



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
 FACULTAD DE MEDICINA
 INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
 HOSPITAL DE PEDIATRIA
 CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI



Tesis:

“ALTERACION DE LA APOPTOSIS EN UN GRUPO DE PACIENTES
 PEDIATRICOS CON ASTROCITOMA”

Que para obtener el título en Oncología Pediátrica
 presenta la

Dra. Graciela Gascón Lastiri¹.

Tutores: Dr. Javier Enrique López Aguilar², Dr. Hugo Federico Rivera Márquez³.

Co-tutor: Dra. Ana Carolina Sepúlveda Vildosola⁴.

Colaboradores: Dr. Fabio Salamanca Gomez⁵, Dra. Carolina Barrientos Salcedo⁵ y Dr. Ignacio Félix⁶.

1.- Médico Residente de Segundo año de Oncología Pediátrica HP CMN SXXI.

2.- Médico Adscrito al Servicio de Oncología Pediátrica HP CMN SXXI.

3.- Médico Jefe de Servicio de Oncología Pediátrica HP CMN SXXI.

4.- Médico Pediatra Maestra en Ciencias HP CMN SXXI.

5.- Unidad de Investigación en Genética HP CMN SXXI.

6.- Médico Neuropatólogo HE CMN SXXI.

SERVICIO DE ONCOLOGÍA HOSPITAL DE PEDIATRÍA, CMN SXXI IMSS
 AV. CUAHTEMOC 330. COLONIA DOCTORES, MEXICO, D.F.
 TELÉFONO: 56.27.69.00 EXT. 22499 y 22500

México DF, Agosto 2010



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN ESTRUCTURADO

Gascón-Lastiri G, López-Aguilar JE, Rivera-Márquez H, Sepúlveda-Vildosola AC, Salamanca-Gomez F, Barrientos-Salcedo C, Félix I. "ALTERACION DE LA APOPTOSIS EN UN GRUPO DE PACIENTES PEDIATRICOS CON ASTROCITOMA" HPCMNSXXI IMSS 2010.

Introducción: Los tumores cerebrales son el tumor sólido más frecuente en pediatría, y su pronóstico depende de múltiples factores, como son la estirpe histológica, la localización, la edad de presentación, el grado de resección quirúrgica, y más recientemente, con el advenimiento de la biología molecular, se han encontrado factores pronósticos genéticos como la expresión del gen p53 y/o MIB-1 LI, el gen PCEF, delección 22q, pérdidas en los cromosomas 6,9 y 13, ganancias en el cromosoma 1 y 7, entre otros. La apoptosis, que es la muerte celular programada, por lo general se encuentra subexpresada en los tumores malignos, permitiendo la replicación sin medida de la célula tumoral.

Objetivo: Determinar si existe relación entre la expresión de la apoptosis y la respuesta a tratamiento y sobrevida en niños con astrocitoma.

Material y métodos: Cohorte ambielectiva. De las muestras del banco de tumores del sistema nervioso central se identificaron a todos los astrocitomas, se obtuvieron los nombres y números de afiliación y se busco tanto el expediente clínico como el radiológico, se extrajo el RNA y se hicieron microarreglos de expresión, posteriormente estos se analizaron mediante programas bioinformáticos para obtener los genes relacionados a las rutas de apoptosis.

Análisis estadístico: De acuerdo a la escala de medición de las variables se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión. Para las variables cualitativas se utilizaron frecuencias simples y porcentajes; para las variables cuantitativas media o mediana, de acuerdo con la distribución de las variables.

Resultados: se estudiaron 10 pacientes con una relación hombre:mujer de 1.5:1 y una mediana de edad de 6.5 años, por histología 7 fueron astrocitomas de bajo grado, 2 glioblastomas multiformes y 1 astrocitoma anaplásico. En cuanto a la localización 4 fueron supratentoriales, 2 cerebelares y 4 de tallo. Al momento actual 6 pacientes han fallecido, todos los pacientes mostraron alteración en los genes de la apoptosis y no se encontró ninguna alteración constante en los genes relacionados a la apoptosis en los diferentes pacientes.

Conclusiones: La alteración en las vías de la apoptosis, ya sea extrínseca o intrínseca, va a favorecer la aparición de diferentes tipos de tumores además de contribuir a su resistencia a las terapias convencionales utilizadas hasta la fecha. Es de suma importancia continuar determinando todos los genes involucrados y sus interacciones entre ellos mismos y en las distintas vías metabólicas para poder desarrollar tratamientos dirigidos que incrementen la sobrevida en estos pacientes.

INDICE

Antecedentes	4
Justificación	10
Planteamiento del problema	11
Objetivo	12
Hipótesis	12
Material y métodos	13
VARIABLES	14
Descripción general del estudio	15
Análisis estadístico	21
Factibilidad	21
Aspectos éticos	21
Resultados	22
Discusión	37
Conclusiones	39
Bibliografía	40
Anexos	44
Hoja de recolección de datos	
Hoja de autorización	
Tabla de función de genes	

ANTECEDENTES

El cáncer en la infancia representa entre 0.5 y 5.7% del total de las neoplasias reportadas. Los tumores cerebrales representan el tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica, precedidos por las leucemias y linfomas¹. A nivel mundial la incidencia se encuentra entre 10 y 18 casos por millón por año y son más frecuentes en el sexo masculino, la raza blanca y en menores de 5 años². En la década de los 90s, se llevo a cabo un estudio retrospectivo para determinar la incidencia de neoplasias malignas en niños de la ciudad de México atendidos en hospitales de Seguridad Social, de un total de 667 casos, 199 correspondieron a residentes de la ciudad de México, la mayor prevalencia de neoplasias correspondió a leucemias (39.2%), linfomas (17.6%) y tumores del sistema nervioso central (12.6%)³; se encontró una incidencia general de 94.3 casos por millón por año siendo más frecuente en menores de 5 años y en el sexo masculino tal y como se reporta en la población mundial, ocupando las leucemias el primer lugar con una incidencia de 36.4, en segundo lugar los linfomas con una incidencia de 15.2 y los tumores del SNC con una incidencia de 12³. En el 2004⁴ se llevo a cabo una encuesta descriptiva entre distintos hospitales del Distrito Federal con los objetivos de describir la edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia y describir la distribución de los tumores por cada grupo de edad pediátrica. Los tumores del SNC se observaron entre los 4 y 5 años para ambos sexos. Dentro de +estos, los más frecuentes fueron los astrocitomas (33.9%); el mayor número se presento entre los 4 y 6 años. En segundo lugar se encontró el meduloblastoma (26.3%), con el mayor número de casos entre los 2 y 4 años. En tercer lugar se presentó el glioblastoma, representando el 16.4% de los casos; la mayor frecuencia se observó entre los 4 y 5 años para el sexo femenino y entre los 4 y 6 años para el sexo masculino, la incidencia fue de 17 casos por millón por año y la frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es del 12%⁵.

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud modificada para pediatría se basa en conceptos histopatológicos y morfológicos considerados por Bailey⁶:

1.- Tumores gliales: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, carcinoma de plexos coroides, gliomas mixto.

2.- Tumores neuronales: gangliomas, gangliocitomas, gangliogliomas anaplásicos.

3.-Tumores neuroectodérmicos primitivos: meduloblastomas, meduloepiteliomas.

4.- Tumores de célula de la pineal: pineocitoma, pinealoblastoma

Los más frecuentes son los derivados de la glia hasta en un 60%, y de estos los astrocitomas son los más frecuentes. En segundo lugar se presentan los meduloblastomas y posteriormente los ependimomas⁷.

La expectativa de vida de acuerdo a la SEER (Surveillance, Epidemiology, End Result) a los 5 años es de 56%, siendo los de mejor pronóstico los astrocitomas de bajo grado, en fosa posterior y de peor pronóstico aquellos con glioma del tallo y astrocitomas de alto grado⁸ (80% y 56% de sobrevivida a 5 años respectivamente).

No existen signos o síntomas patognomónicos de los tumores cerebrales, sino que estos de manera inicial van en relación al incremento de la presión intracraneal por masa ocupante, o bien a la obstrucción en la circulación del líquido cefalorraquídeo; son frecuentes la cefalea de predominio matutino, vómitos en proyectil, que puede ser cíclico u ocurrir diario por las mañanas⁹; en los lactantes se presenta aumento del perímetro cefálico¹⁰. La presencia de pérdida de balance en la función del tronco cerebral, como alteraciones en la coordinación de las extremidades superiores y afección a pares craneales, sugiere fuertemente tumoración infratentorial. La afección a pares craneales sobretodo VI, VII, IX sugieren la posibilidad de una tumoración del tallo cerebral¹¹.

El diagnóstico se confirma mediante la imagen de resonancia magnética (IRM) de cráneo (más sensible y específico que la tomografía axial computarizada), que provee una definición anatómica exquisita diferenciando perfectamente el tejido sano del enfermo¹².

El diagnóstico histopatológico se obtiene por estudio de microscopia de luz e inmunohistoquímica del espécimen obtenido por biopsia o por resección total o subtotal. En las tumoraciones localizadas en tallo cerebral donde el acceso quirúrgico es difícil, la biopsia se obtiene por estereotaxia¹³.

El tratamiento es multidisciplinario, inicialmente con neurocirugía cuyos objetivos son: establecer el diagnóstico histopatológico, reducir el efecto de

masa de la tumoración que ocasiona obstrucción, mejorar la circulación del líquido cefalorraquídeo y potencialmente buscar la cura del paciente mediante resección completa o cuando esto no sea posible logrando cito reducción quirúrgica¹⁴. La quimioterapia neoadyuvante, basada en que la barrera hematoencefálica es disfuncional en el área adyacente al tumor y permite el paso de la QT al tejido tumoral¹⁴ ha demostrado también grandes beneficios¹⁵. La radioterapia pretende lograr una muerte selectiva de las células tumorales, impidiendo la supervivencia de la clona celular y eliminado el potencial de esta a seguir creciendo y de enviar metástasis¹⁶. Así mismo, es fundamental la participación de pediatría general, el médico de rehabilitación y el endocrinólogo ya que frecuentemente estos pacientes pueden presentar algún síndrome neuroendocrino^{17,18}.

Los factores pronósticos de estos tumores pueden dividirse en:

1. Factores clínicos: la edad¹⁹ (menores de 3 años tienen mal pronóstico debido a que no es posible utilizar la radioterapia como parte del manejo), la localización del tumor, el porcentaje de resección quirúrgica, la quimioterapia utilizada y el estado funcional de Karnofsky.
2. Histología (mal pronóstico para astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme)²⁰
3. Factores moleculares^{21,22,23}.
 - a) Los oncogenes que están implicados en dos procesos celulares básicos que son la transducción de la señal mitogénica (factores de crecimiento y proteínas de transmisión de señales) y la transcripción génica (proteínas reguladoras de la transcripción del ADN) y en los gliomas juegan un papel fundamental en el proceso de carcinogénesis, como son el gen PAX 5, las quinasas dependientes de ciclinas 4 (CDK4), y el gen MDM2 (Murine Double Minute).
 - b) Los factores de crecimiento (FC) celulares, son proteínas que en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular. La actividad de los factores de crecimiento puede estar aumentada básicamente a través de dos mecanismos: por un incremento del número de copias del gen que los codifica (amplificación génica), o bien por un aumento en la producción de

proteína por el gen (sobreexpresión). La sobreexpresión de los factores de crecimiento en los tumores malignos se asocia por lo general a una mayor agresividad biológica. La sobreexpresión o amplificación génica del gen c-erb-B2 que codifica al EGFR (receptor del factor de crecimiento epidérmico) se presenta en el 1% de los astrocitomas de bajo grado, 10% de los astrocitomas anaplásicos y 40% de los glioblastomas multiformes y se relaciona con un mal pronóstico. Otros factores de crecimiento identificados son el PDGF (factor de crecimiento de plaquetas) y su receptor PDGFR que se han identificado en todos los tipos de astrocitomas, mas no en tejido cerebral sano, se asocia a deleción 17p (lugar del locus del gen p53). La sobreexpresión del gen PCAF (que codifica al factor asociado CBP, una histona acetiltransferasa)²⁴ podría representar un nuevo marcador molecular para tumores malignos del sistema nervioso central.

- c) Genes supresores tumorales^{18,25,26}, que cuando se encuentran afectados, son marcadores de peor pronóstico. La pérdida de la función de la proteína p53 es la alteración genética más frecuentemente identificada en tumores sólidos. La región cromosómica que codifica esta proteína, la 17p13, se encuentra alterada en un 30% de los astrocitomas de cualquier grado de malignidad. El gen del retinoblastoma (Rb) se localiza en el cromosoma 13 (13q14) y codifica la proteína pRb1 que regula la transición de G0/G1 a S durante el ciclo celular, su inactivación por deleción o mutación ocurre en el 20% de los astrocitomas anaplásicos y en el 35% de los glioblastomas multiformes y se correlaciona inversamente con las mutaciones del gen p16. El gen p16 se localiza en el brazo corto del cromosoma 9 (9p21) y codifica la proteína p16 que ejerce una regulación negativa sobre el ciclo celular al inhibir la acción de las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6 facilitando la acción reguladora de la pRb1. La deleción 9p21 se puede identificar hasta en un 80% de los glioblastomas multiformes. El gen PTEN/MMAC1 se localiza en el cromosoma 10 (10q23.3) y la pérdida de heterocigosidad (LOH)

del cromosoma 10 es la alteración más frecuente de los glioblastomas. La expresión del gen p53 y/o MIB-1 LI >5% después de resección parcial o MIB-1 L1 >15% después de resección completa también han sido descritos como indicadores de agresividad del tumor y pobre pronóstico de la enfermedad ²⁷.

Otros hallazgos en tumores intracraneanos son: aberraciones en el cromosoma 22, de las cuales, la delección 22q es la más frecuente^{28,29}; ganancias en el cromosoma 1q, asociados con un comportamiento más agresivo, pérdidas en los cromosomas 6 (asociada al desarrollo y/o progresión de losependimomas en niños³⁰), 9 y 13. Otros hallazgos son pérdidas en los cromosomas 4,10, 11, 16, 17, 19 y 20³¹.

Es importante subrayar que tanto la localización de los tumores gliales como sus alteraciones moleculares son diferentes tanto en niños como adultos, lo que sugiere rutas genéticas distintas en ambos tipos de tumores, por ejemplo, los glioblastomas multiformes (grado IV de la OMS) son más frecuentes en los adultos con una localización supratentorial predominantemente vs los astrocitomas de bajo grado que se presentan más frecuentemente en niños y de predominio infratentorial. Además se presenta más frecuentemente amplificación/sobreexpresión de EGFR y mutación PTEN en adultos y en niños se observan más frecuentemente mutaciones del p53, así como LOH de los cromosomas 10q, 19q y 22q³²

Los estudios publicados de factores pronósticos en pacientes con gliomas se basan en estudios clínicos y de población, por lo que en el 2005 Ohgaki y Kleihues³³ realizaron una revisión de los estudios poblacionales con datos de incidencia, sobrevida y alteraciones genéticas en Suiza, encontraron un total de 987 casos en el periodo de 1980 a 1994 encontrando la sobrevida inversamente proporcional al grado de malignidad de la OMS, encontraron que la mutación del p53 fue la más frecuente en estrocitomas grado I (88%), grado II (53%), oligoastrocitomas (44%) y oligodendrogliomas (13%), e inversamente encontraron que la LOH de 1p19q típicamente ocurría en tumores que no expresaban mutaciones del p53, presentándose hasta en un 69% de los oligodendrogliomas. La alteración que más frecuentemente encontraron en los

glioblastomas fue la LOH 10q (69%), amplificación EGFR (34%), mutación del p53 (31%), delección p16INK4a (31%) y mutaciones PTEN (24%).

A pesar de grandes avances en los últimos 15 años en la supervivencia de estos pacientes, el tratamiento de los gliomas permanece como un gran reto. La resección quirúrgica total de estos tumores infiltrantes es prácticamente imposible y su curso clínico está determinado principalmente por el comportamiento biológico de las células tumorales, que incluye el índice de crecimiento y su respuesta tanto a la quimioterapia como a la radioterapia. Para predecir dicho comportamiento biológico el método utilizado ha sido la morfología de la tumoración por microscopía óptica y electrónica pero el diagnóstico histológico puede ser subjetivo y variable en algunos casos. Recientemente los progresos en biología molecular y genética molecular han mostrado ser un método eficaz para determinar el comportamiento biológico^{34,35}, teniendo como finalidad un abanico de aplicaciones tales como la producción de proteínas recombinantes con fines terapéuticos y el establecimiento de protocolos de terapia génica³⁶.

La apoptosis o muerte celular programada es una forma de suicidio celular genéticamente definida, que ocurre de manera fisiológica durante la morfogénesis, la renovación tisular y en la regulación del sistema inmunitario. Se considera que la apoptosis es un mecanismo fisiológico de muerte que se desencadena por diversas señales, las cuales pueden ser fisiológicas, o por estímulos exógenos ambientales. Las vías de señalización de la apoptosis son dos, la intrínseca y la extrínseca. La vía intrínseca (mitocondrial) se desarrolla cuando la célula está expuesta a un gran estrés como ocurre cuando se daña la cadena de DNA; la vía extrínseca (citoplasmática) es activada cuando algún ligando pro-apoptótico como Apo2L/TRAIL (familia de los Factores de Necrosis Tumoral) se une a un receptor pro-apoptótico como el DR4 y DR5³⁷. Tanto la vía intrínseca como la extrínseca convergen en la activación de enzimas intracelulares denominadas caspasas, quienes finalmente llevan a la destrucción de las proteínas celulares y con esto la muerte de la célula^{38, 39}.

El entendimiento de la apoptosis ha sentado las bases de nuevas terapias que pueden inducir la muerte de las células cancerosas o sensibilizarlas contra los agentes citotóxicos y la radioterapia⁴⁰. Estos nuevos agentes incluyen aquellos para la vía extrínseca como el ligando del receptor 1 del factor de necrosis

tumoral y aquellos de la vía intrínseca como los de la familia Bcl-2 como oligonucleótidos antisentido⁴¹. El fracaso en la inducción de la apoptosis constituye una de las principales causas de la resistencia a la quimioterapia en los tumores malignos⁴².

En base de que determinados hechos celulares pueden ser explicados por trastornos en la regulación de los genes responsables de la apoptosis, como es el caso de la transformación y progresión tumorales⁴³, se postula que debe de existir una relación entre la alteración en las vías de la apoptosis y la respuesta a los tratamientos convencionales de quimioterapia y/o radioterapia.

JUSTIFICACIÓN

A pesar del establecimiento de varios esquemas de quimioterapia en los últimos 15 años, la sobrevida en los pacientes con astrocitomas de alto grado en nuestro hospital es de 67% y 56% a 1 y 5 años, y en los de bajo grado del 80% a 5 años. El poder identificar pacientes susceptibles de una mejor respuesta a la quimioterapia nos permitirá crear subgrupos de tratamiento y ofrecer manejo más agresivo e individualizado. Si se identifican factores de mal pronóstico a través del estudio del comportamiento biológico y molecular de estos tumores se podrían establecer esquemas de quimioterapia más agresivos y específicos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La sobrevida global de los pacientes con astrocitoma ha sido evaluada, hasta hace poco, a través de factores clínicos, quirúrgicos e histopatológicos. Sin embargo, a pesar de ello, el comportamiento biológico de los tumores no es homogéneo. Recientemente se han identificado otros factores biomoleculares que influyen en el comportamiento y en la respuesta a tratamiento.

¿Existe relación entre la alteración de la apoptosis con la respuesta a tratamiento y sobrevida en niños con astrocitoma?

OBJETIVO

1. Determinar si existe relación entre la alteración de la apoptosis y la respuesta a tratamiento y sobrevida en niños con astrocitoma.

HIPÓTESIS

1. Los pacientes con astrocitomas que presentan alteración de las vías de la apoptosis tendrán una respuesta tumoral a tratamiento significativamente peor con respecto a aquellos que no la presentan.

MATERIAL Y METODO

Lugar

Hospital De Pediatría Centro Medico Nacional Siglo XXI

Tipo de estudio

Cohorte ambispectiva.

Criterios de inclusión:

1. Pacientes menores de 16 años con diagnóstico de astrocitoma establecido por el servicio de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
2. Pacientes con expediente completo.
3. Pacientes en quienes se realizó biopsia-resección y se cuenta con muestra en el banco de tumores del SNC del HP CMN Siglo XXI.
4. Pacientes que recibieron tratamiento en el servicio de Oncología del hospital de Pediatría de acuerdo a protocolo.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que abandonaron tratamiento.
2. Pacientes que no completaron tratamiento

Criterios de eliminación

1. Pacientes en los que no fue posible realizar la determinación de las vías de la apoptosis del material tumoral por algún problema técnico durante el procesamiento de la muestra o muestra insuficiente.

VARIABLES

Variable	Definición operacional	Tipo de variable	Escala de medición	Unidades de medición
Tiempo de sobrevida global	Numero de meses que viven los pacientes luego del diagnóstico de astrocitoma.	Dependiente	Cuantitativa continua	Meses
Respuesta a tratamiento	Disminución de la tumoración medida en imagen de resonancia magnética en cm ² a los 4 cursos de tratamiento	Dependiente	Cualitativa ordinal	Respuesta completa (desaparición de la tumoración) Respuesta parcial (disminución de más del 50% del tamaño de la tumoración) Enfermedad estable (disminución del tamaño de la tumoración < 50% o aumento de < del 25%) Enfermedad progresiva (aparición de cualquier lesión no identificada previamente o aumento > del 25% de lesiones ya existentes).
Porcentaje de resección	Porcentaje de la tumoración resecada quirúrgicamente.	Independiente	Cualitativa ordinal	Biopsia Resección parcial Resección total
Localización de la tumoración	Sitio donde se encuentra la tumoración.	Independiente	Cualitativa nominal	Supratentorial Tallo Cerebelo
Quimioterapia	Esquema de quimioterapia utilizado como tratamiento en	Independiente	Cualitativa nominal	Carbo/VCR (carboplatino)

	pacientes con diagnóstico de astrocitoma.			350mg/m ² sc día 1 y 2, vincristina 2mg/m ² sc día 1) ICE (carboplatino 400mg/m ² sc día 1, ifosfamida 2mg/m ² sc día 1, 2 y 3, etopósido 100mg/m ² sc día 1, 2 y 3)
Radioterapia	Si los pacientes con diagnóstico de astrocitoma recibieron la dosis de radioterapia estándar en astrocitomas (56Gy en 28-31 fracciones)	Independiente	Cualitativa nominal	Si No
Alteración de la apoptosis	Disminución de la expresión una vez o mas en comparación al tejido sano de acuerdo a la intensidad de fluorescencia.	Independiente	Cualitativa nominal	Presente Ausente
Sexo	Características biológicas y físicas que convierten a una persona en hombre o mujer al momento de su nacimiento.	Universal	Cualitativa nominal	Masculino Femenino
Edad	Edad del paciente que se encuentra registrada en el expediente al momento del diagnóstico.	Universal	Cuantitativa continua	Meses

DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

De las muestras del banco de tumores del sistema nervioso central se identificaron a todos los astrocitomas, se obtuvieron los nombres y números de afiliación y se busco tanto el expediente clínico como el radiológico. En el laboratorio de genética se realizó:

Extracción de RNA total de tejidos tumorales mediante uso de TRIZOL (GIBCO, BRL):

La extracción de RNA total se realizó a partir de tejido tumoral congelado en nitrógeno líquido. Para ello se cortó 1/6 parte, que correspondieron de 100-150 mg de tejido tumoral y se mantuvo en nitrógeno líquido para evitar la degradación del RNA. Se homogeneizó la muestra en 800 µl de trizol y se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se agregó 200 µl de cloroformo y se agitó fuertemente durante 15 s, después se incubó 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 15 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo eppendorf nuevo (ahí estaba el RNA). Se precipitó el RNA agregando isopropanol helado vol /vol y se incubó por 10 min a 4°C. Nuevamente se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se lavó la pastilla con etanol al 75% en agua tratada con DEPC y se incubó por 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 7,500 rpm durante 10 min a 4°C y se decantó el sobrenadante. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente y posteriormente se resuspendió el RNA en 20 µl de agua tratada con DEPC. Se almacenó a 70°C. ⁴⁴

Cuantificación espectrofotométrica:

Para realizar la cuantificación del RNA total previamente extraído se preparó una dilución 1:50 (1 µl RNA: 49 µl agua tratada con DEPC). Se leyó en un espectrofotómetro (Nanodrop) a una longitud de onda de 260 nm.

Para calcular el grado de pureza, se tomó en cuenta la relación 260 nm /280 nm que es el cociente obtenido al tomar los valores de absorbancia de 260 en la cual se cuantifica el material genómico y, 280 nm con la que se cuantifican proteínas. El equipo proporciono los resultados en ng /µl. ⁴⁵

Electroforesis en gel de agarosa al 2%:

Los RNAs extraídos se visualizaron en geles de agarosa al 2% con la finalidad de corroborar su integridad. Para ello se empleo una cámara para electroforesis horizontal, previamente tratada con NaOH 1N durante 3 hrs y posteriormente se enjuagó con agua destilada. El corrimiento se llevó cabo con solución amortiguadora de electroforesis (TBE) a 0.5 X que se preparó a partir de una solución 10 X (Tris base 108 g, ácido bórico 55 g, EDTA 0.5 M, pH 8.0, 9.3 g en 1 L). Para preparar el gel al 2% se pesó 0.8 g de agarosa y se disolvieron en 40 ml de TBE 0.5 X. Se fundió la agarosa en un horno de microondas por periodos de 30 s, agitando la mezcla entre cada periodo, posteriormente se añadieron 2 μ l de la solución de bromuro de etidio (de concentración 10 mg/ μ l, el cual se intercala en el RNA y al irradiarlo con luz UV emite fluorescencia) y se agitó nuevamente. Se vertió la agarosa fundida en la cámara de electroforesis y se insertó el peine. Una vez que el gel polimerizo se retiraron las placas y el peine cuidadosamente.⁴⁵

Se añadió la suficiente solución amortiguadora de electroforesis hasta cubrir el gel 1 mm arriba de él. Para colocar las muestras en los pozos del gel, se tomo 1 μ l de RNA total y se mezcló con 1 μ l de solución amortiguadora de carga 1 X que permitió la separación por tamaño de la bandas de RNA. Posteriormente se colocaron los electrodos tomando en cuenta que el RNA migra del cátodo (-) al ánodo (+). El gel de agarosa se corrió a un voltaje de 40-60 volts y el tiempo de corrimiento se determinó por la migración de los colorantes de la solución amortiguadora de carga (el azul bromofenol migra con fragmentos de 300 pb y el xilencianol con fragmentos de 4000 pb), para RNA fue aprox. son 90 min. Para visualizar el RNA, se colocó el gel en un transiluminador de UV, en donde se fotografió.⁴⁵

Microarreglos de expresión:

Cuando se desea determinar un cambio en el nivel de expresión de cierto gen, puede realizarse un análisis de expresión por microarreglos, con los chips de expresión. El DNA inmovilizado por hibridación es cDNA producto de mRNA de genes conocidos. Este proviene de células de tejidos sanos (control) y enfermos (muestra a estudio). Si un gen se sobreexpresa en cierta enfermedad, se hibridizará en el punto (spot) mayor cantidad de cDNA que

representa el gen afectado; por consiguiente las intensidades de fluorescencia serán disímiles entre el grupo en estudio y el grupo control. Una vez caracterizados los genes involucrados en ciertas enfermedades, el cDNA de las células humanas será hibridizado para determinar si la persona tiene el patrón de expresión génica relacionada con alguna enfermedad, y se logrará un diagnóstico y tratamiento oportunos.⁴⁶

Para realizar microarreglos de expresión primeramente se hizo el marcado de RNA total de dos muestras (mezcla A): Alexa 555 y Alexa 647 (RNA total 6 μ l, oligo (dT) 12-18 (2.5 μ g/ μ l) 1 μ l, "random primers" (3 μ g/ μ l) 1 μ l, H₂O 11 μ l con un vol final de 19 μ l, para cada muestra), se mezclaron varias veces con una micropipeta y después la reacción se incubó a 70°C por 10 min, posteriormente se colocó en hielo. Se mezcló A con B (5 X RT Reaction Buffer (SuperScript II kit, Invitrogen) 8 μ l, MgCl₂ (25 mM) 2 μ l, Aminoalil- dNTP mix (dATP, dCTP y dGTP 5 mM; dTTP 1.5 mM; AA- dUTP 3.0 mM) 4 μ l, DTT (0.1 M) (SuperScript II kit, Invitrogen) 4 μ l, SuperScript II Reverse Transcriptase (200 U/ μ l) 3 μ l, con un vol. final 21 μ l), y se centrifugó e incubó 10 min a 25°C, después 2 hrs a 42°C.⁴⁷

Para realizar la hidrólisis del RNA se añadieron 5 μ l de NaOH 1 N y 1 μ l de EDTA 0.5 M, se incubó 10 min a 65°C y se añadieron 25 μ l de HEPES 1 M, pH 7.5. en seguida se realizó la purificación del aminoalil cDNA (aacDNA) de la siguiente manera: al aacDNA se agregaron 7 μ l de acetato de sodio 3 M y 400 μ l de buffer de unión, se mezclaron con la micropipeta y se aplicó la mezcla a la columna, dejando en reposo 1 min. Se centrifugó a 1400 rpm 1 min y se lavaron tres veces con 500 μ l de etanol al 80%, nuevamente se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min; los tubos vacíos fueron centrifugados durante 1 min para remover el exceso de etanol. En un tubo nuevo se recuperó de la columna al aacDNA dos veces con 30 μ l de H₂O desionizada, se dejó en reposo 2 min y se centrifugó 1 min. Se dejó secar en el "speed vac" y se resuspendió en 4.5 μ l de bicarbonato de sodio 100 mM (pH 9). Seguidamente, se realizó la reacción de conjugación disolviendo el colorante con 4.5 μ l de DMSO, y se dió vortex. Se agregaron los 4.5 μ l del aacDNA purificado, se mezclaron sin centrifugar y se incubó a temperatura ambiente en obscuridad durante 60 min. Se realizó la purificación del aacDNA marcado (Alexa cDNA-AcDNA) agregando 71 μ l de H₂O, 8 μ l de acetato de sodio 3 M y 400 μ l buffer

de unión, se mezcló con una micropipeta y la mezcla se aplicó a la columna, dejando en reposo 1 min y centrifugando durante 1 min. Se realizaron tres lavados con 500 μ l de etanol 80% centrifugando durante 1 min.⁴⁷

Para eliminar el exceso de etanol se centrifugaron los tubos vacíos durante 1 min. En un tubo nuevo se recuperó de la columna al AcDNA dos veces con 50 μ l de agua desionizada estéril o TE buffer, dejando en reposo 2 min y centrifugando 1 min. Para llevar a cabo la hibridación de los microarreglos con SSC 5 X /SDS 0.1%.⁴⁵ Primero se realizó un pre tratamiento del microarreglo de la siguiente manera: se prehidrató la laminilla exponiendo el lado impreso al vapor de agua a 50°C durante 10 s, se volteó para secar y se expuso al vapor (tres veces), fijando con dos ciclos de luz UV 0.12 J.cm², enseguida se lavó con SDS 0.1% durante 1 min a temperatura ambiente, seguido de otros dos lavados con agua desionizada durante 1 min y se pasó inmediatamente a la solución de prehibridación (SSC 5 X, SDS 0.1%, BSA 1%), incubando por 1 hr a 42°C. Posteriormente se lavaron cinco veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se dejaron secar por centrifugación a 1500 rpm por 5 min. Para la hibridación, las muestras se ajustaron a la concentración deseada y se secaron, para resuspenderlas en la solución de hibridación (Alexa 555 y Alexa 647 45.5 μ l, SSC 20 X 17.5 μ l, SDS 1% 7 μ l, con un vol final de 70 μ l). Se desnaturalizó a 94°C por 5 min y 30 s a 65°C. Se aplicó la mezcla al microarreglo cubriendo la superficie con un cubreobjetos e incubando por 18 hrs a 42°C.⁴⁷

Se realizaron tres lavados a temperatura ambiente: un lavado de 2 min en SSC 1 X- SDS al 0.05%, otro lavado de 2 min en SSC 0.06 X y por último un lavado de 2 min en SSC 0.06 X. Se dejó secar por centrifugación a 1500 rpm durante 5 min, después se colocó la laminilla en el escáner para realizar la lectura de la misma y se analizó la imagen para cada una de las longitudes de onda (570 nm para Cy3 y 670 nm para Cy5).⁴⁷

El escáner utiliza luz láser y examina los microarreglos excitando cada tinte fluorescente de su superficie mediante una luz monocromática y colectando la luz de emisión (fluorescencia) convirtiendo la corriente de fotones en valores digitales que pueden ser almacenados en una computadora. En este paso se analizan las imágenes de 16 bits obtenidas para cada una de las longitudes de onda en la cuales se pueden apreciar los puntos en los que la reacción de

hibridación ha sido positiva y los puntos en los que no ha habido tal hibridación.⁴⁷

Los puntos del microarreglo son circulares en lugar de cuadrículas. Se utilizó el color verde para los sanos y el rojo para los enfermos y los amarillos a los que se expresan de forma similar en ambos. Como medida final se suele utilizar el cociente entre las expresiones en ambos canales o su logaritmo (Figura 1).⁴⁷

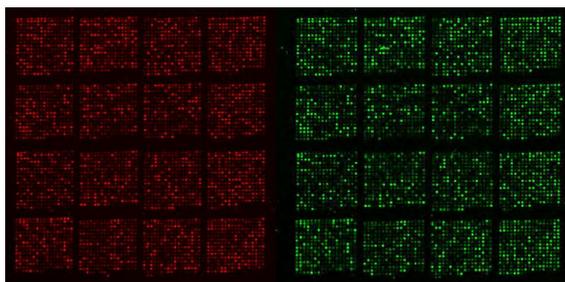


Figura 1. Imagen de fluorescencia para un microarreglo hibridizado con una sonda marcada con dUTP-Cy3 (rojo) y una sonda marcada con dUTP-Cy5 (verde).

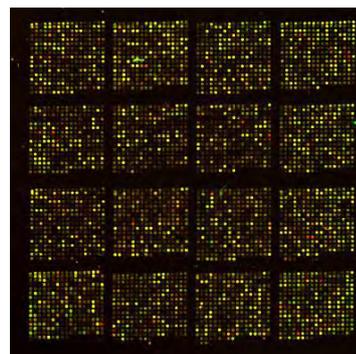


Figura 2. Imagen combinada de las imágenes de la figura 1.

Por último se realizó el análisis de los datos obtenidos del microarreglo con la finalidad de seleccionar los genes que están siendo expresados significativamente entre muestras mediante el paquete GenArise.

Análisis de resultados de microarreglos mediante programas bioinformáticos:

Para el análisis de los microarreglos se empleó un programa bioinformático: *GenArise* se utilizó para el análisis estadístico de los datos de los microarreglos, y bases de datos: *Gene cards* se utilizó para buscar las características de los genes involucrados en las vías de apoptosis.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO:

De acuerdo a la escala de medición de las variables se realizó estadística descriptiva con medidas de tendencia central y de dispersión. Para las variables cualitativas se utilizaron frecuencias simples, porcentajes y la moda; para las variables cuantitativas media o mediana, desviación estándar, cuartiles e intervalo de confianza, de acuerdo con la distribución de las variables.

FACTIBILIDAD.

Recursos humanos:

Tesista médico residente de Oncología Pediátrica.

Tutor médico adscrito y cotutor metodológico

Doctores en genética.

Médico patólogo.

Recursos materiales

Hojas blancas, lápices, computadora, programa SPSS 16.0, impresora, muestras del banco de tumores del SNC, espectrofotómetro, PCR, ABIprism 310 genetic analyzer y el software GeneScan.

Recursos financieros

Se solicito apoyo para financiamiento del proyecto.

ASPECTOS ETICOS

De acuerdo a la Ley General de Salud en materia de Investigación en el capítulo 17, se considera como un estudio sin riesgo mayor al mínimo ya que se revisaran expedientes clínicos y radiológicos y los estudios moleculares se realizaran en muestras ya tomadas y pertenecientes al banco de tumores del SNC y archivo de patología. Los padres de los niños con tumoración firman consentimiento informado para la conservación de los tejidos tumorales con fines de investigación al momento de la resección quirúrgica.

RESULTADOS

En el presente trabajo se incluyeron un total de 10 pacientes portadores de Astrocitoma diagnosticados en el servicio de Patología del Hospital de Pediatría CMN SXXI IMSS.

La mediana de edad fue de 6.5 años con un rango de 3 a 14 años.

La relación hombre:mujer fue de 1.5:1, con 6 hombres y 4 mujeres.

Por histología, 7 fueron astrocitomas de bajo grado, 1 fue astrocitoma anaplásico y 2 glioblastomas multiformes.

Por localización, 4 fueron supratentoriales, 2 de cerebelo y 4 de tallo. De los supratentoriales 1 fue en tálamo, 1 intraventricular, 1 temporoparietal y 1 parietal.

En la tabla I se muestran las características generales de los pacientes y en la tabla II los genes que se encontraron alterados en cada paciente. No fue posible realizar grupos ya que los 10 pacientes presentaron alteraciones en distintos genes relacionados a las vías de apoptosis. En el anexo III se describe la función de los genes que resultaron alterados.

Tabla I. Características de los pacientes.

	n=10	%
Sexo		
Masculino	6	60
Femenino	4	40
Histología		
Astrocitoma de bajo grado (I-II)	7	70
Astrocitoma anaplásico (III)	1	10
Glioblastoma multiforme (IV)	2	20
Localización		
Supratentorial	4	40
Tallo cerebral	4	40
Cerebelo	2	20
Cirugía		
Biopsia	4	40
Resección parcial	4	40
Resección completa	2	20
Quimioterapia		
ICE	8	80
Carbo/VP-16	1*	10
Radioterapia		
Si	6	60
No	4	40

Se realizó la extracción de RNA total de los 10 pacientes con diagnóstico de astrocitoma mediante uso de TRIZOL (GIBCO, BRL) como se describió en material y métodos. Con este método se obtuvieron valores de pureza entre 1.8 y 1.96 realizando la cuantificación del mismo mediante un espectrofotómetro de ácidos nucleicos "Nanodrop", la concentración del RNA se expresa en ng/ μ l. Así mismo, se realizó la electroforesis en gel de agarosa al 2% de los RNA's extraídos durante 90 min. a 60 V.

Los RNA's totales extraídos de las 10 muestras de tejido tumoral se enviaron al Instituto de Fisiología Celular (IFC-UNAM) donde se realizaron microarreglos de expresión con la biblioteca genómica de 10,000 genes de humano (H10KA). Se realizó la síntesis de cDNA mediante RT-PCR, para realizar el marcaje con los fluoróforos se comparó con tejido cerebral sano. Posteriormente se hibridizó la laminilla, la cual, se colocó en un escáner para analizar la imagen, realizar la cuantificación y la normalización de cada punto o gen. (Figura 1)

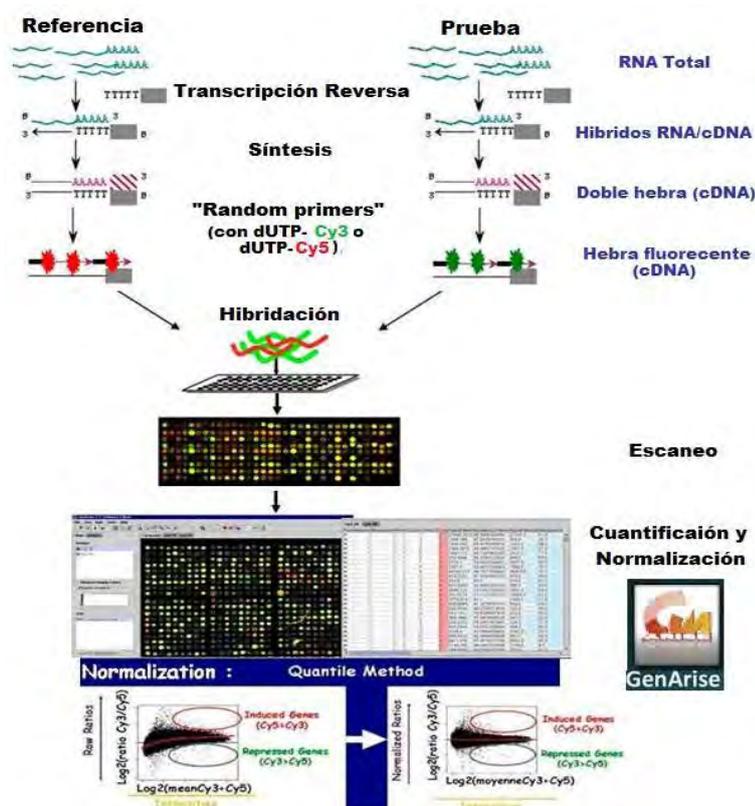


Figura 1. Procedimiento para la elaboración y análisis de los microarreglos de expresión.

Mediante el programa GenArise se obtuvo una base de datos con 10, 000 genes, donde cada gen se encuentra por duplicado y los valores de intensidad para cada uno. Para realizar la normalización se trabajó en el programa y se obtuvo la gráfica de Radio (R) vs Intensidad (I) como se muestra en la figura 2.

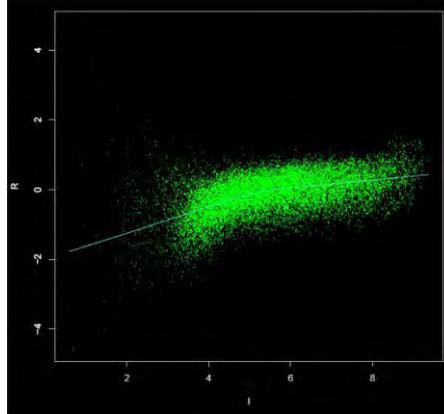


Figura 2. Gráfica R vs I de 10,000 genes de humano.

Al normalizar los valores, se obtiene la siguiente gráfica:

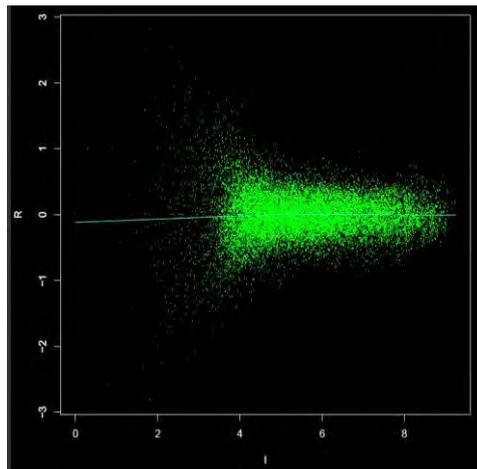


Figura 3. Normalización de datos obtenidos mediante GenArise.

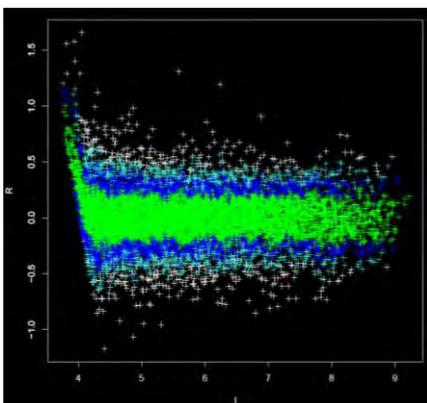


Figura 4. 10 000 genes normalizados.

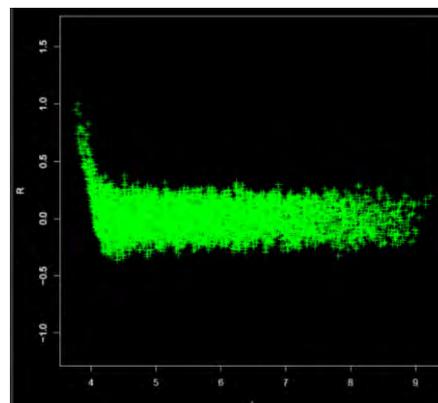


Figura 5. Z score <1.

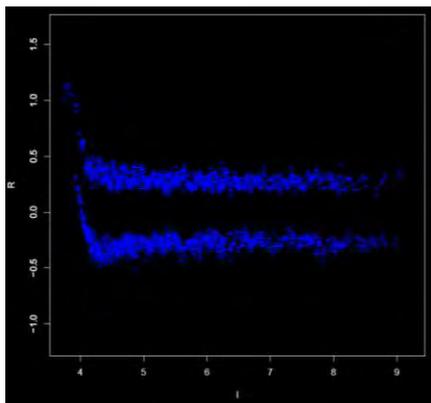


Figura 6. $1 < Zscore < 1.5$

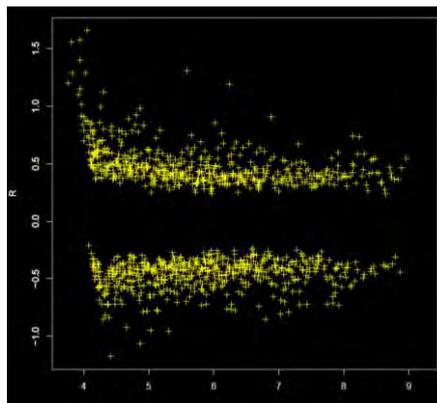


Figura 7. $Z score > 1.5$

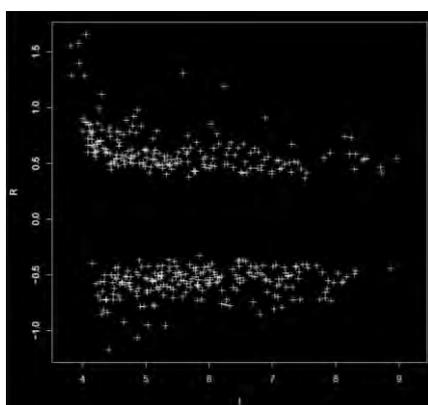


Figura 8. $Z score > 2$

Una vez normalizados los datos se elijen los genes con Z score $> 1,5$ (Figura 7) ya que están en un rango mayor de confiabilidad, así, se generan dos bases de datos, una donde están los genes subexpresados y otra donde están los sobreexpresados. Para cada uno de los genes se obtiene Cy3, Cy5 (intensidad de fluorescencia de datos normalizados), Id (nombre del gen), Symdesc (Símbolo o alias del gen) y Zscore (genes en rango 1.5 a 1.9999).

Tabla II. Genes alterados por paciente.

SEXO	EDAD	LOCALIZACION	HISTOLOGIA	SOBREVIDA	APOPTOSIS GENES SOBRE-EX	APOPTOSIS GENES SUB-EX	ESTADO ACTUAL
M	14	SUPRA	GM	1 mes	FABP7, SEMA5A, PTPRZ1, VEGF, THBS1.	BCL-2, IAP, Cyt-C, IkBOX.	Fallecido
M	3	INFRA	ABG	2 meses	OLIG1, SERPINA3, CAMK2A, TIMP1.	CASP3, TrkA, MAPK1, CCNA1, FOXP1B.	Fallecido
M	7	SUPRA	ABG	20 meses	IGFBP4,S100A4, MBP1, TGFB1, BID,CASP-8.	IRAK-4, PKA.	Fallecido
F	13	SUPRA	GM	3 meses	FABP7, PTPRZ1, BCAN, YBOX1, CD63, ARHE, VEGF, PINE1, AKT, BCL2, PKA, IAP, CytC, IkBOX, THDS1, TOP2A.	IRAK4, P13K.	Fallecido
M	9	TALLO	AA	13 meses	EGFR, AKT, IGFVP2, Ki67, PBNA,	PKA, CASP3.	Fallecido
M	14	TALLO	ABG	24 meses	PRKCB1,TIMP1, MCL1, BCL2, PKA, IkBOX, CN, RIP1, CASP3.	CCNA1,SPINT2, MAPK1, IRAK4, PKA, FLIP, TRAIL	Vivo
M	6	TALLO	ABG	14 meses	BMP2, NTRK2, DFF45, CASP10, AKT/PKB, TRADD, KIK, ENDOG,	IRAK4, PKA, TRAIL, CALPAIN-A.	Fallecido
F	4	INFRA	ABG	19 meses	AF007150, AF079529, PKA, CytC, TrkA, IL-1.	AFO17986, TGFB2, IRAK4, TRAIL, CASP8.	Vivo
F	4	TALLO	ABG	2 meses	BCL2, PKA, APAF-1, FLID, IL- 1, IRAK2.	JNK3A2.	Vivo
F	4	SUPRA	ABG	18 meses	DES, CASP3, TrkA.	IRAK4, CALPAIN-A, PKA, CASP8, TNF.	Vivo

M: masculino, F: femenino, ABG: astrocitoma de bajo grado, AA: astrocitoma anaplásico. GM: glioblastoma multiforme.

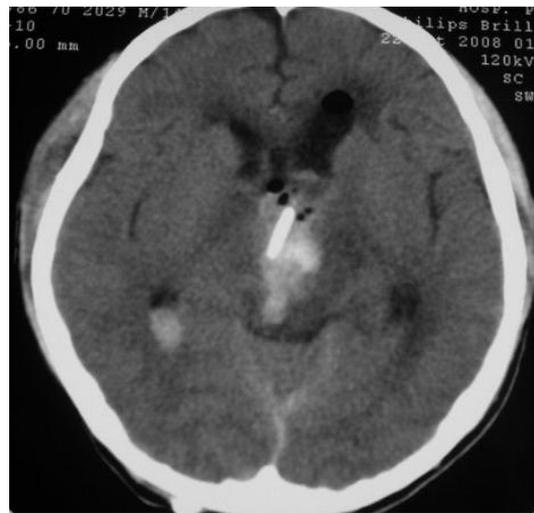
En color verde se muestran los genes proapoptóticos y en color rojo los genes antiapoptóticos.

PACIENTE – 1 CGLJ

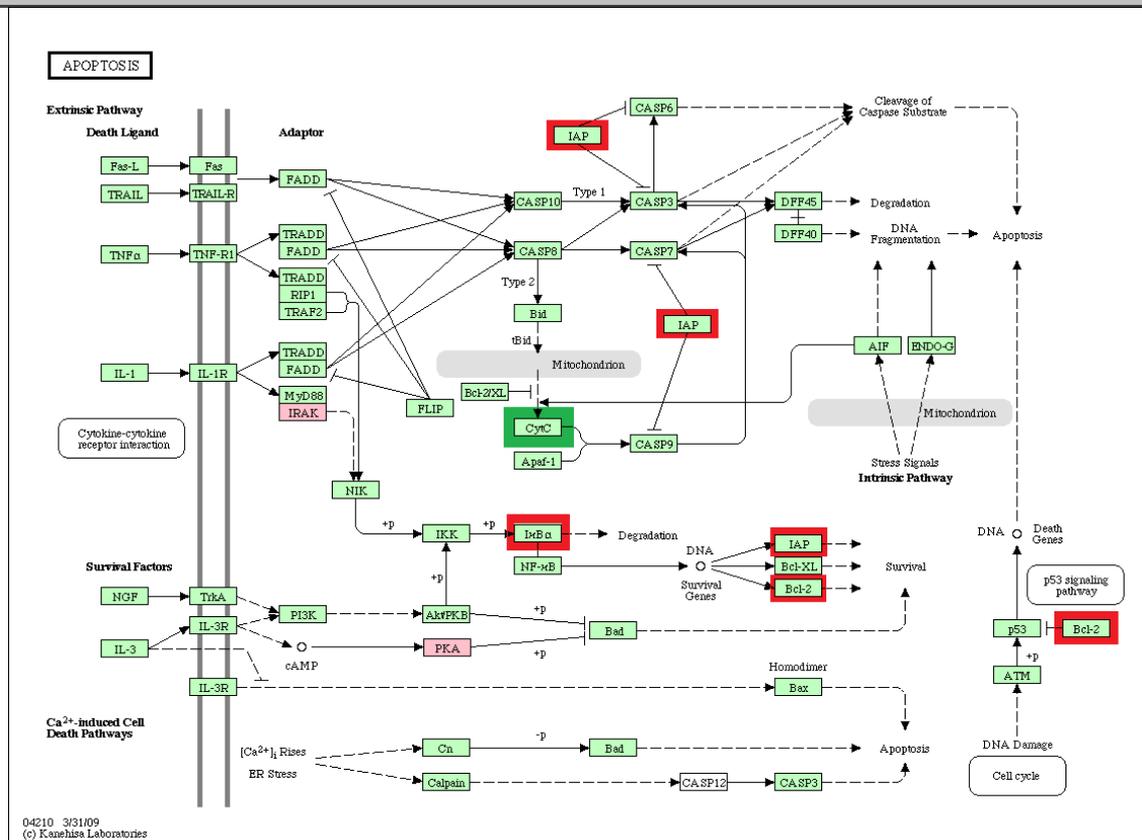
Masculino de 14 años de edad, se diagnosticó en octubre del 2008 con un glioblastoma multiforme intraventricular, se realizó resección parcial y recibió un ciclo de QT con ICE, no recibió RT.

Fallece en noviembre del 2008 por progresión tumoral.

Meses de sobrevida: 1 mes



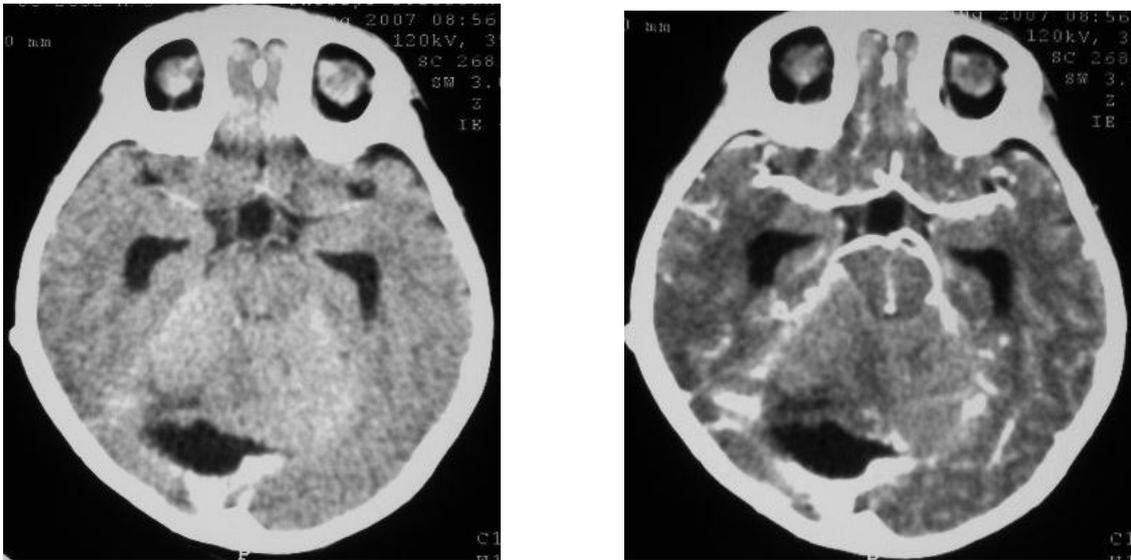
GENES SOBREEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
FABP7, SEMA5A, PTPRZ1, VEGF, THBS1.	BCL-2, IAP, Cyt-C, IkBOX.



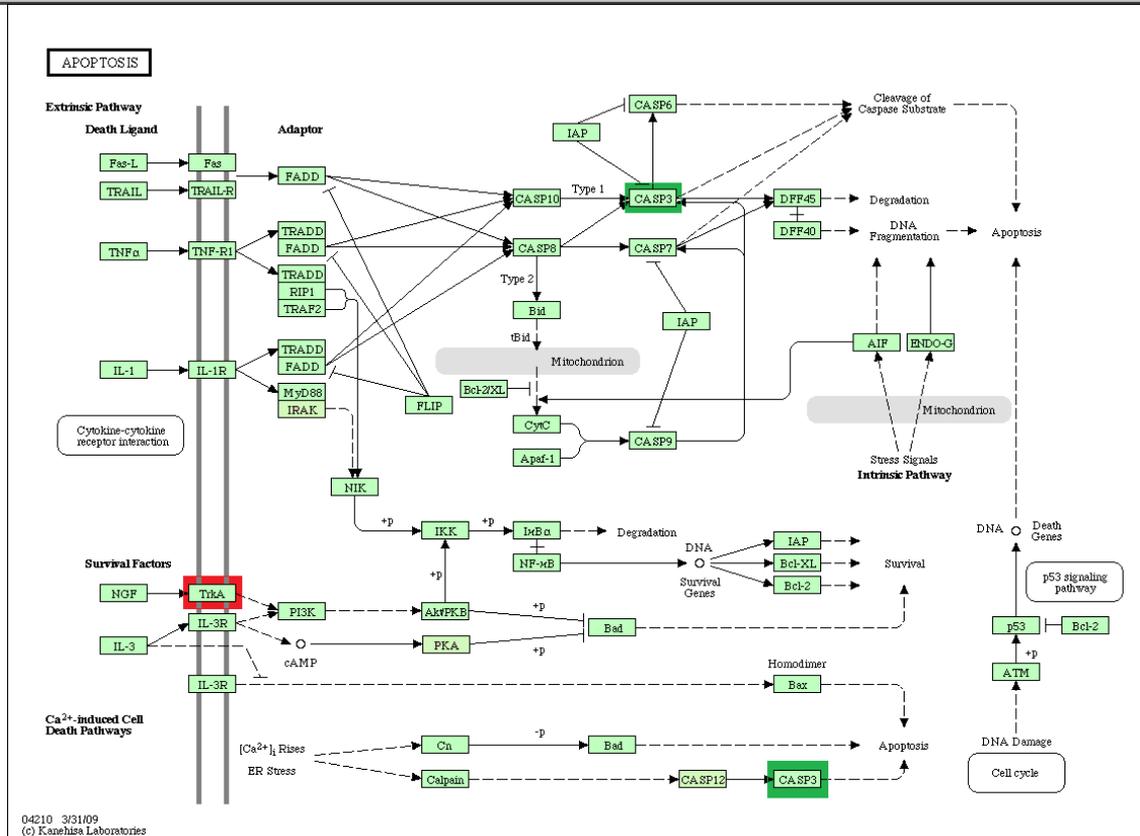
PACIENTE – 2 VHI

Masculino de 3 años de edad, se diagnóstico en agosto del 2007 con un astrocitoma de bajo grado de cerebelo, se realizó resección completa y se envió a valoración para RT, sin embargo fallece en octubre del 2007 por sangrado de tubo digestivo.

Meses de sobrevivida: 2 meses



GENES SOBREENEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
OLIG1, SERPINA3, CAMK2A, TIMP1 .	CASP3 , TrkA , MAPK1 , CCNA1, FOXG1B.



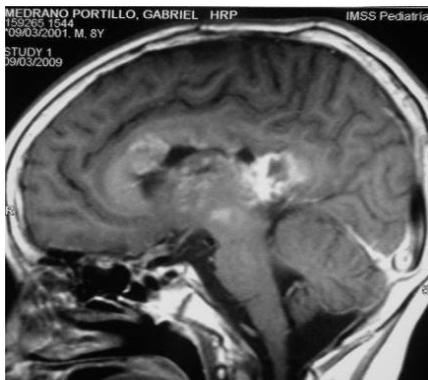
PACIENTE – 3 MPG

Masculino de 7 años de edad, se diagnóstico en octubre del 2007 con un astrocitoma de bajo grado de tálamo, se realizó resección parcial y se envió a radiocirugía en febrero del 2008, sin embargo presenta progresión tumoral en febrero del 2009 por lo que se realiza nueva resección e inicia QT con ICE, recibiendo 4 ciclos completos.

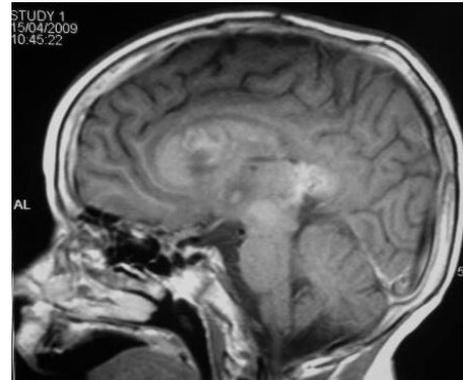
Fallece en junio del 2009 por progresión tumoral.

Meses de sobrevivida: 20 meses.

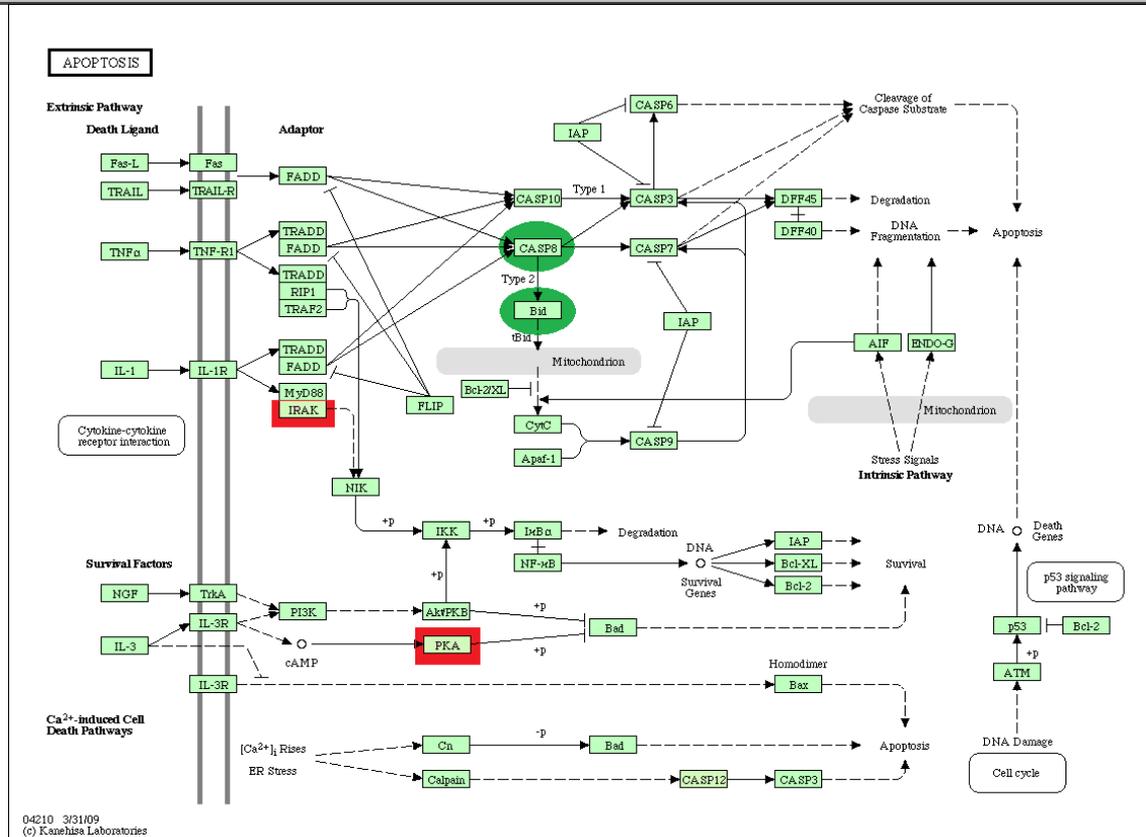
IRM al momento de la recaída:



IRM posterior a un ciclo de QT con ICE:



GENES SOBREEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
IGFBP4, S100A4, MBP1, TGFB1, BID, CASP8.	IRAK4, PKA.

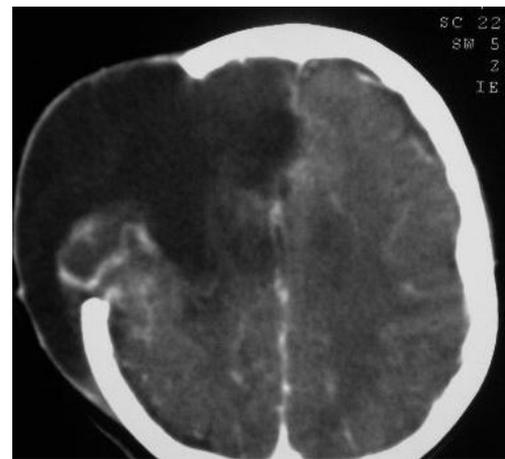
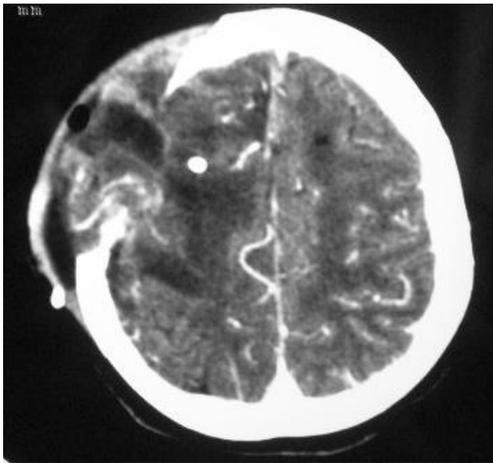


PACIENTE – 4 CVA

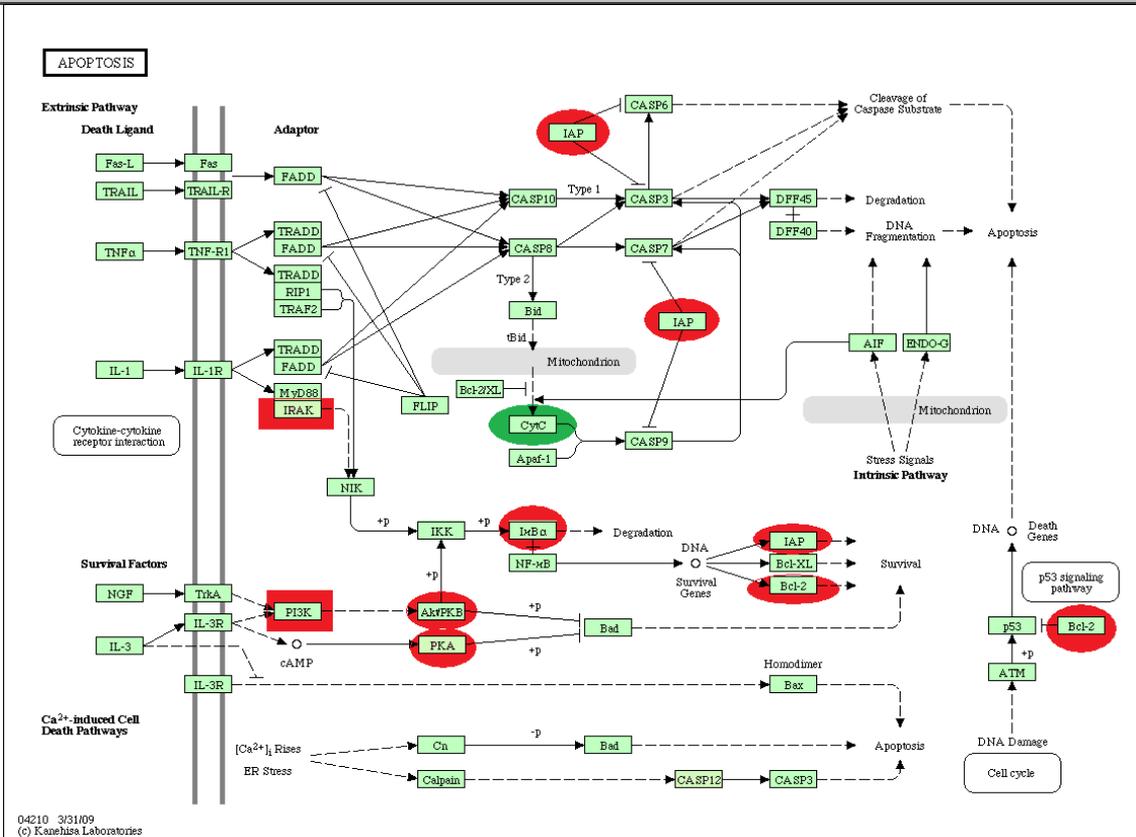
Femenino de 13 años de edad, se diagnóstico en septiembre del 2007 con un glioblastoma multiforme temporoparietal, se realizo resección parcial e inicio QT con ICE.

Fallece en diciembre del 2007 por progresión tumoral.

Meses de sobrevivida: 3 meses.



GENES SOBREENEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
FABP7, PTPRZ1, BCAN, YBOX1 , CD63 , ARHE, VEGF , PINE1,	IRAK4 , P13K .
AKT , BCL2 , PKA , IAP , CytC , IKBOX , THDS1 , TOP2A .	

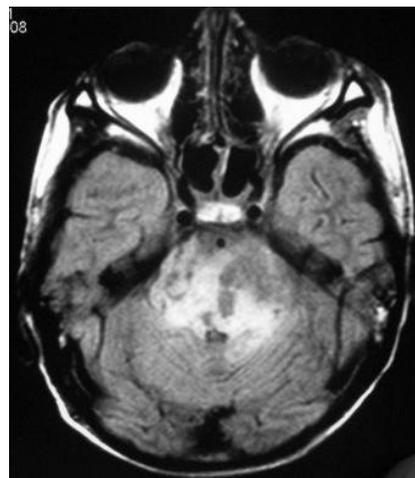
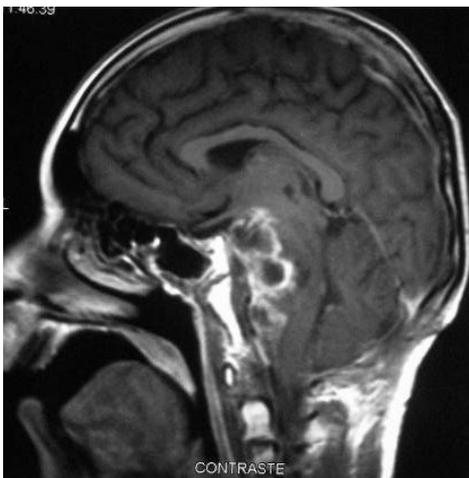


PACIENTE – 5 GME

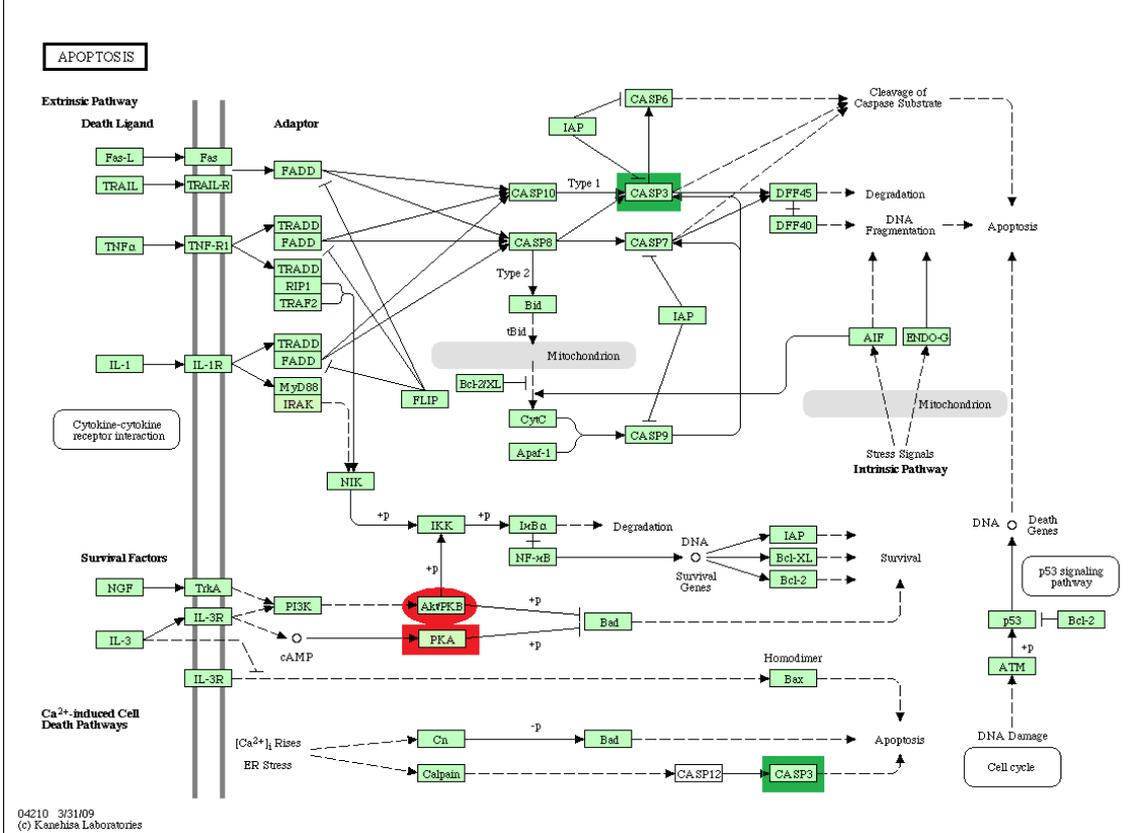
Masculino de 9 años de edad, se diagnóstico en noviembre del 2007 con un astrocitoma de alto grado de tallo cerebral, se realizo biopsia únicamente e inicio QT con ICE además de RT.

Fallece en octubre del 2008.

Meses de sobrevida: 13 meses.



GENES SOBREENEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
EGFR, AKT, IGFVP2, KI67, PBNA,	PKA, CASP3.



PACIENTE – 6 SAM

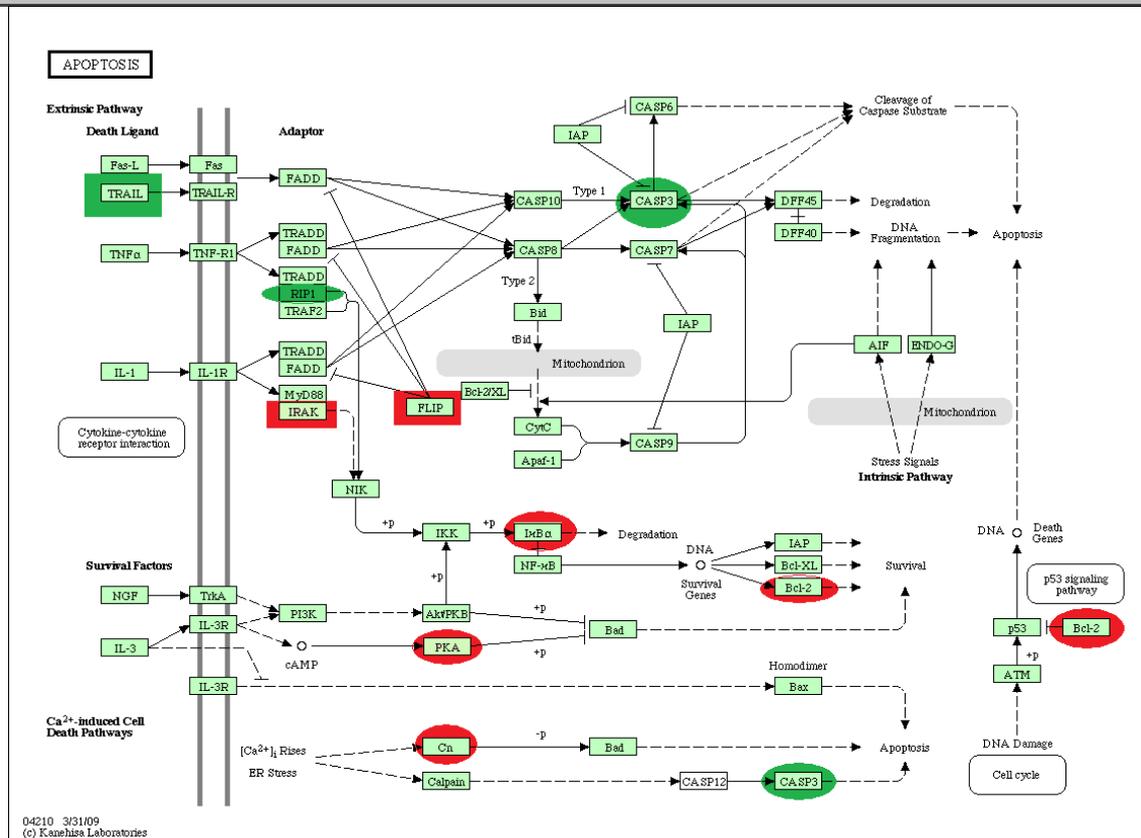
Masculino de 14 años de edad, se diagnóstico en agosto del 2007 con un astrocitoma de bajo grado de tallo cerebral, se realizo biopsia únicamente, recibió QT con ICE además de RT.

Se encuentra vivo actualmente.

Meses de sobrevivida: 31 meses.



GENES SOBREENEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
PRKCB1, TIMP1, MCL1, BCL2, PKA, IκBα, CN, RIP1, CASP3.	CCNA1, SPINT2, MAPK1, IRAK4, PKA, FLIP, TRAIL

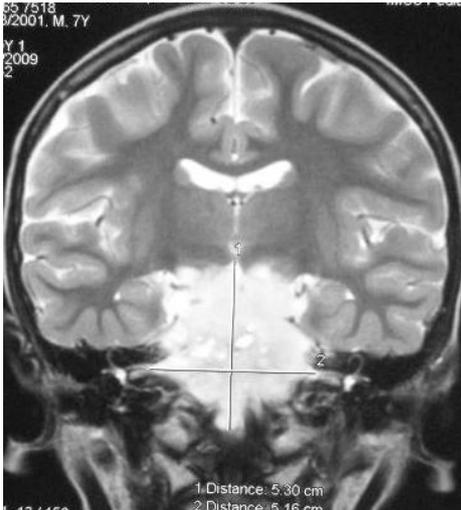


PACIENTE – 7 MSJ

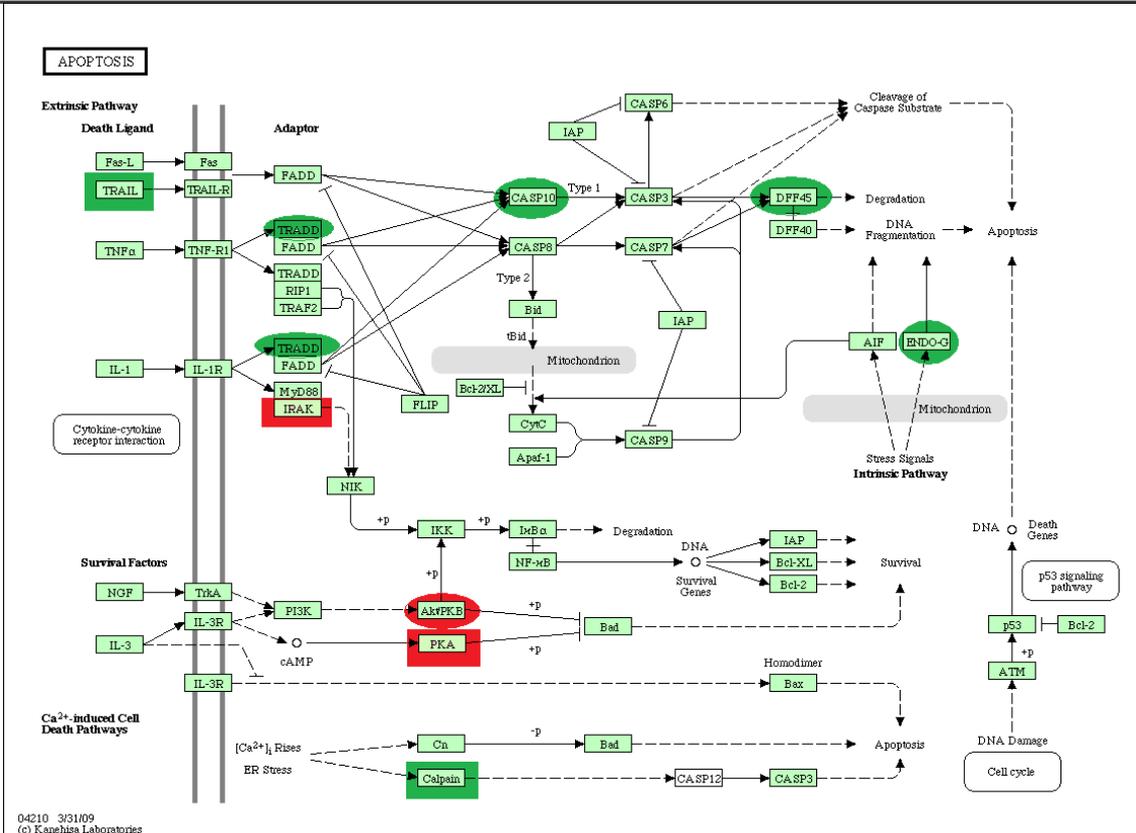
Masculino de 6 años de edad, se diagnóstico en marzo del 2008 con un astrocitoma de bajo grado de tallo cerebral, se realizo biopsia únicamente, inicio QT con carbo/VCR y por datos de progresión tumoral se cambio al mes a ICE, además recibió RT.

Fallece en abril del 2009.

Meses de sobrevida: 13 meses.



GENES SOBREPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
BMP2, NTRK2 , DFF45 , CASP10 , AKT/PKB , TRADD , IRAK4 , PKA , TRAIL , CALPAIN-A , KIK , ENDOG .	



PACIENTE – 8 ACV

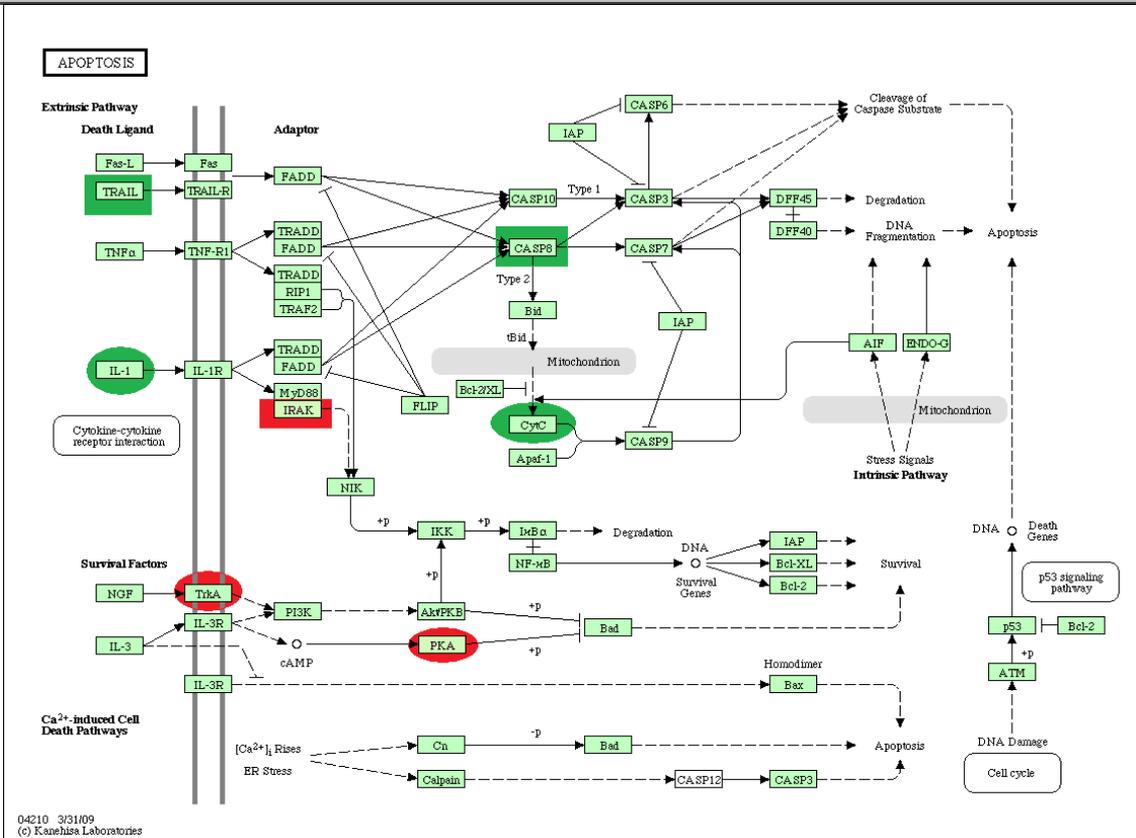
Femenino de 4 años de edad, se diagnóstico en enero del 2008 con un astrocitoma de bajo grado de cerebello, se realizo resección parcial por lo que inicio tratamiento con QT con ICE además de RT.

Actualmente se encuentra viva.

Meses de sobrevida: 26 meses.



GENES SOBREEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
AF007150, AF079529, PKA, CytC, TrkA, IL-1.	AFO17986, TGFB2, IRAK4, TRAIL, CASP8.

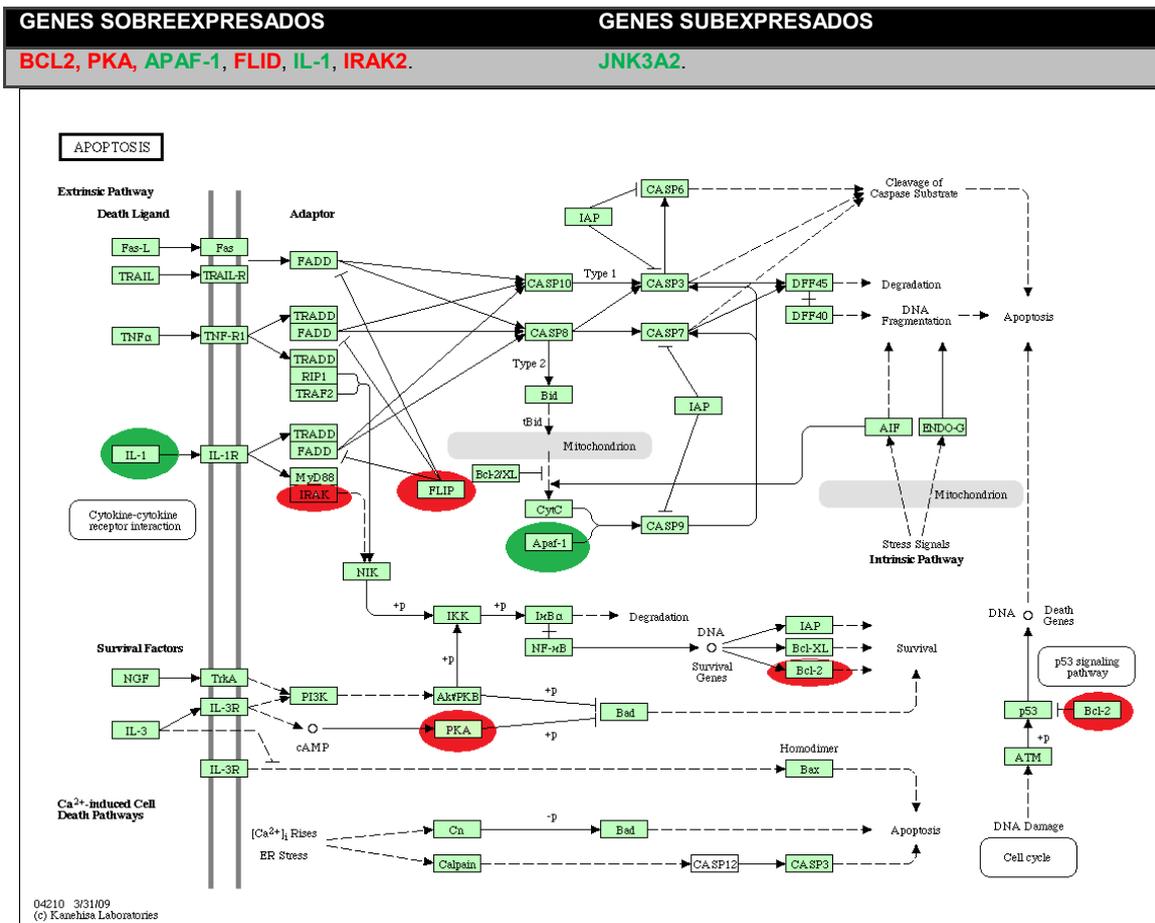


PACIENTE – 9 SGB

Femenino de 4 años de edad, se diagnóstico en junio del 2009 con un astrocitoma de bajo grado de tallo cerebral, se realizo biopsia únicamente e inicio QT con ICE.

Actualmente se encuentra viva.

Meses de sobrevida: 9 meses.

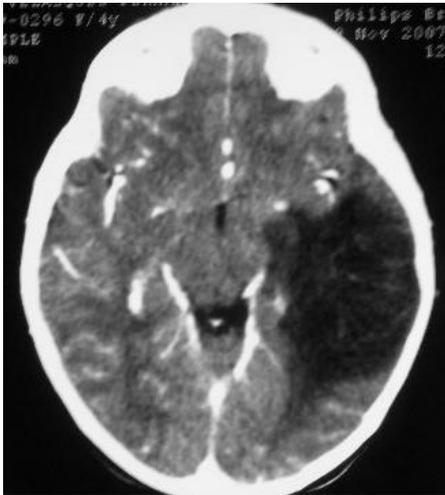


PACIENTE – 10 CVF

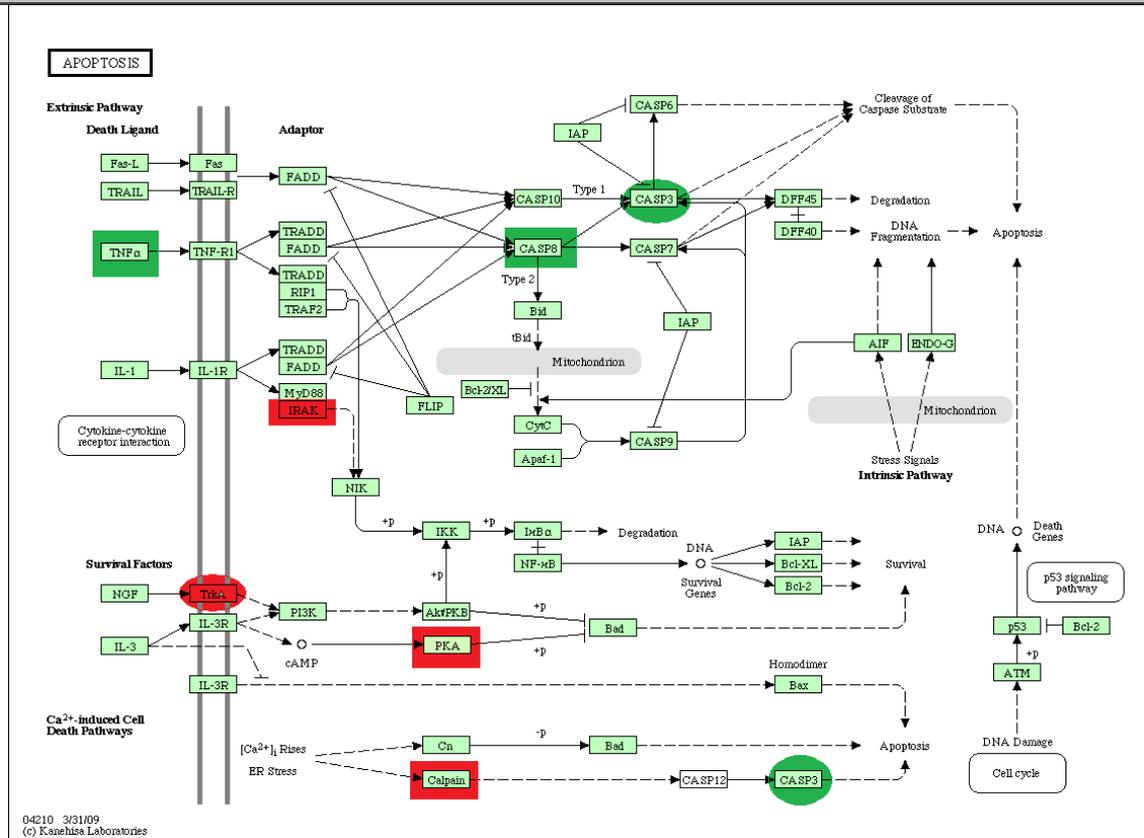
Femenino de 4 años de edad, se diagnostico en diciembre del 2007 con un astrocitoma de bajo grado parietal, se realizo resección completa.

Actualmente se encuentra viva.

Meses de sobrevida: 27 meses.



GENES SOBREEXPRESADOS	GENES SUBEXPRESADOS
DES, CASP3 , TrkA .	IRAK4 , CALPAIN-A , PKA , CASP8 , TNF .



DISCUSION:

En el presente estudio se estudió de manera integral a 10 pacientes pediátricos portadores de un astrocitoma.

Como se ha comentado previamente, el comportamiento biológico de los astrocitomas varía ampliamente independientemente de su histología, no así cuando se refiere a su localización, ya que como corroboramos en este estudio, los de tallo cerebral continúan presentando el peor pronóstico, de los 4 pacientes que presentaron tumor de tallo, 3 fueron reportados como de bajo grado en la biopsia por estereotaxia y uno de alto grado, este último y uno de bajo grado fallecieron 12 meses posteriores al diagnóstico a pesar de haber recibido tratamiento con quimioterapia y radioterapia.

No obstante, aquellos que por histología correspondían a un bajo grado de malignidad, pudimos encontrar que in vitro, podían tener un comportamiento tan agresivo como aquellos tipificados como de alto grado, tal es el caso del paciente numero 3, diagnosticado como astrocitoma de bajo grado de tálamo; a quien inicialmente se le realizo resección parcial del 95% y posteriormente recibió RT permaneciendo 12 meses sin datos de AT, sin embargo con recidiva en el sitio primario por lo que inicio QT pero a los 4 meses fallece por progresión tumoral.

Recientemente se ha estudiado e involucrado de manera estrecha las vías de apoptosis con la evolución de la mayoría de los cánceres, incluidos los tumores cerebrales. El conocimiento actual de la apoptosis, como mecanismo regulador y homeostático de los tejidos explica ahora el desarrollo de tejido neoplásico en la mayoría de los casos. Y cualquier alteración ó desbalance en éste mecanismo regulador, ya sea tanto en la vía extrínseca regulada por la familia del TNF (factor de necrosis tumoral y TRAIL) ó la vía intrínseca mitocondrial, da como resultado el desarrollo de un tumor.^{40, 48}

Recientemente se ha querido canalizar éste conocimiento, a fin de desarrollar moléculas que intervengan ó favorezcan el desarrollo ó estímulo de la apoptosis para tratar varios tipos de cáncer en la edad pediátrica como Neuroblastoma y rabdomyosarcoma.⁴⁹

En el presente estudio, de suma importancia, dado que es de los primeros que se desarrollan en Tumores de Sistema Nervioso Central en Pediatría, no pudimos encontrar una alteración genética constante que se

manifestara en una mayor proporción de los casos, dado que encontramos tanto subexpresión como sobreexpresión en los genes involucrados con la apoptosis. Sin embargo llamó fuertemente la atención que alguna alteración de las caspasas por lo menos estuvo presente en 6 de los 10 pacientes estudiados, ya sea por que estuvo subexpresada ó sobreexpresada.

Las caspasas son importantes porque juegan un rol principal en la ejecución de la apoptosis celular, principalmente la caspasa 8 que pareciera llevar la iniciativa para activar el resto de la cascada de los mecanismos de muerte celular.⁵⁰ En la vía extrínseca de la apoptosis, la estimulación de los receptores de la muerte del TNF CD-95 (apo-1/Fas) ó TRAIL, permiten la activación del iniciador caspasa-8, que directamente se va a unir a la caspasa 3 ó alternativamente unirse al receptor de la vía mitocondrial por vía del BID. El BID es miembro de la familia del BCL-2 que activa a la mitocondria para desencadenar la apoptosis.^{51,52.}

En éste estudio lo que se pretendió fue estudiar de manera integral tanto desde el punto de vista clínico, como histológico y molecular a éstos tumores, con el fin de entender a fondo su comportamiento biológico y a futuro poder dirigir de una manera mas adecuada un tratamiento específico. Basados en que la evasión de la apoptosis es una característica de las malignidades en la infancia que contribuye a la carcinogénesis así como a la resistencia al tratamiento, se cree que el tener una apoptosis defectuosa en las células tumorales favorece la resistencia tumoral a los tratamientos empleados. Para éste punto las terapias blanco a la apoptosis se pueden dirigir directamente hacia las células cancerosas ó incrementar la respuesta de los tumores pediátricos a las terapias convencionales tanto de quimioterapia como de radioterapia.

La idea de activar éstos receptores de la muerte de la familia del TNF es atractiva por su aplicación médica, dado que estos receptores están involucrados en la muerte celular. En éste sentido, el oncogen TRAIL se ha considerado como el primer candidato ya que induce la apoptosis en las células cancerosas mientras las normales pasan desapercibidas.⁵³

En éste contexto, el encontrar éstos genes alterados en el presente estudio, cobra mas importancia. No pudimos encontrar una correlación directa entre alteración de la vías de apoptosis y sobrevida dado que el tamaño de la

muestra es pequeña, y en TODOS los tumores que estudiamos, encontramos una alteración en algunos de éstos genes, sin embargo, como ya se mencionó, se corrobora como muy importante y frecuente la identificación de la alteración de algunas de las caspasas, así como el gen TRAIL y BCL-2, y el poder continuar éste estudio nos permitirá ampliar mas la muestra y poder estudiar mas a fondo éstas líneas celulares con el objeto de poder ajustar y administrar tratamientos blanco mejor dirigidos.

CONCLUSIONES

La alteración en las vías de la apoptosis, ya sea extrínseca o intrínseca, va a favorecer la aparición de diferentes tipos de tumores además de contribuir a su resistencia a las terapias convencionales utilizadas hasta la fecha.

Es de suma importancia continuar determinando todos los genes involucrados y sus interacciones entre ellos mismos y en las distintas vías metabólicas para poder desarrollar tratamientos dirigidos que incrementen la sobrevida en estos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

- ¹ Gurney J, Smith M, Bunin G. CNS and miscellaneous intracranial and intraspinal neoplasms En: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG . Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995. NIH Pub No 99-4649. Bethesda MD: National Cancer Institute, SEER Program, 1999: 51-63.
- ² Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Morbilidad, regionalización 1993-1996 y mortalidad. Tendencias 1985-1995, México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología.1998.
- ³ Fajardo-Gutiérrez A, Navarrete-Martínez A, Reynoso-García M, et al. Incidence of malignant neoplasms in children attending Social Security Hospitals in Mexico City. *Med Pediatr Oncol.* 1997;29:208-212.
- ⁴ Mejia-Aranguré JM, Flores-Aguilar H, Juárez-Muñoz I, et al. Edad de aparición de los diferentes tumores malignos en la infancia. *Rev Med IMSS* 2005;43:25-37.
- ⁵ Kernohan JW, Mahoon RF, Stadification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1949;24:71-75.
- ⁶ Bailey P, Cushing H. A classification of the tumors of the gliomas group on a histogenetic basis with correlated study of prognosis. Philadelphia: JP Lippincott,1996.
- ⁷ Kernohan JW, Mahoon RF, Stadification of the gliomas. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1949;24:71-75.
- ⁸ Rorke LB, Gilles FH, Davis RL. Revision of the World Health Organization classification of brain tumors for childhood. *Cancer* 1985;56:1869-1886.
- ⁹ Starr A, Achar J. Brain system responses in neurologic disease. *Arch Neurol* 1975;32:761-768.
- ¹⁰ Halperin EC, Watson DM, George SL. Duration of symptoms prior to diagnosis is related inversely to presenting disease stage in children with medulloblastoma: A Pediatric Oncology Group study . *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:867-865.
- ¹¹ Omuro A, Leite C, Mokhtari K, Delattre J. Pitfalls in the diagnosis of brain tumours. *Lancet.* 2006;5:937-948.

-
- ¹² Yang P, Berger P, Cohen M. Computed tomography and childhood seizure disorders. *Neurology* 1979;29:1084-1088.
- ¹³ Bloom H. Prospects for increasing survival in children with medulloblastoma: Present and future studies. *Neurooncology* 1979;1: 245-260.
- ¹⁴ Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: A children Cancer Group randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13:1687-1696.
- ¹⁵ López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rivera-Márquez H, et al. Preirradiation ifosfamide, carboplatin and etoposide (ICE) for the treatment of high-grade astrocytomas in children. *Childs Nerv Syst* 2003;19:818-823.
- ¹⁶ Dohrmann GJ, Farewell JR, Flannery JT: Astrocytomas in childhood: A potential-based study. *Surg Neurol* 1985;23:64-68.
- ¹⁷ Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *NEJM* 2005;352:978-986.
- ¹⁸ Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: A children Cancer Group randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13:1687-1696.
- ¹⁹ López-Aguilar, Cerecedo-Díaz, Sepúlveda-Vildósola, et al. Astrocitomas en pediatría. Factores pronósticos y sobrevida. *Gac Méd Méx* 1996;133:231-235.
- ²⁰ Kleihues P, Burger PC and Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathol* 1993;3:255-268.
- ²¹ Muñoz J, Fan X, Inda MM, et al. Genética molecular de los astrocitomas. *ANALES Sis San Navarra* 2000;23:265-278.
- ²² Diedrich U, Lucius J, Bitterman HJ, et al. Loss of alleles in brain tumors: distributions and correlations with clinical course. *J Neurol* 1995;242:702-711.
- ²³ Figarella-Branger D, Coulibaly B, Quilchini B, et al. Histological and molecular classification of gliomas. *Rev Neurol* 2008;164:505-515.
- ²⁴ Armas-Pineda C, Arenas-Huertero F, Pérezpeña-Díazconti M, et al. Expression of PCAF, p300 and Gcn5 and more highly acetylated histone H4 in pediatric tumors. *J Exp Clin Cancer Res.* 2007 Jun;26(2):269-76.

-
- ²⁵ Chozik BS, Weicker MB, Pezullo JC, et al. Pattern of mutant p53 expression in human astrocytomas suggest the existence of alternate pathway of tumorigenesis. *Cancer* 1994;73:404-415.
- ²⁶ Van de Kelft E. Molecular pathogenesis of astrocytoma and glioblastoma multiforme. *Acta Neurochir Wien* 1997;139:589-599.
- ²⁷ Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T, et al. Pediatric Intracranial Ependymomas: Prognostic Relevance of Histological, Immunohistochemical and Flow Cytometric Factors. *Mod Pathol* 2003; 16: 980-991
- ²⁸ Carter M, Nicholson J, Ross F, et al. Genetic Abnormalities Detected in Ependymomas by Comparative Genomic Hybridization. *British J of Cancer* 2002; 86: 929- 939
- ²⁹ Korshunov A, Neben K, Wrobel G, et al. Gene Expression Patterns in Ependymomas Correlate with tumor location, grade and patient age. *Am J Pathol* 2003; 163: 1721-27
- ³⁰ Kramer DL, Parmiter AH, Rorke LB, et al. Molecular Cytogenetic Studies of Pediatric Ependymoma. *J Neurooncol.* 1998; 37: 25-33
- ³¹ Biegel JA. Genetics of Pediatric Central Nervous System Tumors. *J Pediatr Hematol Oncol* 1997; 19 (6): 492-501
- ³² Nakamura M, Shimada K, Ishida E, et al. Molecular pathogenesis of pediatric astrocytic tumors. *Neuro.Oncology* 2007;9:113-123.
- ³³ Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 2005;64:479-489.
- ³⁴ Louis DN. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol* 1997;7:755-764.
- ³⁵ Collins VP. Progression as exemplified by human astrocytic tumors. *Semin. Cancer Biol* 1999;9:267-276.
- ³⁶ Martinetto H. Aspectos y aplicaciones de la biología molecular en tumores del sistema nervioso central. *Arch Neurol Neuroc Neuropsiquiatr* 2008;15:17-24.
- ³⁷ Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumor-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* 2002;2:420-430.
- ³⁸ Thornberry NA, Lazebnik Y. Caspases: enemies within. *Science* 1998;281:1312-1316.

-
- ³⁹ Lavrik IN, Golks A, Krammer PH. Caspases: pharmacological manipulation of cell death. *J Clin Invest* 2005;115:2665-2672.
- ⁴⁰ Reed JC, Huang Z. Apoptosis pathways and drug targets. *Nature Rev Drug Discov* 2004;3:895-910.
- ⁴¹ Ghobrial IM, Witzig TE and Adjei AA. Targeting apoptosis pathways in cancer therapy. 2005;55:178-194.
- ⁴² Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis* 2000;21:485-495.
- ⁴³ Ellis RE, Yuan J, Horvitz HR. Mechanisms and function of cell death. *Annu Rev Biol* 1991;7:663-672.
- ⁴⁴ Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning. A laboratory manual*. Second edition. CSH.
- ⁴⁵ Kelmansky D. Aspectos estadísticos de microarreglos. 2007. En [www.dm.uba.ar/materias/optativas/aspectos estadisticos de microarreglos/2007/2/teoricas/Charla.ppt](http://www.dm.uba.ar/materias/optativas/aspectos%20estadisticos%20de%20microarreglos/2007/2/teoricas/Charla.ppt)
- ⁴⁶ Jorge, R. Marcado de RNA total- Purificación columnas Qiagen_ NaOH. Unidad de Microarreglos de DNA, UNAM.
- ⁴⁷ Jorge, R. Protocolo para hibridizar los microarreglos con SSC 5X/ SDS 0.1%. Unidad de Microarreglos de DNA, UNAM.
- ⁴⁸ Fulsa S, Debatin KM. Extrinsic versus intrinsic apoptosis pathways in anticancer chemotherapy. *Oncogene* 2006;25:4798-4811.
- ⁴⁹ Fulda S. Exploiting apoptosis pathways for the treatment of pediatric cancers. *Pediatr Blood Cancer* 2009;53:533-536.
- ⁵⁰ Degterev A, Boyce M, Yuan J. A decade of caspasas. *Oncogene* 2003;22:8543-8567.
- ⁵¹ Walczak H, Krammer PH. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis system. *Exp Cell Res* 2000;256:58-66.
- ⁵² Adams JM, Cory S. The BCL-2 apoptotic switch in cáncer development and therapy. *Oncogene* 2007;26:1324-1337.
- ⁵³ Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2008;19:325-331.

ANEXO I

HOJA DE RECOLECCIÓN DE DATOS

Nombre	
Afiliación	
Sexo	
Diagnóstico	
Edad al diagnóstico	_____ meses.
Fecha de diagnóstico	
Fecha de última consulta.	
Fecha de recaída	
Fecha de defunción	
Meses de sobrevida	
Localización de la tumoración	Supratentorial _____ Tallo cerebral _____ Cerebelo _____
Porcentaje de resección.	Biopsia _____ Resección parcial _____ Resección total _____
IRM basal	_____ Cm2
IRM post 2	_____ Cm2
IRM post 4	_____ Cm2
Esquema de quimioterapia utilizado.	ICE _____ Carbo/VCR _____
Radioterapia	Si _____ no _____
Apoptosis	Normal _____ subexpresada _____

ANEXO II

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

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

Nombre del paciente _____ Edad _____
No de afiliación _____

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

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

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

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

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

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

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

Nombre y firma del testigo

Nombre y firma de Padre/Madre o tutor

Nombre y firma del testigo

Fecha

Hora

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

Nombre y firma del médico

Fecha

Hora

ANEXO III Función de los diferentes genes que se encontraron involucrados en las vías de la apoptosis de los 10 pacientes con astrocitoma.

BID/Bid (cromosoma 22)	Se trasloca a la membrana externa de la mitocondria y permite la salida del <i>citocromo c</i> . Es un mediador de daño mitocondrial inducido por la <i>CASP8</i> , rompe esta proteína codificada, y el COOH-terminal se traslada a las mitocondrias donde se produce la liberación del <i>citocromo c</i> . Contrarresta el efecto protector de <i>Bcl-2</i> .
CASP8 (cromosoma 2)	Caspasa mediadora de la ruta extrínseca, activa <i>Bid</i> . Esta proteína está implicada en la muerte celular programada inducida por Fas y diversos estímulos apoptóticos. La N-terminal de FADD-como dominio efector de muerte de esta proteína sugiere que puede interactuar con la interacción proteína Fas FADD. Esta proteína se detectó en la fracción insoluble de la región del cerebro afectada de pacientes con enfermedad de Huntington, pero no en los de los controles normales, lo que implicó el papel en las enfermedades neurodegenerativas.
PKA/PRKACA (cromosoma 19)	Proteína quinasa dependiente, que transduce la señal a través de la fosforilación de un gran número de sustratos tanto en el núcleo como en el citoplasma. La proteína codificada por este gen es una de las subunidades reguladoras. Media la asociación de la membrana mediante la unión a las proteínas de anclaje, incluyendo la quinasa MAP2.
APAF1 (cromosoma 12)	Proteína citosólica que interacciona con el <i>citocromo-c</i> , dATP y <i>procaspasa-9</i> formando el apoptosoma, complejo que activa a las caspasas ejecutoras.
BCL-2 (cromosoma 18)	Proteína anti-apoptótica (pueden bloquear o activar la apoptosis), regula la muerte celular por la vía intrínseca mitocondrial. Regula la muerte celular mediante el control de la permeabilidad de la membrana mitocondrial. Inhibe la actividad de la caspasa, ya sea por impedir la liberación de <i>citocromo c</i> de la mitocondria y / o por la unión al factor activador de proteasas apoptóticas (<i>Apaf-1</i>).
CASP10 (cromosoma 2)	Desempeña un papel central en la fase de ejecución de la apoptosis celular. Existe como proenzima inactiva que al someterse a una transformación proteolítica, conserva residuos aspártico y produce dos subunidades, que dimerizan para formar la enzima activa. Esta proteína se adhiere y activa las <i>caspasas 3</i> y <i>7</i> , y la propia proteína es procesada por la <i>caspasa 8</i> .
CASP3 (cromosoma 4)	Esta proteína se adhiere y activa a las <i>caspasas 6, 7 y 9</i> , y la propia proteína es procesada por las <i>caspasas 8, 9 y 10</i> .
CytC/CYCS (cromosoma 7)	Cofactor necesario para la función de <i>Apaf-1</i> . Participa en la cadena de transporte electrónico entre los complejos III y IV de la cadena respiratoria mitocondrial. Reprende la activación de los miembros pro- apoptóticos de la familia de <i>Bcl-2</i> y conduce a la alteración de la permeabilidad de la membrana mitocondrial.
FLIP/CFLAR/CASP8AP1 (caspasa 2)	Proteína que tiene un dominio efector de muerte que interacciona con caspasas regulando la actividad de las mismas. Bloquea la apoptosis mediada por receptores de muerte.
FNT/FNTa (cromosoma 6)	Citocina secretada principalmente por los macrófagos, se une y funciona a través de sus receptores TNFRSF1A/TNFR1 y TNFRSF1B/TNFR. Esta citocina esta involucrada en la regulación de un amplio espectro de procesos biológicos incluyendo la proliferación celular, diferenciación, apoptosis, metabolismo lipídico y coagulación. Puede inducir la muerte celular de líneas celulares de ciertos tumores.
TRAIL/TNFSF10 (cromosoma 3)	La proteína codificada por este gen es una citocina que pertenece a la familia del factor de necrosis tumoral (TNF). Este receptor es activado por el ligando inductor de apoptosis relacionado al TNF y es cuando traduce la señal de muerte celular e induce la apoptosis.
IL-1/IL1A (cromosoma 2)	Esta citocina es producida por los monocitos y los macrófagos como una proproteína, la cuál es procesada proteolíticamente en respuesta a daño celular e induce la apoptosis.
IRAK/IRAK3 (cromosoma 12)	Inhibe la disociación de IRAK1 e IRAK4 del del complejo de señalización Toll-like.
TP53 (cromosoma 17)	Fosfoproteína pro- apoptótica que se activa ante la presencia de mutaciones del DNA, actuando en la fase G1 del ciclo celular. Controla la reparación de lesiones del DNA efectuado por polimerasas específicas, (contribuye a frenar el ciclo en tales circunstancias) y es capaz de detectar células neoplásicas agresivas frenando su capacidad de producir angiogénesis para facilitar las metástasis. Su papel es frenar el ciclo destruyendo células mediante la apoptosis antes de llegar a la etapa de síntesis a fin de impedir que se repliquen mutaciones carcinogénicas, que producirán nuevas cepas tumorales cada vez más agresivas. La inducción de la apoptosis parece estar mediada por la estimulación de los antígenenos de expresión BAX y FAS o por represión de la expresión de <i>Bcl-2</i> .
RIP1/RIPK1 (cromosoma 6)	Promueve la apoptosis y la activación de la <i>NF-kappa-B</i> , requiere para su activación al TNFRSF1A.
TrkA/NTRK1 (cromosoma 1)	Este gen codifica a un miembro receptor neurotrófico de la familia de la tirosina quinasa (NTRK). Esta quinasa es un receptor de membrana que se fosforila así mismo y a los miembros de la MAPK. La presencia de esta quinasa conduce a la diferenciación celular y puede desempeñar un papel en la especificación de subtipos de neuronas sensoriales. Las mutaciones en este gen se han asociado a insensibilidad congénita al dolor, anhidrosis, retraso mental y cáncer.
P13K/PIK3R5	Se activa por una variedad de receptores de factores de crecimiento. La ruta de señalización <i>PI3K/Akt</i> regula la proliferación celular, la apoptosis y factores transcripcionales. Se cree que la proteína desempeña un papel fundamental en la regulación de la citotoxicidad de las células NK. El gen se localiza en un segmento común suprimido del cromosoma 7, previamente identificado en leucemias mieloides.

Cn/CHP (cromosoma 15)	Proteína fosfatasa dependiente de la calcineurina, está involucrado en una amplia gama de actividades biológicas, actuando como calcio-dependiente estimulada por la proteína fosfatasa.
CAPN1/Calpain (cromosoma 11)	Son proteasas neutras activadas por calcio, son no lisosomales, proteasas intracelulares de cisteína. Están involucradas en la remodelación del citoesqueleto y en la transducción de señal.
IAP/BIRC2 (cromosoma 11)	Supresor apoptótico. La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de proteínas que inhibe la apoptosis mediante la unión a los receptores del factor de necrosis tumoral asociada a factores TRAF1 y TRAF2.
IκBa/NFKBIA (cromosoma 14)	Inhibe la actividad de los complejos diméricos NF-kappa-B/REL atrapando dímeros en el citoplasma a través de enmascaramiento de sus señales de localización nuclear. En la estimulación de la respuesta inmune celular y proinflamatorias, se fosforila y activa la transcripción.
JNK	Cinasa activada en respuesta de estrés. Fosforila e inactiva a miembros anti- apoptóticos. Activa a los pro-apoptóticos de la familia <i>Bcl-2</i> .
DFF 45 (cromosoma 1)	Proteína que mantiene inhibida la desoxinucleasa responsable de la degradación del DNA durante la apoptosis. Es una de las dianas de las caspasas.
ENDOG (cromosoma 9)	La proteína codificada por este gen es una endonucleasa mitocondrial. Se trasloca al núcleo tras la liberación y está involucrada en la fragmentación del DNA junto con exonucleasas y DNasa I, produciendo apoptosis.
AKT-1 (cromosoma 14)	Es activado por el factor de crecimiento derivado de las plaquetas. En el desarrollo del SNC es un mediador crítico del factor de crecimiento inductor de supervivencia neuronal. Los factores de supervivencia pueden suprimir la apoptosis.
AKT3/PB (cromosoma 1)	Cinasa de supervivencia y mediador de <i>PI3K</i> . Puede fosforilar el centro activo de la <i>caspasa 9</i> inhibiendo su función.
TRADD (cromosoma 16)	La proteína codificada por este gen es un dominio de muerte que contiene una molécula adaptadora que interactúa con TNFRSF1A/TNFR1 y media la muerte celular programada señalizando y activando NF-kappaB.
IRAK4 (cromosoma 12)	Se une a IL-1R provocando cascadas de señalización intracelular que conduce a la transcripción sobre-regulación y la estabilización de RNAm.
VEGF (cromosoma 6)	Es miembro de la familia de factores de crecimiento PDGF/VEGF, la proteína es un mitogeno glucosilado que actúa en las células endoteliales y tiene varios efectos como incrementar la permeabilidad vascular, inducir angiogénesis, vasculogénesis y crecimiento celular endotelial, promueve la migración celular e inhibe la apoptosis.
IRAK2 (cromosoma 3)	Se une a IL-1R provocando cascadas de señalización intracelular que conduce a la transcripción sobre-regulación y la estabilización de RNAm.
FABP7 (cromosoma 6)	La proteína codificada por este gen es una proteína de unión de los ácidos grasos, juega un papel en el metabolismo y transporte de los ácidos grasos.
EGFR (cromosoma 7)	La proteína codificada por este gen es una glucoproteína transmembrana que es miembro de la superfamilia de kinasas. Esta proteína es un receptor para miembros de la familia de factores de crecimiento epidérmico. Posterior a la activación, ocurre la fosforilación de sustratos citoplasmáticos y se inicia una cascada de señalización que deriva en múltiples respuestas celulares como cambios en la expresión génica, rearrreglos del citoesqueleto, anti-apoptosis e incremento en la proliferación celular.
SEMA5A (cromosoma 5)	Gen involucrado en la guía axonal durante el desarrollo neural.
PTPRZ1 (cromosoma 7)	Se cree esta involucrado en la regulación de diferentes procesos de desarrollo del sistema nervioso central.
THBS1 (cromosoma 15)	La proteína codificada por este gen es una glucoproteína de adhesión que media la interacción célula-célula y célula-matriz. Esta proteína parece tener un papel en la agregación plaquetaria, angiogénesis y tumorigénesis.
OLIG1 (cromosoma 21)	Promueve la formación y maduración de oligodendrocitos.
SERPINA3 (cromosoma 14)	La proteína codificada por este gen es una proteasa plasmática inhibitoria. Su función no es clara.
CAMK2A (cromosoma 5)	El producto de este gen pertenece a la familia de kinasas serina/treonina y a la subfamilia de kinasas dependientes de Ca(2+)/calmodulina. Tienen numerosas funciones celulares e influyen en procesos tan diversos como la transcripción de genes, supervivencia celular, apoptosis, reorganización del citoesqueleto y memoria.
TIMP1 (cromosoma X)	La proteína codificada por este gen es un inhibidor natural de las matriz.metaloproteinasas, un grupo de peptidasas involucradas en la degradación de la matriz extracelular, además de ser capaces de promover la proliferación celular de varios tipos celulares y también tienen una función antiapoptótica.
TGFB2 (cromosoma 1)	La familia de factores de crecimiento transformadores están involucrados en la regulación de procesos celulares que incluyen la división celular, diferenciación, motilidad, adhesión y muerte.
TGFB1 (cromosoma 19)	Este gen codifica a miembros de la familia de citoquinas del factor de crecimiento transformador beta, que son péptidos multifuncionales que regulan la proliferación celular, diferenciación, adhesión y migración.
IGFBP4 (cromosoma 17)	Este gen es miembro de la familia de factores de crecimiento parecidos a la insulina.
IGFBP2 (cromosoma 2)	Este gen es miembro de la familia de factores de crecimiento parecidos a la insulina.

S100A4 (cromosoma 1)	Esta involucrado en la regulación procesos celulares como la progresión del ciclo celular y diferenciación. Los rearrreglos cromosómicos y expresión alterada de este gen se ha implicado en las metástasis tumorales.
MBP1/TRAPPC2 (cromosoma X)	Juega un papel en el transporte de vesículas del retículo endoplasmico al aparato de Golgi.
BCAN (cromosoma 1)	Juega un papel en el desarrollo postnatal del sistema nervioso. Parece estabilizar interacciones entre el ácido hialurónico y los proteoglicanos cerebrales.
CD63 (cromosoma 12)	La proteína codificada por este gen es una glucoproteína de superficie y se ha asociado con la progresión tumoral.
YBX1 (cromosoma 1)	Regula la transcripción de numerosos genes, tiene un papel en la reparación del DNA.
ARHE (cromosoma 2)	Regula la organización de citoesqueleto de actina en respuesta a factores de crecimiento extracelulares.
TOP2A (cromosoma 17)	Este gen codifica una topoisomerasa de DNA.
Ki67/MKI67 (cromosoma 10)	Codifica una proteína nuclear necesaria para la proliferación celular.
PRKCB1 (cromosoma 16)	La proteína codificada por este gen esta involucrada en diversas vías de señalización celular y tiene distintas funciones como son la activación de células B, inducción de apoptosis, proliferación endotelial.
MLC1 (cromosoma 1)	La proteína codificada por este gen pertenece a la familia Bcl-2. El gran producto génico (isoforma 1) permite la supervivencia celular inhibiendo la apoptosis, mientras que el pequeño producto génico (isoforma 2) promueve la apoptosis.
BMP2 (cromosoma 20)	La proteína codificada por este gen pertenece a la superfamilia de factor de crecimiento transformador beta.
NTRK2 (cromosoma 9)	Este gen codifica un miembro de la familia de receptores neurotrofos de tirosincinasa. Fosforila miembros de la vía MAPK permitiendo la diferenciación celular. Los distintos miembros de esta familia tienen diversas funciones, y el TrkB participa en la apoptosis de las neuronas del SNC.
DFF45/DFFA (cromosoma 1)	La apoptosis es un proceso de muerte celular que remueve células inútiles o tóxicas durante el desarrollo de los mamíferos. El proceso apoptótico se acompaña de fragmentación celular y nuclear y degradación de los cromosomas en unidades nucleosomales, el DFF (factor de fragmentación de DNA) es una proteína heterodimerica de 40-kD(DFFB) y 45-kD(DFFA). La DFFA es sustrato de la caspasa 3 y dispara la fragmentación del DNA durante la apoptosis.
DES (cromosoma 2)	Este gen codifica un filamento músculo específico clase III.
FOXP1 (cromosoma 14)	Este gen pertenece a la familia de factores de transcripción, su función específica no se ha determinado; pero juega un papel en el desarrollo del cerebro.
MAPK1 (cromosoma 22)	La proteína codificada por este gen es miembro de la familia de cinasas MAP, actúan como un punto de señalización y esta involucrado en una gran variedad de procesos celulares como son la proliferación, diferenciación, regulación de la transcripción y desarrollo.
CCNA1 (cromosoma 13)	La proteína codificada por este gen pertenece a la familia de ciclinas, las cuales funcionan como reguladoras de las cinasas CDK. Están involucradas en el control del ciclo celular.
SPINT2 (cromosoma 19)	Este codifica una proteína transmembrana.