



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

LA EXPRESIÓN DEL RNAm DEL GEN BAX SE CORRELACIONA CON  
RECIDIVA Y MENOR SUPERVIVENCIA EN LOS ASTROCITOMAS  
PEDIÁTRICOS

**TESIS DE POSGRADO  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
PATÓLOGO PEDIATRA**

**PRESENTA  
DR. JAIR ABDIEL TORO GUERRERO**

**DIRECTOR DE TESIS  
DR. JOSÉ MARIO PÉREZPEÑA DÍAZCONTI**

**ASESOR  
DR. FRANCISCO ARENAS HUERTERO**



HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ  
Instituto Nacional de Salud

MÉXICO, D.F.

FEBRERO 2011



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.

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ**

LA EXPRESIÓN DEL RNA DEL GENE BAX SE CORRELACIONA CON  
RECIDIVA Y MENOR SUPERVIVENCIA EN LOS ASTROCITOMAS  
PEDIÁTRICOS

TESIS DE POSGRADO PARA OBTENER EL TITULO DE:  
PATÓLOGO PEDIATRA

**PRESENTA**  
DR. JAIR ABDIEL TORO GUERRERO

\_\_\_\_\_  
DR. JOSÉ MARIO PÉREZPEÑA DÍAZCONTI  
**DIRECTOR DE TESIS**

\_\_\_\_\_  
DR. FRANCISCO ARENAS HUERTERO  
**ASESOR**

## **DEDICATORIAS**

A Dios, porque me ha colmado inmerecidamente de bendiciones.

A mi esposa, quien es parte de mí, por su apoyo incondicional.

A mi hija, el motor de mi vida.

A mis padres, por los valores que me infundieron.

A mis hermanos, por la unión que conservamos.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi Alma Máter, a la cual pertenezco orgullosamente.

A mi director y asesores de tesis, a quienes aprecio y respeto por su amable apoyo.

A mis maestros, por sus enseñanzas durante mi formación profesional.

## ÍNDICE

Página

Resumen	1
1. Antecedentes	3
1.1 Epidemiología	3
1.2 Cuadro clínico	3
1.3 Etiología	4
1.4 Pronóstico	4
2. Marco teórico	7
3. Planteamiento del problema	8
4. Justificación	8
5. Objetivos	9
5.1 Objetivo general	9
5.2 Objetivos específicos	9
6. Hipótesis	10
7. Material y método	11
7.1 Tipo de estudio	11
7.2 Población de estudio	11
7.3 Tamaño de la muestra	11
7.4 Criterios de inclusión	11
7.5 Criterios de exclusión	11
7.6 Criterios de eliminación	11
7.7 Limitaciones del estudio	11
8. Descripción de variables	12
8.1 Variables independientes	12
8.2 Variable dependiente	12
8.3 Definición operacional de variables	12
9. Metodología	13
10. Análisis estadístico	15
11. Resultados	16
11.1 Expresión del gen Bax en astrocitomas pediátricos	16
11.2 Supervivencia de acuerdo a la expresión del gen Bax	19

12. Discusión	26
13. Conclusiones	28
16. Referencias	29

## **RESUMEN:**

LA EXPRESIÓN DEL RNAm DEL GEN BAX SE CORRELACIONA CON RECIDIVA Y MENOR SUPERVIVENCIA EN LOS ASTROCITOMAS PEDIÁTRICOS

**Protocolo** HIM/2007/020.

**Antecedentes:** Los marcadores de expresión génica que categorizan los tumores de los pacientes con astrocitomas, se han centrado al estudio de los tumores de adultos. Actualmente no hay estudios concluyentes de alteraciones moleculares específicas en astrocitomas pediátricos. En el presente trabajo se describió la expresión del RNAm del gen de Bax en grupos de astrocitoma pediátricos de bajo grado (GI) y de alto grado (GIV).

**Marco teórico:** Se dispone de información limitada sobre los trastornos moleculares en los astrocitomas malignos infantiles, la sobre-expresión de p53 se considera un factor de mal pronóstico. Actualmente se reconoce a la apoptosis como un proceso fisiológico de muerte celular, el cual está regulado por diversas proteínas. Bax es una proteína de la familia de bcl-2 que promueve la apoptosis compitiendo contra bcl-2 en el canal mitocondrial apoptótico (MAC). Algunos estudios han descrito la expresión alterada de las proteínas bax y bcl-2 en tumores astrocíticos y otros tumores gliales en adultos.

**Planteamiento del problema:** Existen estudios de tumores astrocíticos de adultos en los que se describen alteraciones en la expresión de genes pro-apoptóticos como el gen Bax; sin embargo, aún cuando el astrocitoma es el tumor glial más frecuente en los niños, no existen estudios que describan este gen en la población pediátrica.

**Objetivos:** Dado que el astrocitoma es el tumor sólido más frecuente en la niñez, y por la falta de información del tema en tumores pediátricos, se planteó el objetivo de evaluar la expresión del RNAm del gen Bax en 54 casos con todos los grados de astrocitomas pediátricos, seleccionados por la cantidad representativa de tumor incluido en parafina (mayor del 70% de la lesión).

**Hipótesis:** Existe relación entre la expresión del RNAm del gen Bax en tumores astrocíticos de alto grado con recidiva tumoral y menor supervivencia para el paciente.

**Materiales y método:** Se extrajo el RNA total de cada tumor, y se amplificó por RT-PCR semi-cuantitativa el gen Bax. Al mismo tiempo se analizó la expresión

del gen en 3 líneas celulares de astrocitoma humano. Se realizaron las correlaciones entre los niveles de expresión del gen con los datos como grupos de edad, sexo, grado histológico, tiempo de supervivencia, y presencia de recidivas. En las líneas celulares se evaluaron los niveles de expresión de Bax con el grado de diferenciación celular.

**Análisis estadístico:** Se evaluaron las diferencias de expresión de los niveles de Bax utilizando la prueba “t” de student; y en los casos de acuerdo al grado, grupos de edad, sexo, tiempo de supervivencia y presencia de recidiva, por la prueba de Fisher. Se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier. Se consideraron significativas las diferencias cuando el valor de p fue menor de 0.05.

**Resultados:** Veinte y seis tumores fueron positivos a Bax (48%); 20 de ellos (77%) fueron recidivantes. Los pacientes con estos tumores vivieron la mitad del tiempo que los negativos a Bax ( $p=0.05$ ). La supervivencia mostró ser significativa en la diferencia entre los pacientes positivos y negativos a Bax ( $p=0.037$ ). Los niños cuyos tumores fueron positivos a Bax vivieron la mitad del tiempo que los niños con tumores negativos, y en el análisis de supervivencia fue significativa ( $p=0.016$ ). Todos los casos con tumores recidivantes G I (4 casos) y G III (6 casos) fueron positivos a la expresión de Bax. Este marcador fue el más asociado ( $p < 0.05$ ), ya que Bak-1, Bcl-2, Casp-3 y Casp-9 no lo mostraron. La línea celular D54-MG no expresa marcadores de diferenciación como la proteína acídica fibrilar-glial (PAFG) y fue la de mayor expresión de Bax, 1.72; mientras que la línea celular U373-MG expresó la PAFG y fue la que menos expresó Bax, 0.58.

**Conclusiones:** La expresión del RNAm de Bax está presente en tumores de pacientes con astrocitomas que tienen menos supervivencia o presentan enfermedad recidivante. Por su clara diferenciación en este tipo de astrocitomas pediátricos, este es un marcador no descrito, para categorizar a niños con astrocitomas. Esto podrá orientar y mejorar el seguimiento y la vigilancia de este tipo de pacientes en nuestro hospital. Otros marcadores pueden inducirse por la aplicación de modificadores de cromatina, para activar vías de muerte celular dependientes de Casp-3, Casp-9 y de Bak, de acuerdo a los resultados obtenidos en líneas celulares.



## **1. ANTECEDENTES:**

### **Tumores de sistema nervioso central.**

#### 1.1 Epidemiología.

Los tumores primarios del sistema nervioso central son un grupo heterogéneo de enfermedades que, en conjunto, constituyen la segunda neoplasia maligna más frecuente en niños y adolescentes. Representan el 20% de todas las neoplasias pediátricas, tienen una incidencia global anual de 28 casos por millón. La incidencia de los tumores del sistema nervioso central es superior en lactantes y niños  $\leq 7$  años ( $\approx 36$  casos / millón de niños) comparado con los niños mayores y adolescentes ( $\approx 21$  casos / millón de niños) (1).

De los más de 100 tipos histológicos de tumores primarios de sistema nervioso central incluidos en la clasificación de la Organización Mundial de la Salud, 5 de ellos representan el 80% en la población pediátrica: 1. astrocitoma pilocítico juvenil; 2. meduloblastoma; 3. astrocitoma difuso; 4. ependimoma; y 5. craneofaringioma (1,2). En nuestro país, los estudios de series grandes reportan que los astrocitomas son los tumores de sistema nervioso central más frecuentes: 32.4% para el Hospital Infantil de México Federico Gómez, 36% para el Instituto Nacional de Pediatría; y se eleva en series de casos del extranjero, como la canadiense que reporta casi el 50% de acuerdo al Hospital for Sick Children de Toronto (3).

#### 1.2 Cuadro clínico.

La presentación clínica de los pacientes con tumores cerebrales depende de la localización, el tipo de tumor y la edad del niño. Los signos y síntomas pueden estar relacionados con la obstrucción del drenaje del líquido cefalorraquídeo ó con disfunción cerebral focal. Cambios sutiles en la

personalidad, la capacidad mental o el lenguaje pueden preceder a los signos y síntomas clásicos de los tumores cerebrales; esto generalmente ocurre en el caso de las lesiones supratentoriales (corticales). Así mismo los tumores supratentoriales suelen causar convulsiones y alteraciones en los reflejos. Los tumores de la región supraselar pueden presentarse con deficiencias neuroendocrinas. En los niños más pequeños, se puede retrasar el diagnóstico del tumor cerebral porque sus síntomas se parecen a los de otras enfermedades, como las digestivas. Los lactantes que todavía tienen abiertas las fontanelas pueden presentar signos de hipertensión intracraneana, como los vómitos, la obnubilación y la irritabilidad, así como hallazgo tardío la macrocefalia. Los tumores del tronco del encéfalo pueden causar parálisis de la mirada, de los pares craneales y deficiencias de motoneurona superior (1, 4).

### 1.3 Etiología.

Se desconoce la biología molecular específica asociada a la génesis de la mayoría de los tumores cerebrales infantiles, en general la exposición craneal a la radiación ionizante se asocia a un aumento de la incidencia. Los síndromes familiares y hereditarios asociados a un aumento de la incidencia de tumores cerebrales son responsables de aproximadamente el 5% de los casos. Los principales síndromes asociados a astrocitomas son: neurofibromatosis 1 y 2, Li-Fraumeni, Turcot y esclerosis tuberosa (5, 6).

### 1.4 Pronóstico.

La mortalidad global de los pacientes con tumores de sistema nervioso central se aproxima al 45%. En los astrocitomas de bajo grado (grado I de la OMS) cuando la resección quirúrgica es completa la supervivencia es de 80-100%, y en los astrocitomas de alto grado (grado IV de la OMS), aún con el tratamiento quirúrgico, la radioterapia y quimioterapia, la supervivencia es del 20% a 1 año de vida (1,7).

Los astrocitomas de bajo grado se caracterizan por tener un curso clínico indolente, el astrocitoma pilocítico juvenil (grado I de la OMS) es el más frecuente en niños, su localización más clásica es el cerebelo, el hallazgo neuroradiológico clásico, aunque no exclusivo, es un nódulo que capta contraste dentro de la pared de un tumor quístico, el estudio microscópico de este tumor muestra un aspecto bifásico con haces de un tejido fibrilar compacto entremezclados con áreas esponjosas microquísticas, la presencia de fibras de Rosenthal, que son masas condensadas de filamentos gliales, localizadas en las áreas compactas, sugieren el diagnóstico. El astrocitoma pilocítico juvenil no muestra ninguna alteración citogenética específica (1,5,6,8).

El segundo astrocitoma más frecuente en niños es el astrocitoma difuso (fibrilar), que es grado II de la OMS, y que característicamente tiene un patrón de infiltración difusa de las células tumorales entre el tejido neural normal, además tiene capacidad de progresión anaplasica. Entre las alteraciones genéticas y moleculares descritas en los astrocitomas difusos destacan las mutaciones de p53 y la sobre-expresión de la cadena  $\alpha$  del factor de crecimiento derivado de las plaquetas y del receptor  $\alpha$  para este factor. Los astrocitomas difusos pueden evolucionar hacia astrocitomas malignos, cuando esto sucede se observa acumulación progresiva de anomalías moleculares múltiples (1,5,6,8).

Los astrocitomas malignos son mucho menos habituales en niños y adolescentes que en adultos, dentro de este grupo el más frecuente es el astrocitoma anaplasico (grado III de la OMS), y es menos frecuente el glioblastoma multiforme (grado IV de la OMS). El estudio histológico de los astrocitomas anaplasicos muestra una mayor celularidad que en los astrocitomas difusos, además de atipia celular y nuclear, y un grado variable de proliferación microvascular con necrosis. La histología típica del glioblastoma multiforme incluye celularidad densa, índice mitótico elevado, atipia celular y nuclear, proliferación microvascular y necrosis geográfica. Se dispone de información limitada sobre los trastornos moleculares en los astrocitomas malignos infantiles, la sobre-expresión de p53 se considera un factor de mal pronóstico, así mismo se ha considerado que el mecanismo de la oncogénesis

de estos tumores puede ser distinto para niños pequeños que para jóvenes y adultos. El tratamiento para estos tumores sigue siendo la resección quirúrgica seguida de radioterapia del campo afectado y eventualmente se añade quimioterapia (1,5,6,8).

Los tumores del tronco encefálico son un grupo heterogéneo de tumores, que a nivel histológico suelen ser gliomas de bajo grado, sin embargo su pronóstico es sombrío debido a su localización, la supervivencia tras el tratamiento no es mayor de 12 meses. La resección quirúrgica de estos tumores esta limitada a algunos de tipo exofítico, pero la mayoría solo se tratan con radioterapia (1,4).

## **2. MARCO TEÓRICO:**

Los mecanismos moleculares que permiten describir la patogénesis de los astrocitomas se ha estudiado de manera consistente en adultos, describiendo algunas rutas y vías de transducción de señales, en las que participan una serie de genes (9). Desde el grado I (GI) hasta el GIV, se sabe cuáles genes pueden ir teniendo ganancia de función o pérdida de la misma, abriendo las opciones del descontrol y desregulación celular (10). En astrocitomas pediátricos se sabe que la vía de vigilancia del control del ciclo celular, es principalmente debida a p53 (11).

Como parte del control celular, los mecanismos de muerte participan de manera activa en el sistema nervioso central, a lo largo del desarrollo desde la etapa embrionaria hasta la etapa adulta del humano. Un grupo importante son los miembros de la familia de Bcl-2 (12). El cerebro normal tiene activos estos mecanismos, y cada una de las células del sistema nervioso central debe tener regulado este proceso para evitar la muerte innecesaria tanto de la glía como de las neuronas (13). Sin embargo, existen pocos trabajos que estudien y describan los eventos moleculares que participan en diferentes tumores del SNC en niños, quizá por razones restrictivas en la cantidad y uso de tumores en niños. Este es un hecho que no representa un problema en nuestro país, ya que existe la libertad del estudio de muestras biológicas tumorales pediátricas, regidas por supuesto por los Comités de Ética de las instituciones de investigación.

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

Existen estudios de tumores astrocíticos de adultos en los que se describen alteraciones en la expresión de genes pro-apoptósicos como el gen Bax; sin embargo, aún cuando el astrocitoma es el tumor glial más frecuente en los niños, no existen estudios en la población pediátrica de la expresión de este gen en los tumores astrocíticos.

#### **4. JUSTIFICACIÓN:**

El estudiar el perfil de expresión del gen Bax en tumores astrocíticos pediátricos nos permite analizar su importancia como un marcador molecular con utilidad pronóstica en la progresión o recidiva del tumor, así como el tiempo de supervivencia de los pacientes.

## **5. OBJETIVOS:**

### **5.1 OBJETIVO GENERAL:**

- Analizar la expresión del gen Bax en células de astrocitomas pediátricos.

### **5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Evaluar las diferencias de la expresión del gen Bax en tumores astrocíticos de grados histológicos distintos.
- Analizar la relación entre la expresión del gen Bax con la supervivencia de pacientes con tumores astrocíticos.



## **6. HIPÓTESIS:**

“Existe relación entre la expresión del RNAm del gen Bax en tumores astrocíticos de alto grado con recidiva tumoral y menor supervivencia para el paciente”.

## **7. MATERIAL Y MÉTODO:**

### **7.1 Tipo de estudio:**

Estudio retrospectivo, longitudinal, descriptivo.

### **7.2 Población de estudio:**

Las muestras de tejido de tumores astrocíticos recibidas en el servicio de Patología del Hospital Infantil de México, en un periodo de 10 años que cumplan con los criterios de inclusión.

### **7.3 Tamaño de la muestra:**

54 tumores astrocíticos incluidos en parafina.

### **7.4 Criterios de inclusión:**

- Tejido incluido en parafina de tumores astrocíticos grados I,II,III y IV de la OMS.
- Muestra de tejido que contenga el 70% de lesión tumoral.

### **7.5 Criterios de exclusión:**

- Tejido con material genético degradado.

### **7.6 Criterios de eliminación:**

- Que no exista tejido suficiente.

### **7.7 Limitaciones del estudio:**

- De todos los tumores de SNC solo se estudiaron los astrocitomas.

## **8. DESCRIPCIÓN DE LAS VARIABLES:**

### **8.1 Variables independientes:**

Edad.

Sexo.

Grado histológico del tumor.

Tipo de tratamiento.

### **8.2 Variable dependiente:**

Supervivencia.

### **8.3 Definición operacional de variables:**

*Edad:* Manifestada en años. Cuantitativa continua.

*Sexo:* Masculino o femenino. Determinado según fenotipo.

*Grado histológico del tumor:* Grados I,II,III o IV de la actual clasificación internacional de tumores de sistema nervioso central de la Organización Mundial de la Salud, determinado por la conducta biológica del tumor y sus características morfológicas celulares.

*Tipo de tratamiento:* La cirugía corresponde al tratamiento base en los tumores astrocíticos, la cual se prefiere sea de tipo excisional. El tratamiento adyuvante como la quimioterapia y la radioterapia se aplica a ciertos tumores poco resecables debido a su localización anatómica.

*Supervivencia:* Determinada por la biología individual del paciente, del grado y extensión de tumor, así como el tipo de tratamiento.

## **9. METODOLOGÍA:**

### **Líneas celulares y muestras tumorales de astrocitomas pediátricos.**

Se utilizaron las líneas celulares de astrocitoma U373-MG, D54-MG y T98G aisladas de astrocitomas de adultos. Las células crecieron en medio de cultivo DMEM-F12 con 10% de suero fetal bovino y suplementado con penicilina-G, estreptomycinina, aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio (todos a 1X); a 37° C hasta llegar a 90% de confluencia.

Las muestras tumorales se obtuvieron de resecciones quirúrgicas de pacientes con diagnóstico histo-patológico de glioma en el Departamento de Patología del Hospital Infantil de México Federico Gómez. De las muestras incluidas en parafina, se realizaron cortes histológicos y se verificaron los casos para clasificarlos en los diferentes astrocitomas de acuerdo a los criterios de la Organización Mundial de la Salud en: Grado I (GI), astrocitomas pilocíticos; Grado II (GII), astrocitomas fibrosos; Grado III (GIII), astrocitomas anaplasicos; y Grado IV (IV), glioblastomas multiformes. Sólo se seleccionaron los casos que tuvieron el 70% de lesión tumoral. Así quedaron conformados 15 casos de GI, 12 casos de GII, 12 casos de GIII y 15 casos de GIV. Todos los datos clínicos se obtuvieron de los expedientes clínicos.

### **Aislamiento y purificación de RNAm de cortes incluidos en parafina y en líneas celulares, y síntesis de cDNA.**

El RNA total se extrajo de las líneas celulares utilizando el reactivo de Trizol y se siguieron los pasos contenidos en el instructivo. Los RNAs se resuspendieron en agua libre de RNasas y se congelaron hasta su uso. Se realizó la síntesis del cDNA utilizando 1 µg del RNA total, y el oligo-dT como iniciador, con el "kit de "Reverse Transcription System" de PROMEGA bajo las condiciones del fabricante.

En las muestras tumorales se extrajo el RNA total usando el "kit" de "Recoverall total Nucleic Acid Isolation" para cortes incluidos en parafina, de AMBION y siguiendo los pasos del fabricante. Los RNAs se resuspendieron en agua libre de RNasas y se congelaron.

## **RT-PCR de astrocitomas pediátricos y líneas celulares.**

En las líneas celulares se realizó la PCR del gen de Bax utilizando los siguientes iniciadores: Bax-F: 5'-AAGCTGAGCGAGTGTCTC A-3'; Bax-R: 5'-TCATCTGGT AAGTCGTGCT-3'. Se normalizaron las concentraciones del fragmento amplificado utilizando la expresión del gen de la gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GAPDH). Las secuencias de los iniciadores fueron las siguientes: GAPDH-F: 5'-TCCCATCACCATCTTCCAG-3' y GAPDH-R: 5'-ATGAGTCCTTCCACGATACC-3'. Esto se realizó utilizando el sistema de FERMENTAS de *Taq* polimerasa.

En el caso de los tumores, tanto el cDNA como la PCR se realizó utilizando el "kit" de "TITAN" de ROCHE. Se emplearon los mismos iniciadores para verificar la expresión del gen de Bax. Se utilizó como gen constitutivo el de  $\beta$ -actina y los oligonucleótidos fueron:  $\beta$ -act-F: 5'-ATC GCC GCG CTC GTC GT-3'; y  $\beta$ -act-R: 5'-GGC ATC GTC GCC CGC G-3'.

Previamente se realizaron análisis de productos finales a 20, 25, 30, 35 y 40 ciclos de amplificación y se decidió realizar el análisis final a 30 ciclos (condición no saturable).

## **Tinción citoquímica de la proteínas acídica fibrilar glial en líneas celulares.**

Se siguió la técnica del Río-Hortega. Las células crecidas a un 80% se fijaron en formaldehído al 10% en PBS neutro, durante toda la noche a 4° C. Posteriormente se impregnaron con plata amoniacal 5 min, y se contrastaron con una solución de formalina al 1%.

## **Análisis densitométrico.**

La intensidad de cada banda amplificada tanto en las líneas celulares como en los tumores se midió utilizando el software ImageJ. La cantidad de expresión de Bax, medida en unidades densitométricas de cada caso, se utilizó para sacar la relación de expresión entre la obtenida del gen constitutivo: GAPDH para las líneas celulares y  $\beta$ -actina para las muestras tumorales.

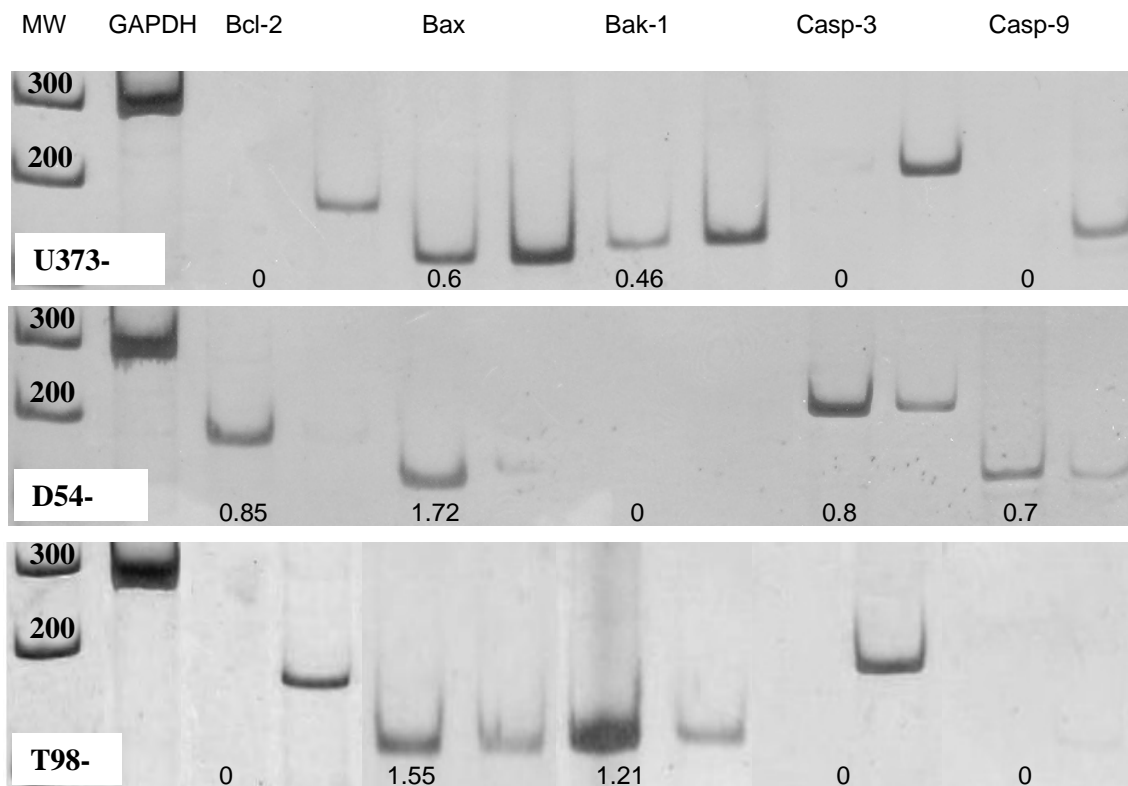
## **10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se realizó la prueba de Fisher para evaluar la diferencia en el número de casos positivos/negativos a Bax, en los casos globales, y en los grupos de sexo, edad, grado tumoral; y en presencia de recidiva. Las diferencias entre los grupos de casos que expresaron Bax y el tiempo de supervivencia se evaluaron empleando la prueba de "U" y se trabajó sólo en los casos en los que se conoció el tiempo. Finalmente se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y análisis logístico. Se consideraron significativas las diferencias cuando el valor de p fue menor de 0.05. Se utilizó el programa Sigma Plot (Jandel Scientific) para realizar el análisis logístico.

## 11. RESULTADOS:

### 11.1 Expresión del gen Bax en astrocitomas pediátricos.

Después de evaluar la expresión de los genes relacionados a apoptosis en las líneas celulares de astrocitomas pediátricos, los resultados mostraron que el gen Bax fue el único que se expresó (Figura 1).



**Figura 1.** RT-PCR de los genes Bcl-2, Bax, Bak-1, Casp-3 y Casp-9 en líneas celulares de astrocitoma humano. Los números indican los niveles de expresión. PM indica las bandas de peso molecular de 200 y 300 nucleótidos.

En base a los resultados anteriores, se decidió evaluar la expresión de los genes de Bcl-2, Bax, Bak-1, Casp-3 y Casp-9 en astrocitomas de GI y GIV por ser grupos contrastantes. Poniendo especial atención al gen Bax. Los resultados revelaron que la expresión de Bax guardó una relación estrecha a los casos con recidivas principalmente en los astrocitomas GI como se muestra en el tabla 1. Incluso fue más selectivo en su expresión que el resto de los genes. Por esta razón se decidió ampliar el análisis de su expresión en todos los grupos de astrocitomas pediátricos: GI, GII, GIII y GIV.

**Tabla 1.** Expresión de RNAm de genes relacionados a apoptosis en casos con grado I y grado IV de astrocitomas pediátricos. Se indica número de casos/del total.

MARCADOR MOLECULAR	GRADO I		GRADO IV	
	# CASOS	RECIDIVAS	# CASOS	RECIDIVAS
Bcl2	15/15	4/15	11/15	12/12
<b>Bax</b>	<b>4/15</b>	<b>4/15</b>	<b>5/15</b>	<b>5/12</b>
Bak-1	15/15	4/15	15/15	12/12
Casp-3	15/15	4/15	15/15	12/12
Casp-9	15/15	4/15	10/15	11/12



Se procedió a cuantificar los niveles de expresión del gen Bax en los cuatro grupos de astrocitomas pediátricos. Se realizaron correlaciones entre sus niveles de expresión, con los datos como sexo, la edad de los pacientes que fueron  $\leq$  a 5 años y  $>$  de 5 años, el grado tumoral y tiempo de supervivencia (tabla 2). Se realizaron las pruebas estadísticas entre cada uno de los grupos y ninguna fue significativa.

**Tabla 2.** Niveles de expresión del gen Bax, número de casos y porcentaje que lo expresan, de acuerdo al sexo, grupos de edad, grado del astrocitoma y supervivencia de los pacientes.

<b>VARIABLE</b>	<b>Niveles de Bax</b>	<b>n</b>	<b>PORCENTAJE</b>
<b>SEXO</b>	(densitometría)		%
Masculino	0.226	21	39
Femenino	0.160	33	61
<b>GRUPOS DE EDAD</b>			
$\leq$ 5	0.254	17	31.4
$>$ 5	0.166	37	68.6
<b>GRADO DE ASTROCITOMA</b>			
GI	0.170	15	27.8
GII	0.220	12	22.2
GIII	0.300	12	22.2
GIV	0.100	15	27.8
<b>SUPERVIVENCIA PACIENTES</b>			
Vivos	0.148	14	26
Decesos	0.241	20	37
Desconocido		20	37

Sin embargo es importante destacar que los niños, y aquellos menores de 5 años tienen mayores niveles de Bax; y la tendencia es a incrementarse conforme aumenta el grado tumoral de GI a GIII. De la misma manera los pacientes que ya fallecieron presentaron mayores niveles de Bax.

## 11.2 Supervivencia de acuerdo a la expresión del gen Bax.

En seguida, se procedió a realizar y analizar las correlaciones entre los casos positivos o negativos al gen Bax en los 44 casos en los que se conoció el tiempo de supervivencia, así como en los grupos de sexo, edad y grado de astrocitoma.

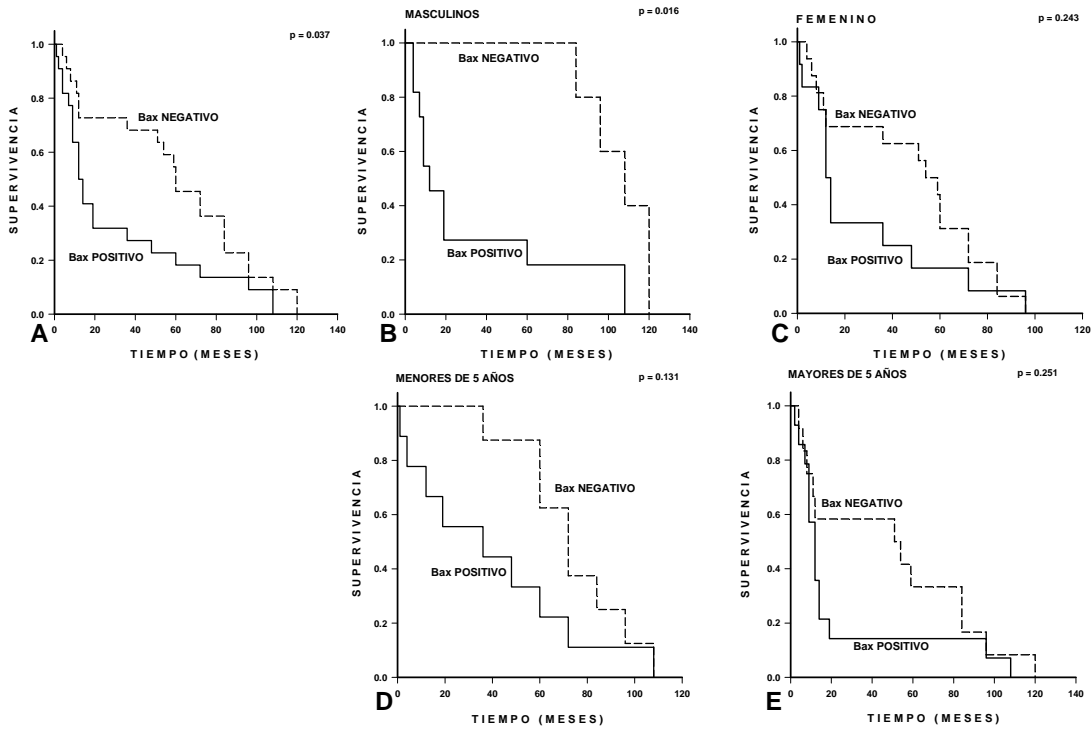
**Tabla 3.** Tiempo de supervivencia de acuerdo al estado de expresión del gen Bax, en los casos de acuerdo al sexo, grupos de edad y grado del astrocitoma.

\* Conocido en 44 casos. \*\* significativas,  $p < 0.05$  por prueba de "U".

	n	TIEMPO	
*EXPRESIÓN GLOBAL		(meses)	
Positivo	22	31.0	
Negativo	22	59.5	**p = 0.05
<b>MASCULINO</b>			
Positivo	10	32.6	
Negativo	6	105.6	**p = 0.025
<b>FEMENINO</b>			
Positivo	12	27.3	
Negativo	16	48.0	**p = 0.001
<b>GRUPOS DE EDAD</b>			
<b>≤ 5</b>			
Positivo	9	40	
Negativo	9	78	p = 0.10
<b>&gt; 5</b>			
Positivo	13	23.3	
Negativo	13	54.5	p = 0.15
<b>GRADO DE ASTROCITOMA</b>			
<b>GI</b>			
Positivo	6	72	
Negativo	9	89	p > 0.10
<b>GII</b>			
Positivo	7	10	
Negativo	4	39.5	**p = 0.01
<b>GIII</b>			
Positivo	4	10.5	
Negativo	2	24	**p = 0.05
<b>GIV</b>			
Positivo	5	26.4	
Negativo	7	43	p > 0.10

La tabla 3 muestra que los niños con tumores negativos a Bax vivieron 1.9 veces más que los pacientes con tumores positivos. Estas diferencias fueron significativas ( $p < 0.05$ ). Una tendencia similar fue encontrada en relación a los niños y niñas que vivieron 3.28 y 1.7 más, respectivamente, cuando sus tumores fueron negativos a Bax. Los niños con tumores GII Y GIII negativos a Bax también vivieron más tiempo: 3.9 y 2.2 veces que los pacientes con tumores positivos. Todas estas diferencias fueron significativas ( $p > 0.05$ ). Estos resultados ratifican los primeros hallazgos realizados al analizar la expresión de todos los marcadores seleccionados (Tabla 1), que destacó de manera importante la preferencia de revelar la expresión de Bax, en los tumores con recidivas. Este hecho es realmente categórico ya que Bax no es un marcador por los niveles de expresión como sucede con otros marcadores descritos en tumores de adultos, sino su presencia o ausencia se relaciona directamente con los tumores que presentan recidivas o con los pacientes con menor supervivencia.

Con base a los hallazgos anteriores, se analizaron los resultados por regresión logística y se elaboraron las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (Tabla 3). Los resultados de la figura 2 corroboraron sólo que las diferencias en el tiempo de supervivencia de los pacientes que tienen tumores positivos a Bax (Figura 2A), así como en el grupo de los niños (Figura 2B) fueron significativas: viven menos tiempo los pacientes con tumores positivos a Bax (Figura 2A). Sin embargo son claras las tendencias a menor sobrevivencia en los casos con presencia de Bax.



**Figura 2.** Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de acuerdo al estado de Bax (A) en el tumor de los pacientes con astrocitomas y su separación por grupos de sexo (B y C) y de edad (D y E). Se indican los valores de la p obtenidos en cada análisis.

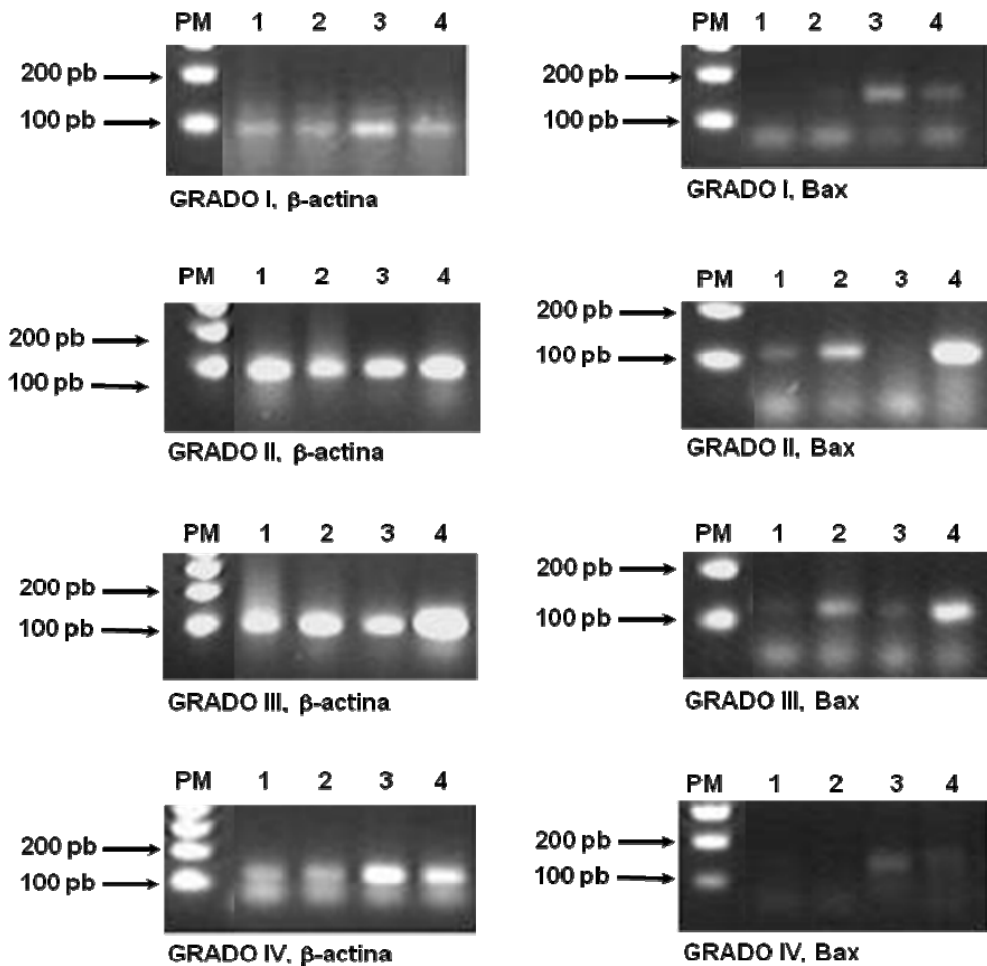
Se evaluaron los casos que presentaron recidivas en base al estado de expresión del gen Bax. La tabla 4 muestra claramente que todos los casos que presentaron recidivas tanto en GI como en GIII fueron positivos a Bax. Estas diferencias fueron significativas, por lo que la expresión de Bax puede identificar a los tumores que regresan y generan enfermedad astrocítica, posterior al tratamiento.

GRADO	Bax		
	POSITIVO/RECIDIVA	NEGATIVO/RECIDIVA	
I	4	0	*p = 0.029
II	6	4	p = 0.227
III	5	0	*p = 0.0158
IV	5	7	p = 0.265

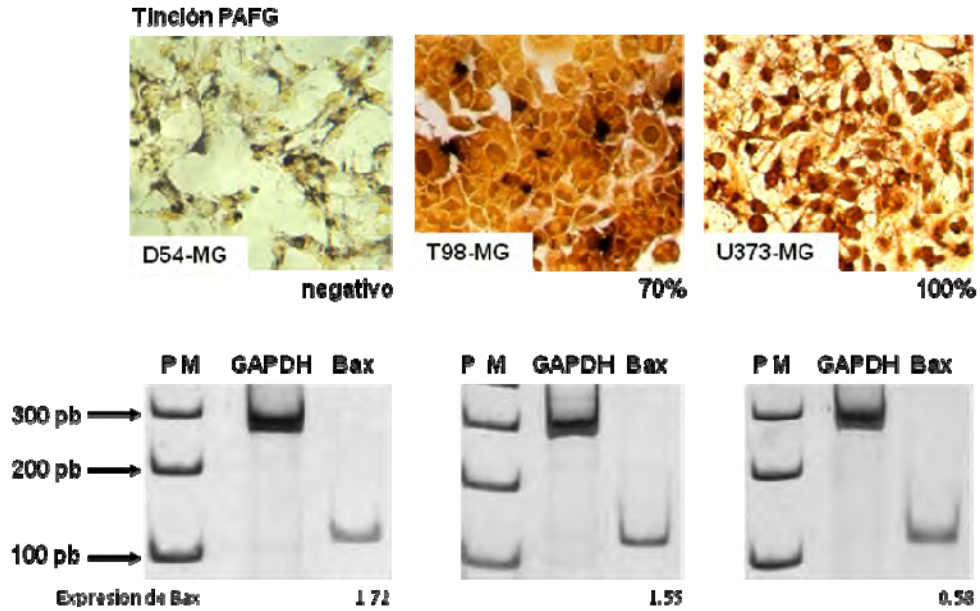
**Tabla 4.** Número de casos positivos a Bax y presencia de recidiva tumoral. \* significativas,  $p < 0.05$  por prueba de Fisher.

Todos los casos analizados se seleccionaron con base a la integridad del RNAm extraído de los bloques de parafina. El indicador principal fue la expresión del gen de  $\beta$ -actina. Como se puede apreciar en la figura 3 el RT-PCR de las muestras, confirman que los 4 grupos de astrocitomas tuvieron una calidad de RNAm capaz de revelar de manera selectiva y específica la expresión del gen Bax.

Finalmente, se evaluó si los niveles de expresión de Bax previamente encontrado en las líneas celulares, correspondía con alguna característica de las líneas celulares, entre ellas el grado de diferenciación que se sabe, este tiende a perderse en aquellos tumores de mayor grado de malignidad. Los resultados ilustrados en la Figura 4 corroboraron que la línea celular D54-MG que fue aislada de un astrocitoma GIV no expresa un marcador característico de astrocitos: la proteína acídica fibrilar glial (PAFG). Esta línea celular expresó los niveles más elevados del gen de Bax. En contraste, la línea celular U373-MG expresa la PAFG y tiene niveles bajos de Bax. A pesar de que esta línea y la T98G fueron aisladas de astrocitomas GIII, mantienen parte de la identidad original al expresar la PAFG y presentar niveles menores de Bax en comparación con la línea D54-MG.



**Figura 3.** RT-PCR de los genes de  $\beta$ -actina (izquierda) y Bax (derecha) en astrocitomas pediátricos, y su distribución de acuerdo al grado histológico. **Grado I.** Los carriles 3 y 4 pertenecen a pacientes con enfermedad recidivante que fallecieron. **Grado II,** Los carriles 1, 2 y 4 pertenecen a pacientes con recidivas tumorales; los pacientes de los carriles 2 y 4 fallecieron. **Grado III.** Los carriles 1 y 3 representan a pacientes que tuvieron tumor recidivante; no se conoce el estado actual. El paciente del carril 2 falleció; y el del carril 4 está en seguimiento a pesar de la recidiva tumoral. **Grade IV.** Cada carril representa un paciente; solo el del carril 3 fue positivo a Bax y falleció. Productos de PCR teñidos con bromuro de etidio en geles de agarosa al 2%.



**Figura 4.** Tinción citoquímica de la proteína ácida fibrilar glial (PAFG) y expresión del RNAm de Bax en líneas celulares de astrocitoma. La línea celular D54-MG es negativa a la tinción de PAFG; la tinción se incrementa de 70% a 100% en las líneas celulares T98G y U373-MG, respectivamente. Los niveles de expresión de Bax se indican abajo. El marcador de peso molecular se indica a la izquierda. Productos de PCR teñidos con plata en geles de poliacrilamida. Fotos tomadas en campo claro. 20X.



## 12. DISCUSIÓN:

El análisis inicial mostró que las 3 líneas celulares estudiadas expresaron el gen Bax. El análisis preliminar en los tumores GI y GIV además revelaron la casi selectividad sólo en los tumores recidivantes de los casos con GI, que son los pacientes con mejor pronóstico. Si bien es cierto que la expresión de Bax en estos tumores estudiados tuvo la sensibilidad del 77%; realmente es un porcentaje alto y comparable al de otros marcadores como la expresión del RNAm de survivina en astrocitomas de adultos (15), con el 79% de expresión; y como es de esperar puede variar a valores tan bajos como la expresión de CDC25B con un 49% (16). Esta es la contribución de este trabajo, ya que describe la expresión de un marcador genético que tiene un valor en la predicción de la respuesta biológica en astrocitomas pediátricos. La progresión de los tumores, de bajo (GII) a alto grado (GIII y GIV), está acoplado a una serie de alteraciones moleculares (11). Los tumores recidivantes también se explican como entidades tumorales con alteraciones moleculares (12). Por eso, es importante identificar marcadores tempranos de este evento biológico, para establecer lineamientos y protocolos de seguimiento más estrechos o dirigir blancos moleculares en astrocitomas. En relación a tiempo de supervivencia, la diversidad y variedad de marcadores biológicos analizados en astrocitomas de adultos, es tan amplia que no existe una clase de ellos por función biológica en la célula. Así hay marcadores como la expresión de EGFR, p53, MDM2, CDK6, p21, PTEN y CDK4 que define a los pacientes con menor supervivencia (18). No importa la magnitud en la expresión de estos marcadores, todos ellos siempre separan a los pacientes en los 2 grupos y aquellos que los expresan, viven la mitad del tiempo de los que no lo expresan. Este es un resultado importante que se observó en el presente estudio y que confirma que los astrocitomas, sean de adultos o de niños, siempre es importante buscar y determinar marcadores que estén relacionados con menor supervivencia.

La pregunta importante es: ¿Cuál es el significado biológico de la expresión elevada del RNAm de Bax en los tumores recidivantes de los astrocitomas pediátricos? No tiene una respuesta sencilla y directa. Bax es uno de los miembros que tiene funciones pro-apoptóticas de la familia de Bcl-2 (12). En oligodendrogliomas, la baja expresión de Bax se asoció a un periodo corto de

tiempo para la aparición de recidivas en pacientes adultos (19). Se sabe que la regulación apoptótica como en cualquier otro tumor, es crítica y determinante en la tumorigénesis, progresión tumoral y respuesta a tratamiento en tumores intracraneanos de adultos (13). Este es el primer estudio que reporta la utilidad de un marcador pro-apoptotico en astrocitomas pediátricos. Sin embargo, la mayoría de ellos revelan la tendencia a un pronóstico desfavorable cuando la expresión de bax disminuye en tumores intracraneanos (13). ¿Porqué la expresión elevada de Bax se asocia a mal pronóstico? Es difícil explicarlo. Mazurek y *colaboradores* (20) describen la importancia de medir la relación de expresión de los RNAm de Bcl-2/Bax. Cuando ésta es baja, bax (proteína) forma heterodímeros con bcl-2 en menor proporción, y más homodímeros con bax. Esto se relaciona con la inducción de muerte celular y prevención de crecimiento tumoral. De hecho, una relación baja Bcl-2/Bax se define como un factor pronóstico favorable de respuesta a quimio- o radio-terapia en astrocitoma fibrilar de adultos (21). En este sentido, el significado de la relación Bcl-2/Bax alta, es decir, mayor de 1, está relacionada con mal pronóstico en nuestros casos. Sucedió en 2 de los 4 pacientes de GI de nuestro estudio que fallecieron: tuvieron una relación del RNAm de Bcl-2/Bax de 4.15 y 1.9, respectivamente. En los 4 únicos pacientes de GIV que fueron positivos a Bax, las relaciones de Bcl-2/Bax fueron 2.37, 6.18, 3.35 and 7.68 y estos pacientes ya fallecieron (resultados no publicados). Con base a estos hallazgos, es posible que las moléculas de bax estén en una dinámica de “titulación” frente a las moléculas de bcl-2, de tal suerte que cuando ésta relación es elevada, se incrementa la formación de heterodímeros bcl-2/bax e inicia la resistencia a la muerte de las células tumorales y se presenta la recidiva tumoral.

Actualmente, se está evaluando la expresión de bax (proteína) en cortes histológicos con el objeto de confirmar lo encontrado en la expresión del RNAm. También, se están determinando los niveles de expresión de Bcl-2 para calcular la relación Bcl-2/Bax en una serie más grande de casos de astrocitomas pediátricos.

### **13. CONCLUSIONES:**

Se puede concluir que la expresión del RNAm del gene Bax es un marcador de mal pronóstico en pacientes con astrocitoma, pues los pacientes que lo expresan viven menos tiempo; además que se encuentra asociado a casos con tumores recidivantes.

## 16. REFERENCIAS:

1. Kliegman, R., *Nelson Tratado de Pediatría*, 18<sup>a</sup> ed. Elsevier. 2009: 2128-2137 p.
2. David, N., *WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System*, 4<sup>th</sup> ed. IARC. 2007: 13-52 p.
3. Chico-Ponce de León F, Castro-Sierra E, Perezpeña-Díazconti M, et al., Tumores intracraneanos del niño. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2006; 63: 367-381. Armstrong, D., *Pediatric Neuropathology*, Springer. 2007: 291-295 p.
4. Armstrong, D., *Pediatric Neuropathology*, Springer. 2007: 291-295 p.
5. Enid Gilbert- Barnes, *Potters Pathology of the Fetus, Infant and Child*, 2<sup>nd</sup> ed. Mosby- Elsevier, 2007: 2077-2090 p.
6. Sebire N., *Diagnostic Pediatric Surgical Pathology*, Churchill Livingstone- El Sevier, 2010: 629- 639 p.
7. Derek S., *The Central Nervous System in Pediatric Critical Illness and Injury*, Springer, 2009: 12-14, 31-33 p.
8. Mills S., *Sternberg's Diagnostic Surgical Pathology*, 5<sup>th</sup> ed., Lippincott- Williams and Wilkins, 2010: 389-396 p.
9. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007; 170: 1445-1453.
10. Campanelli J T, Sandrock R W, Wheatley W, Xue H, Zheng J, Liang F, Chesnut J D, Zhan M, Rao M S, Liu Y. Expression profiling of human glial precursors. *BMC Developmental Biology* 2008; 8: 1-12.
11. Nakamura M, Shimada K, Ishida E, Higuchi T, Nakase H, Sakaki T, Konishi N. Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro-Oncology* 2007; 9: 113-123.
12. Lindsten T, Zong W, Thompson C B. Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system. *Neuroscientist* 2005; 11: 10-15.
13. Konstantinidou A E, Korkolopoulou P, Patsouris E. Apoptotic markers for primary brain tumor prognosis. *J Neuro-Oncology* 2005; 72: 151-156.

14. Arenas-Huertero F, Recillas-Targa F. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. *Gac Méd Méx* 2002; 138: 547-555.
15. Kajiwara Y, Yamasaki F, Hama S, Yahara K, Yoshioka H, Sugiyama K, Arita K, Kurisu K. Expression of survivin in astrocytic tumors. Correlation with malignant grade and prognosis. *Cancer* 2003; 97: 1077-1083.
16. Nakabayashi H, Hara M, Shimizu. Prognostic significance of CDC25B expression in gliomas. *J Clin Pathol* 2006; 59: 725-728.
17. Collins V P. Brain tumours: classification and genes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2004; 75: ii2-ii11).
18. Ruano Y, Ribalta T, Rodríguez de Lope A, Campos-Martin Y, Fiaño C, Pérez-Magán E, Hernández Moneo J L, Mollejo Mollejo M, Meléndez B. Worse outcome in primary glioblastoma multiforme with concurrent epidermal growth factor receptor and p53 alteration. *Am J Clin Pathol* 2009; 131: 257-263.
19. Deininger MH, Weller M, Streffer J, Meyermann R. Antiapoptotic Bcl-2 family protein expression increases with progression of oligodendrogliomas. *Cancer* 1999; 86: 1832–1839.
20. Mazurek U, Bierzynska-Macyszyn G, Gola J, Orchel J, Slowinski J, Wilczok T: BCL2 and BAX mRNA concentration profile in fibrillary astrocytoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2001; 39: 179–180.
21. Strik H, Deininger M, Streffer J, Grote E, Wickboldt J, Dichgans J, Weller M, Meyermann R: bcl-2 family protein expression in initial and recurrent glioblastomas: modulation by radiochemotherapy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1999; 67: 763–768.