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sce copy number changes in solid tumors". Genes Chrom Cancer 1994: 10: 231-243.

Sharp J. "Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome". Nat genet. 2006: 38(9): 1038-1042.

Inoue K. "Molecular mechanisms for genomic disorders". *Annu Rev Genomic Human Genet.* 2002; 43: 199-242.

Shaw C. "Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorder: the genomic basis of disease". *Hum Mol Genet.* 2004; 13: 57-64.

Shaffer L. "Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in Humans". *Ann Rev.* 2000; 34: 297-329.

Palacios RM, Arenas AD. "Detección de rearrreglos crípticos e pacientes con retraso mental y del desarrollo mediante pruebas de citogenética molecular". Tesis de especialidad de Genética Médica. 2006.

Lamszus K, Lachenmayer L, Heinemann U, Kluwe L. "Molecular genetic alterations on chromosomes 11 and 22 in ependymomas". *Int J Cancer* 2001; 91 (6): 803-8.

Surralles J, Darroudi F, Natarajan AT. "Low level of DNA repair in human Chromosome 1 heterochromatin". *Gene Chromosomes Cancer.* 1997; 20(2): 173-184.

Callen E, Ramírez MJ, Creus A, Marcos R, Frias S, Molina B, Badell I. "The castogenic response of the 1q12 heterochromatic region to DNA cross-linking agents is independent of the Fanconi anaemia pathway". *Carcinogenesis.* 2002; 23(8): 1267-1271.

Cigudosa JC. "The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology". *An. Sist. Sanlt. Navar.* 2004; 27(1): 11-20.