



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**INSTITUTO NACIONAL DE NEUROLOGÍA Y
NEUROCIRUGÍA "DR. MANUEL VELASCO SUÁREZ"**

**ESTANDARIZACIÓN DE UN BANCO DE DNA DE TUMORES DEL
SISTEMA NERVIOSO QUE OBTENGA MATERIAL DE ÓPTIMA
CALIDAD, NECESARIO PARA LLEVAR A CABO ESTUDIOS DE
BIOLOGÍA MOLECULAR QUE COADYUVEN AL DIAGNÓSTICO
Y PRONÓSTICO CLÍNICO DE ESTAS NEOPLASIAS**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN NEUROCIRUGÍA**

PRESENTA

DR. DIEGO MÉNDEZ ROSITO

TUTORA:

DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ



MÉXICO D.F.,

JUNIO 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

DR. RICARDO COLIN PIANA
Director de Enseñanza
Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

DR. JUAN LUIS GÓMEZ AMADOR
Subdirección de Neurocirugía
Profesor Titular del Curso

DRA. MA. LUCINDA AGUIRRE CRUZ
Subdirección de Investigación
Tutora de Tesis

Coautores

Dr. Edgar Rangel López

Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología

INNN

A mi esposa Ana Lucía y mis hijos José Pablo y Santiago

por ser mi inspiración.

A mis padres

por todo su apoyo.

Sin ustedes esto no sería posible

ÍNDICE DE CONTENIDO

I.	ABSTRACT	1
II.	RESUMEN	2
III.	INTRODUCCIÓN	3
IV.	JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN	4
V.	OBJETIVO	4
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	4
	1. Recolección, transporte y almacenamiento de las muestras	4
	2. Extracción y purificación del DNA de los tumores y de células sanguíneas	7
VII.	RESULTADOS	9
VIII.	DISCUSION	14
IX.	CONCLUSIONES	17
X.	REFERENCIAS	18
XI.	ANEXOS	23

I. ABSTRACT

Introduction: Brain tumors are one of the leading cancers worldwide; in the INNN these are the leading cause of morbimortality. Their histopathologic diagnosis in some cases may be difficult. Actually in Mexico there are no routine biologic studies done, in order to start them it's necessary to create international quality controlled biobanks. Having these tissues allows performing biologic markers studies in the Mexican population, which will help the diagnosis and prognosis of these tumors.

Materials and methods: With a previously signed surgical consent, a tumor and blood biopsy was done to 134 patients. Their DNA was extracted and a database was filled considering technical, ethical and legal aspects. In order to have optimal biologic material the procedure was standardized between the surgical team and research laboratory.

Results: The biopsy, transportation, processing and storage were standardized. 134 patients were included (67 men and 67 women) with an average age of 46 years (range 15-81). The most frequently biopsied tumor was the meningioma (42%). The integrity of the obtained material was determined by agarose gel electrophoretic analysis.

Conclusion: The INNN biobank has a standardized system that biopsies, processes and stores optimum quality biologic material that will be the basis of future molecular studies.

II. RESUMEN

Introducción: Los tumores cerebrales figuran entre las primeras causas de cáncer a nivel mundial, en el INNN constituyen la primera causa de morbimortalidad. El diagnóstico histopatológico de algunos tumores cerebrales es difícil por su elevada heterogeneidad. En México no existen estudios moleculares de rutina, por lo que es necesario implementar biobancos con material biológico óptimo que permitan llevar a cabo estudios confiables de marcadores moleculares asociados a tumores cerebrales específicos en la población mexicana, que coadyuvarán al diagnóstico y pronóstico de estas neoplasias.

Materiales y métodos: Previo consentimiento informado, se obtuvieron biopsias de tumores cerebrales y sangre de 134 pacientes. Se extrajo el DNA de los tumores y de las células sanguíneas, se elaboró una base de datos con el registro de los datos generales y clínicos de los pacientes, en base a los estándares internacionales para la creación de Biobancos (aspectos técnicos, éticos y legales). Se estandarizó el procedimiento de obtención de material biológico en coordinación con el quirófano y el laboratorio, a fin de contar con material biológico óptimo.

Resultados: Se estandarizó la toma de biopsia, transporte, procesamiento y almacenamiento de las muestras. Se incluyó 134 pacientes (67 hombres y 67 mujeres) con una edad promedio de 46 años (rango 15-81). El tumor más frecuente fue el meningioma (42%). La integridad del material obtenido se determinó mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 1%.

Conclusión: El biobanco INNN ya cuenta con un sistema estandarizado para la obtención de muestras biológicas de óptima calidad para realizar estudios moleculares.

III. INTRODUCCION

Los tumores cerebrales representan la neoplasia sólida más frecuente en niños y la séptima causa de morbilidad en adultos. La mortalidad mundial por cáncer muestra un claro patrón ascendente y México no es la excepción a esta tendencia, habiéndose registrado cuatro veces más defunciones por neoplasias malignas en el 2000 que en el año 1992. Los tumores cerebrales representan la décima causa de muerte por cáncer en México, siendo las neoplasias cerebrales más frecuentes, las de mayor malignidad. En el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (INNN) se operan alrededor de 10-15 tumores del SNC por semana, siendo esta patología la primera causa de internamiento.¹

El diagnóstico de un tumor cerebral se basa fundamentalmente en el análisis histopatológico, pero los avances actuales en biología molecular empiezan a identificar marcadores que coadyuvan al diagnóstico certero y al establecimiento del pronóstico de los tumores malignos. En la actualidad, no existen estudios de la caracterización de las alteraciones moleculares de los tumores cerebrales en mexicanos.^{2,3,4}

El desarrollo de este trabajo, permitió la estandarización de las condiciones óptimas para el establecimiento de un banco de DNA de tumores cerebrales, de acuerdo a los lineamientos internacionales (éticos, biológicos y legales) que aseguran la obtención de material biológico de óptima calidad. Estos resultados, servirán de base para la realización rutinaria de diagnóstico molecular y para el desarrollo de estudios de investigación dirigidos a la caracterización de alteraciones moleculares específicas en pacientes mexicanos, lo cual coadyuvará al establecimiento de diagnósticos certeros, inferencias pronosticas y al desarrollo de mejores estrategias terapéuticas.^{5,6}

IV. JUSTIFICACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

No hay estudios de caracterización de alteraciones moleculares en tumores cerebrales de mexicanos, por lo que el establecimiento de un banco de tumores del sistema nervioso en México fomentará la búsqueda de marcadores genéticos diagnósticos y pronósticos.

V. OBJETIVO

Estandarizar las condiciones óptimas para crear el biobanco de DNA de tumores cerebrales del INNN que cuente con el rigor necesario para el desarrollo de estudios de biología molecular.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Con la finalidad de crear un biobanco de tejido tumoral en el Instituto que cumpliera con los estándares internacionales de bioseguridad, ética y aspectos técnicos, primeramente se obtuvo el consentimiento informado de los pacientes a quienes se les explicó la naturaleza y objetivo de este estudio.(Ver Anexo 1) Se obtuvieron muestras biológicas (biopsias de tumores y sangre), que se procesaron para obtención de DNA y criopreservación para estudios de inmunohistoquímica y se elaboró una base de datos con los datos clínicos y de laboratorio de cada paciente que aceptó donar muestras.

Recolección, transporte y almacenamiento de las muestras

Se realizaron sesiones informativas entre el personal involucrado en las áreas de Neurocirugía, Enfermería y el Laboratorio de Neuroinmunoendocrinología de este Instituto, con la finalidad de dar a conocer la logística del proceso de recolección, transporte y procesamiento de las muestras.

Se estableció un calendario de los días en que se colectó muestra. El Neurocirujano en turno se comunicó a primera hora de la mañana al laboratorio avisando acerca de la muestra. En el laboratorio se prepararon al momento 30 ml de paraformaldehído (PFA) al 2% en tubos de 50 ml y se llevaron al quirófano junto con un tanque pequeño con nitrógeno líquido y criotubos suficientes para cada muestra.

Durante la cirugía se tomó una biopsia del tejido tumoral suficiente para colocar muestra en un tubo con PFA 2% y en un criotubo perfectamente rotulados. Los tubos con PFA se colocaron en una gradilla y los criotubos se colocaron en el tanque con nitrógeno líquido. Simultáneamente, se tomó la muestra de sangre con los datos del paciente escritos en un tubo recolector. En este momento, la enfermera de quirófano se comunicó de nuevo al laboratorio de Neuroinmunoendocrinología para recoger las muestras. Dichas biopsias se recogieron y se transportaron de inmediato al laboratorio. Las muestras sanguíneas se almacenaron hasta por 24 horas a 4 °C, mientras que las muestras de tejido se almacenaron inmediatamente en nitrógeno líquido para preservar de manera óptima el material biológico.

Las muestras de tejido colocadas en los tubos con PFA 2% se dejaron 12 horas en refrigeración para una adecuada fijación y posteriormente se cambió la solución del fijador por una solución de sacarosa al 20% por un periodo de 12 horas. Transcurrido este tiempo, se retiró el exceso de líquido de las muestras, se obtuvieron piezas pequeñas y se impregnaron en TissueTek®, las cuales se introdujeron 45 segundos en isopentano enfriado con nitrógeno líquido para congelarlas. Las muestras debidamente etiquetadas se almacenaron inmediatamente a -70°C en nitrógeno líquido hasta su uso para ensayos de inmunohistoquímica. (Ver figura 1)

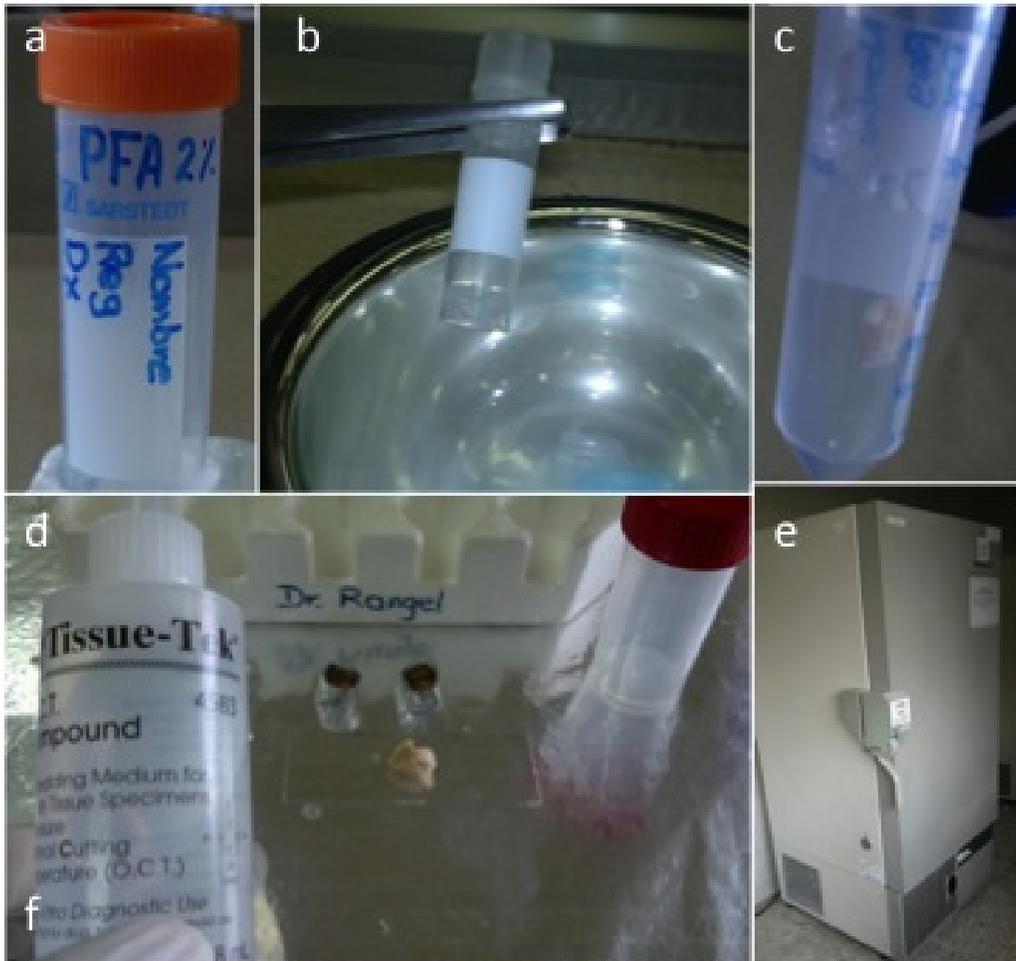


Figura 1. Procedimiento de recolección y conservación de tumores del SNC. Las muestras se depositan en un frasco con 30cc de PFA 2% (a) y en un criotubo transportado en un tanque con nitrógeno líquido (b) y se procesan para congelarse y almacenarse (c-e).

Extracción y purificación del DNA de los tumores y de células sanguíneas

El método consistió en la lisis de 8 ml de sangre o aproximadamente 250 mg de tejido tumoral mantenido en nitrógeno líquido y homogenizado previamente en fragmentos pequeños. Posteriormente se agregaron 4 volúmenes del reactivo de lisis, se agitó por inversión 4 min y se centrifugó a 2,400 rpm por 5 min. Se adicionaron 2 ml del reactivo B y 500 µl de perclorato de sodio para precipitar proteínas. La mezcla se agitó suavemente por inversión y se agregaron 2 ml de cloroformo para eliminar lípidos y proteínas. Se adicionaron 300 µl de resina para purificar el DNA y se centrifugó 3 min a 2,400 rpm. Posteriormente se tomó con mucho cuidado el sobrenadante sin contaminantes de la interfase y se colocó en un tubo nuevo de 15 ml para añadir seguidamente 10 ml de etanol absoluto. Se centrifugó 5 min a velocidad máxima y la pastilla resultante se lavó dos veces con etanol al 70%. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar para finalmente resuspenderla en 250 µl de agua libre de nucleasas (Nucleon HT Genomic DNA Extraction Kit, Amersham Biosciences Corp ®) (Ver figura 2).

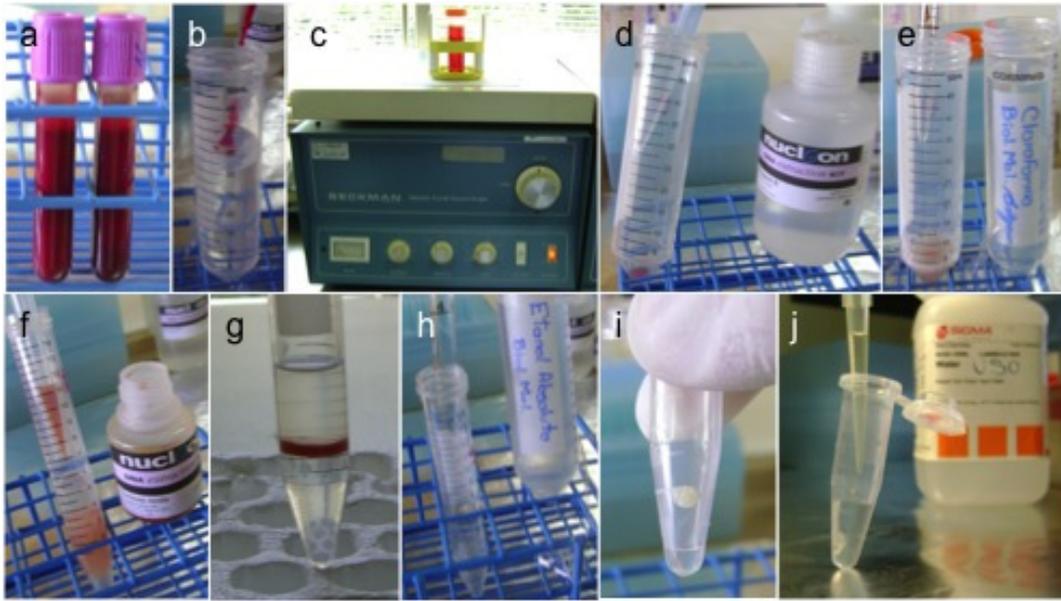


Figura 2. Extracción y purificación de DNA. Se lisaron 8 ml de sangre (a) agregando 4 volúmenes del reactivo de lisis (b). Se agita por inversión por 4 min y se centrifuga por 5 min (c). Se adicionaron 2 ml del reactivo B y 500 μ l de perclorato de sodio (d). La mezcla se agitó suavemente y se agregó 2ml de cloroformo (e). Luego se adicionaron 300 μ l de resina (f) y se centrifugó. Se tomó el sobrenadante de la interfase (g) y se colocó en un tubo nuevo para añadirle 10 ml de etanol absoluto (h). Se centrifugó 5 minutos a velocidad máxima y la pastilla resultante (i) se lavó dos veces con etanol al 70%. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para finalmente suspenderla en agua libre de nucleasas (j).

La concentración y pureza del DNA purificado se determinó por ($DO_{260/280nm}$) y la integridad del material obtenido se determinó mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 1%, los cuales se corrieron 30 minutos a 90 V.

VII. RESULTADOS

Se obtuvo el consentimiento informado de 134 pacientes que aceptaron participar en el estudio y se integraron sus datos clínicos en una base de datos con la información básica necesaria (número de expediente, iniciales, género, edad, diagnóstico transoperatorio e histopatológico confirmado, fecha de cirugía, muestras de tumores y de sangre, concentración de DNA y fecha).

Durante las cirugías de los 134 pacientes el mismo neurocirujano (DMR) formó parte del equipo quirúrgico con el objetivo de garantizar una adecuada toma de biopsia y procesamiento. Según el tipo de tumor fue el tamaño de la muestra. En todas las muestras se obtuvo suficiente tejido para procesarlas con técnica y calidad óptima. Inmediatamente después de tomar la biopsia se transportó la muestra fuera del campo quirúrgico para ser captada por el auxiliar en tres frascos. El primero, se destinó para el estudio histopatológico a cargo del Departamento de Patología del INNN; en el segundo tubo, la muestra se fijó con PFA al 2% para estudios de inmunohistoquímica; y el tercero, se colocó en un criotubo y se congeló inmediatamente en nitrógeno líquido para la posterior extracción de DNA. Simultáneamente se obtuvieron 8 cc de sangre venosa periférica para obtener el DNA control. Al tener estas muestras completas se transportaron inmediatamente al laboratorio para su procesamiento y almacenamiento respectivo.

En las figuras 3 y 4 se detalla el resultado del análisis electroforético en geles de agarosa al 1% de las 134 muestras.

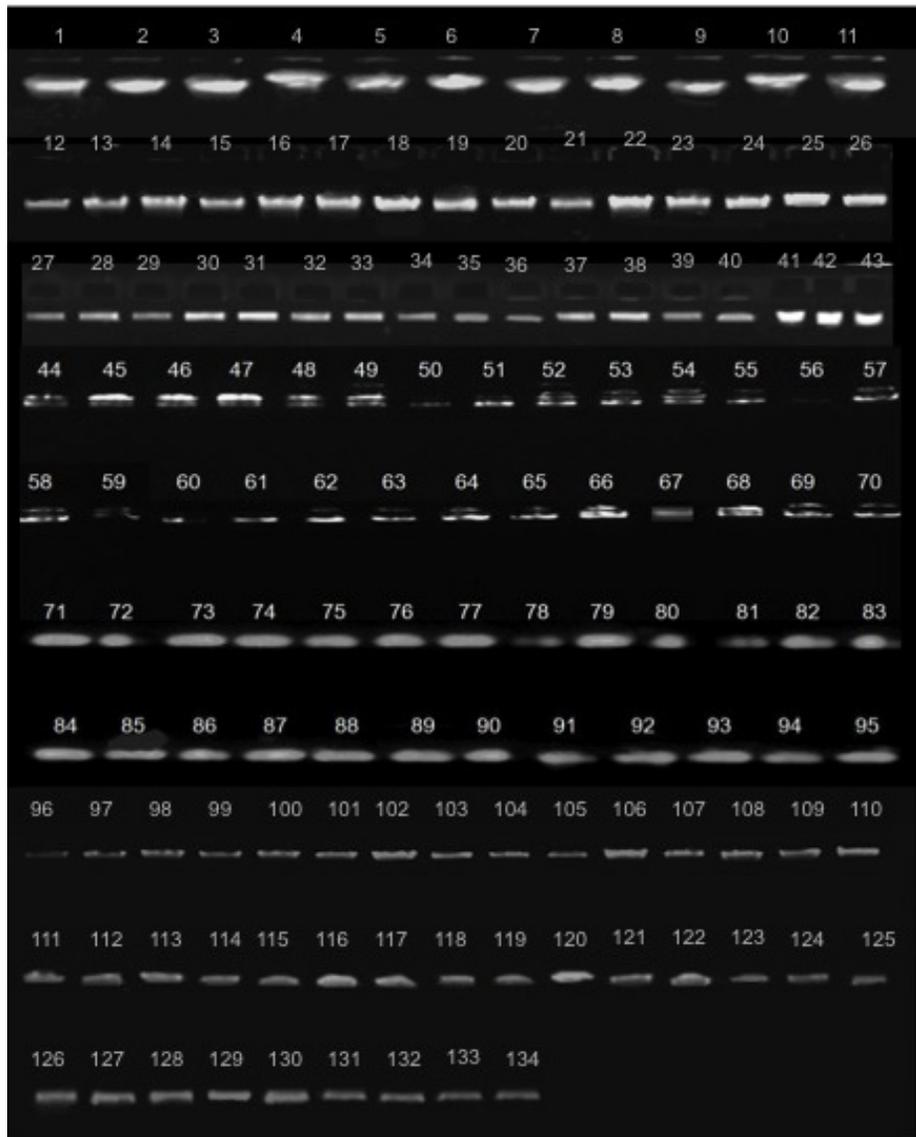


Figura 3. Análisis de la extracción del DNA de los 134 controles de células sanguíneas corridas electroforéticamente en geles de agarosa al 1%.

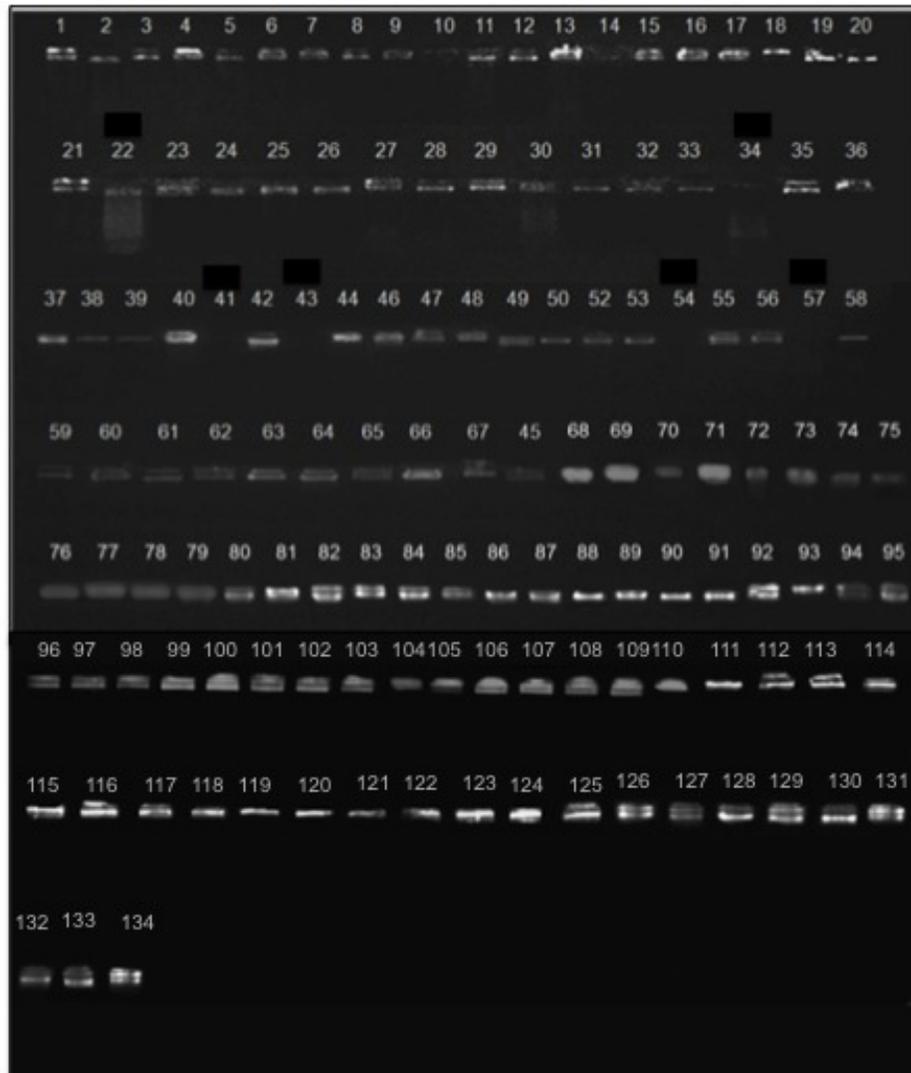


Figura 4. Análisis de la extracción del DNA de las 134 muestras tumorales corridas electroforéticamente en gels de agarosa al 1%.

El 50% de las biopsias recolectadas fueron de sexo masculino (67 casos) y el resto de sexo femenino (67 casos). La edad promedio fue de 46.28 años con un rango de 15-81 años.

Se clasificaron los diagnósticos histopatológicos de los tumores según la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Como detalla la figura 5 los tipos más frecuentes de tumores que se encontraron fueron aquellos originados de las células de las meninges, neuroepiteliales y de la hipófisis.

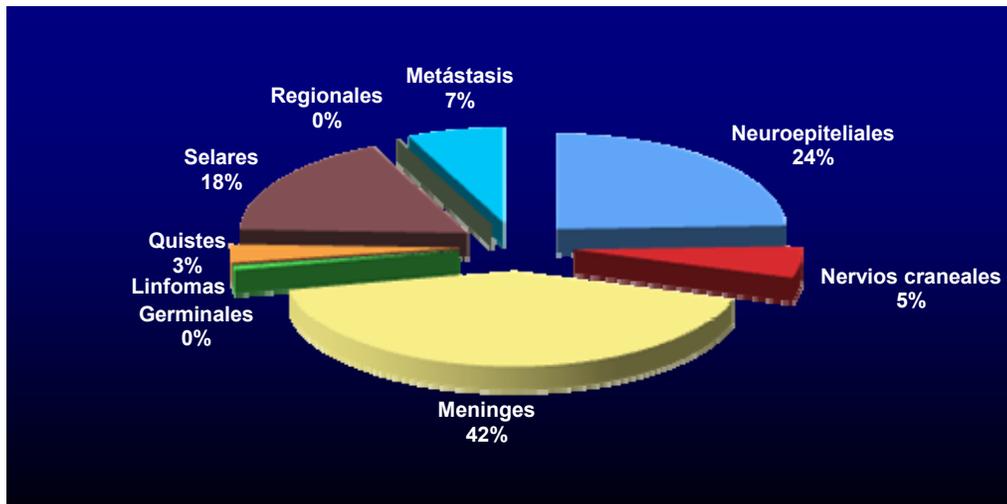


Figura 5. Distribución porcentual de la frecuencia de los tipos de tumores colectados en la construcción del Biobanco del INNN (2009-2010)

En el cuadro 1 se encuentra a detalle la distribución histológica de los tumores almacenados en la base de datos según la clasificación de la OMS. Entre los tumores originados de las células neuroepiteliales predominaron los tumores derivados de los astrocitos. De los tumores derivados de las meninges los originarios de las células meningoteliales fueron más frecuentes que los derivados de las células mesenquimales. Los tumores más frecuentes de los derivados de las células meningoteliales fueron los meningiomas, mientras los de las células mesenquimales fueron los de histogénesis desconocida (hemangioblastoma). Dentro de los tumores de células mesenquimales benignos se presentó un lipoma, mientras de los malignos se registró un condrosarcoma.

DISTRIBUCION DE LAS BIOPSIAS ALMACENADAS EN EL BIOBANCO INNN SEGÚN EL ORIGEN DE LOS TUMORES DEACUERDO A LA CLASIFICACION OMS	
Neuroepiteliales	32
- <i>Astroцитos</i>	25
- <i>Oligodendrocitos</i>	0
- <i>Ependimocitos</i>	3
- <i>Mixtos</i>	1
- <i>Plexo Coroides</i>	1
- <i>Neuronal</i>	1
- <i>Pineales</i>	0
- <i>Embrionarios</i>	1
Nervios espinales y craneales	7
Meninges	55
<u>Células Meningoteliales</u>	
- <i>Meningiomas</i>	50
- <i>Atípicos</i>	0
- <i>Anaplásicos</i>	1
<u>Células Mesenquimales</u>	
- <i>Benignos</i>	1
- <i>Malignos</i>	1
- <i>Melanocitos</i>	0
- <i>Histogénesis desconocida</i>	2
Hematopoyéticos o linfomas	1
Células germinales	0
Quistes tumorales	4
Selares	23
Regionales con extensión local	0
Metástasis	9

Cuadro 1. Tabla general de la distribución de las biopsias obtenidas, procesadas y almacenadas en el Biobanco INNN de acuerdo a la Clasificación de Tumores del SNC según la OMS (2007).

VIII. DISCUSIÓN

La creación de biobancos es un proyecto que ha sido impulsado exitosamente en países desarrollados por el potencial de datos que pueden obtenerse a partir de las muestras colectadas.^{5,6,7} El Banco Nacional de Especímenes de Investigación Neurológica de la VAMC-UCLA, formado desde 1961; hoy en día es el biobanco más grande de su género y el de mayor diversidad de muestras reportado en la literatura.^{3,8} En México, el Instituto Mexicano de Seguridad Social formó hace 20 años un banco de DNA de diversos tejidos para la realización de mapeos genéticos y como auxiliar diagnóstico.⁹

La creciente necesidad de nuevas y mejores técnicas clínicas, diagnósticas y terapéuticas han impulsado la investigación biomédica. Esto ha hecho una mayor conciencia médica y social acerca de la importancia de la formación de bancos de tejidos para su estudio, provocando un importante aumento en el número de bancos de tejidos alrededor del mundo.¹⁰ A su vez este crecimiento ha visto la necesidad de formar bancos secundarios, los cuales se caracterizan por administrar los recursos (muestras y bases de datos) de los bancos de una regional como es el caso del UK DNA Banking Network (UDBN).¹¹⁻¹³

Esta organización ha permitido establecer los requisitos para satisfacer los Códigos de Conducta Internacionales y a su vez se ha hecho mención de los problemas más comunes en la formación de un banco de tumores.^{6,14-18} Como resultado hay una clara mejoría en la calidad de las muestras de esta década respecto a la anterior.¹⁹ Todos estos factores sumados permiten que la sociedad perciba un sistema organizado, con consideraciones éticas y legales, que les brinda la confianza de que las muestras sean estudiadas de manera adecuada; impulsando un sistema de donadores, investigadores e inversionistas.²⁰⁻²⁶

Los estudios de biología molecular utilizan biomarcadores y tecnología de punta para estudiar la relación entre exposiciones del medio ambiente, factores genéticos y enfermedades específicas en humanos. Por lo que los centros de captación y almacenamiento de material biológico juegan un papel esencial en el flujo de información genética de pacientes a los investigadores para su aplicación en la investigación clínica.^{21,27} El manejo y almacenamiento cuidadoso de estas pequeñas y valiosas muestras es fundamental. Muchos factores afectan la calidad de la muestra; el tipo de tejido, cuidados durante la obtención de la muestra, tiempo de recolección – almacenamiento, recipientes utilizados, tiempo de tránsito, entre otros. Por lo que un diseño experimental eficiente además de cuidar estos factores incluye la purificación del DNA y RNA; y la preparación de las muestras para análisis citogenéticos, inmunológicos y bioquímicos.^{13,21,28-31}

Los tumores cerebrales son la causa número uno de internamiento en el INNN. Por motivos de estandarización de la toma y manejo de las muestras se decidió incluir en el proyecto a los pacientes portadores de tumores cerebrales en los que el mismo neurocirujano (DMR) formaba parte del equipo quirúrgico. Previamente se solicitó un consentimiento informado de familiares y paciente para la toma de biopsia para el banco de DNA de tumores del INNN.

Durante este proceso fue necesaria una estrecha comunicación entre el equipo quirúrgico y el del laboratorio. El equipo de laboratorio preparó diariamente los frascos con PFA al 2% para la toma de muestras. A partir de aquí el equipo quirúrgico eligió la técnica quirúrgica en base al diagnóstico preoperatorio. Se tomaron tres muestras de tumor; una destinada al laboratorio de histopatología, otra con PFA al 2% y la última en un criotubo que inmediatamente se colocó en un tanque de nitrógeno líquido. Simultáneamente se tomaron 8cc de sangre venosa periférica que se almacenaron en 2 frascos con ácido etilendiamintetracético (EDTA) para ser utilizados como DNA control. Estas muestras se entregaron al equipo del laboratorio quien se encargó de su rápido procesamiento. Es importante mencionar que la cantidad de la muestra de tumor depende del tamaño, consistencia y localización del

mismo. Habiendo casos en los que se dificulta contar con una cantidad importante de tumor. El tiempo transcurrido entre la toma de muestra y su procesamiento es un factor determinante en la calidad de la misma, por lo que para futuras tomas este factor será una variable a considerar.³⁰

El procesamiento de las muestras se realizó con el NucleonKitAmersham®, siguiendo las indicaciones del fabricante para extraer DNA amplificado de alta calidad de manera consistente. Se corrieron 134 muestras de sangre, en 5 de los tumores no se encontró banda de DNA y en algunos casos se vieron bandas tenues de DNA. Para validar la integridad del DNA se hizo una nueva extracción a partir del tejido y en algunos casos se encontró la banda esperada pero en otros no. Lo que podría estar explicado en que la biopsia contiene muy pocas células cuyo DNA no fue posible apreciarlo en el gel de agarosa. Considerando esta situación y como control de calidad posteriormente se realizará un ensayo de amplificación de genes constitutivos (ej. GADPH) para amplificarlo por PCR.³²

Actualmente, contamos con las primeras 134 muestras de tumores del SNC procesadas y documentadas en una base de datos. La distribución de muestras obtenidas no representa una realidad de la epidemiología de los tumores cerebrales en nuestra población. Ya que estas muestras fueron obtenidas al azar, de algunos de los procedimientos quirúrgicos realizados en el INNN.

El material nuclear obtenido de estas muestras fue de pureza y concentración adecuadas para estudiar algunas de las alteraciones genéticas asociadas al desarrollo de tumores cerebrales específicos en nuestra población, lo cual permitiría por un lado, la confirmación del diagnóstico histopatológico y por el otro la identificación de marcadores pronósticos que servirán para elección temprana de conductas terapéuticas. Sabemos que existen cientos de mutaciones encontradas en los tumores, por lo que consideramos que es necesario su estudio genético rutinario. Es necesario contar con recursos para que estos estudios puedan en un futuro determinar el tratamiento individualizado a cada paciente.^{31,33,34}

IX. CONCLUSIONES

1. Se obtuvo el consentimiento informado de 134 pacientes que aceptaron que la muestra tomada transoperatoriamente se utilice para formar parte del biobanco y su uso consecuente en futuros proyectos.
2. Se tiene una base de datos completa con los datos clínicos, histopatológicos y de biología molecular de los 134 pacientes integrados en el biobanco
3. La colección de tumores que conforma el biobanco representa parcialmente la frecuencia de los tumores cerebrales atendidos en el Instituto. Los tumores más frecuentes almacenados en el banco de DNA son los derivados de las meninges (meningiomas), de las células neuroepiteliales en particular los de los astrocitos y los tumores selares (adenoma hipofisarios).
4. Ya contamos con la extracción de DNA de 134 muestras de tumores del SNC y de 134 muestras de células sanguíneas control.
5. Contamos con 134 muestras de tejido tumoral del SNC las cuales se encuentran almacenadas en refrigeración a -70C para que en un futuro sean utilizadas en estudios de inmunohistoquímica.
6. El procedimiento estandarizado sirvió para la obtención de DNA de pureza óptima, confiable para el desarrollo de estudios moleculares.

Este trabajo abrirá la posibilidad de realizar diagnóstico molecular de rutina y de desarrollar estudios de alteraciones moleculares asociados a tumores cerebrales específicos en la población mexicana.

X. REFERENCIAS

1. Aguirre-Cruz L, Sotelo J. Tumores Cerebrales. México D.F., México: Panamericana; 2008.
2. Dedova I, Harding A, Sheedy D, Garrick T, Sundqvist N, Hunt C, et al. The importance of brain banks for molecular neuropathological research: the new South Wales tissue resource centre experience. *Int J Mol Sci* 2009; 10:366-384.
3. Tourtellotte WW, Rosario IP, Conrad A, Syndulko K. Human neuro-specimen banking 1961-1992. The National Neurological Research Specimen Bank (a donor program of pre- and post-mortem tissues and cerebrospinal fluid/blood; and a collection of cryopreserved human neurological specimens for neuroscientists). *J Neural Transm Suppl* 1993; 39:5-15.
4. Waldvogel HJ, Bullock JY, Synek BJ, Curtis MA, van Roon-Mom WM, Faull RL. The collection and processing of human brain tissue for research. *Cell Tissue Bank* 2008; 9:169-179.
5. Vonsattel JP, Del Amaya MP, Keller CE. Twenty-first century brain banking. Processing brains for research: the Columbia University methods. *Acta Neuropathol* 2008; 115:509-532.
6. Vonsattel JP, Amaya Mdel P, Cortes EP, Mancevska K, Keller CE. Twenty-first century brain banking: practical prerequisites and lessons from the past: the experience of New York Brain Bank, Taub Institute, Columbia University. *Cell Tissue Bank* 2008; 9:247-258.

7. Roa EI, Artigas ACG. A pilot experience with a tumor bank. *Rev Med Chil* 2008; 136 (6):733-40.
8. Morente MM, Fernandez PL, de Alava E. Biobanking: old activity or young discipline? *Semin Diagn Pathol* 2008; 25:317-22.
9. Salamanca F. Development of specimen banks for research in molecular epidemiology. *Gac Med Mex* 2007; 133 Suppl 1:71-4.
10. McEwen JE, Reilly PR. A survey of DNA diagnostic laboratories regarding DNA banking. *Am J Hum Genet* 1995; 56:1477-86.
11. Yuille M, Dixon K, Platt A, Pullum S, Lewis D, Hall A, et al. The UK DNA banking network: a "fair access" biobank. *Cell Tissue Bank* 11:241-51.
12. Yuille M, van Ommen GJ, Bréchet C, Cambon-Thomsen A, Dagher G, Landegren U, et al. Biobanking for Europe. *Brief Bioinform* 2008; 9:14-24.
13. Troyer D. Biorepository standards and protocols for collecting, processing, and storing human tissues. *Methods Mol Biol* 2008; 441:193-220.
14. Viertler C, Zatloukal K. Biobanking and Biomolecular Resources Research Infrastructure (BBMRI). Implications for pathology. *Pathologe* 2008; 29 Suppl 2:210-3.
15. Bell WC, Sexton KC, Grizzle WE. How to efficiently obtain human tissues to support specific biomedical research projects. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2009; 18:1676-9.
16. Bell JE, Alafuzoff I, Al-Serraj S, Arzberger T, Bogdanovic N, Budka H, et al. Management of a twenty-first century brain bank: experience in the BrainNet Europe consortium. *Acta Neuropathol* 2008; 115:497-507.

17. Rivas E, Teijeira S, Tardio A, Fachal C, Quintáns B, Navarro C. A brain tissue bank in a neuropathology laboratory. Basic methodology. *Neurologia* 2003; 18:709-15.
18. Ravid R. Standard Operating Procedures, ethical and legal regulations in BTB (Brain/Tissue/Bio) banking: what is still missing? *Cell Tissue Bank* 2008; 9:151-67.
19. Barnes RO, Parisien M, Murphy LC, Watson PH. Influence of evolution in tumor biobanking on the interpretation of translational research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17:3344-50.
20. Watson PH, Wilson-McManus JE, Barnes RO, Giesz SC, Png A, Hegele RG, et al. Evolutionary concepts in biobanking - the BC BioLibrary. *J Transl Med* 2009; 7:95.
21. Thornton M, Gladwin A, Payne R, Moore R, Cresswell C, McKechnie, et al. Automation and validation of DNA-banking systems. *Drug Discov Today* 2005; 10:1369-75.
22. Clark G, Lipworth W, Les B, Little JM, Kerridge IH. An empirical study of tissue banking in Australia: navigating regulatory and ethical challenges. *J Law Med* 2006; 14:102-9.
23. Lipworth W. Navigating tissue banking regulation: conceptual frameworks for researchers, administrators, regulators and policy-makers. *J Law Med* 2005; 13:245-55.
24. Caulfield T. Tissue banking, patient rights, and confidentiality: tensions in law and policy. *Med Law* 2004; 23:39-49.

25. Godard B, Schmidtke J, Cassiman JJ, Aymé S. Data storage and DNA banking for biomedical research: informed consent, confidentiality, quality issues, ownership, return of benefits. A professional perspective. *Eur J Hum Genet* 2003; 11 Suppl 2:S88-122.
26. Jendroska K, Patt S, Jänisch W, Cervos-Navarro J, Poewe W. How to run a "brain bank"? Clinical and institutional requirements for "brain banking". *J Neural Transm Suppl* 1993; 39:71-5.
27. Day JG, Stacey GN. Biobanking. *Mol Biotechnol* 2008; 40:202-13.
28. Holland NT, Smith MT, Eskenazi B, Bastaki M. Biological sample collection and processing for molecular epidemiological studies. *Mutat Res* 2003; 543:217-34.
29. Tjonneland AM, Olsen A. What are the requirements for establishing a biological specimen bank? *Ugeskr Laeger* 2003; 165:1686-8.
30. McKee AC. Brain banking: basic science methods. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1999; 13 Suppl 1:S39-44.
31. Inda M, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, et al. Tumor heterogeneity is an active process maintained by a mutant EGFR-induced cytokine circuit in glioblastoma. *Genes Dev* 2010;24(16):1731-45.
32. Seth R, Rameshkumar K, Clark DJ, Rippin J, Scholefield J, Jenkins D. Efficient extraction of DNA from paraffin-embedded tissue using Nucleon HT Kit for clinical molecular pathology research. *Life Science News* 1, 1998 Amersham Biosciences. Disponible en [http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FA34936027170C27C1257628001CBCA8/\\$file/lisn_1_14.pdf](http://www.gelifesciences.com/aptrix/upp00919.nsf/Content/FA34936027170C27C1257628001CBCA8/$file/lisn_1_14.pdf)

33. Nishikawa R, Sugiyama T, Narita Y, Furnari F, Cavenee WK, Matsutani M. Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor, deltaEGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathol* 2004;21(2):53-6.
34. Mukasa A, Wykosky J, Ligon KL, Chin L, Cavenee WK, Funari F. Mutant EGFR is required for maintenance of glioma growth in vivo, and its ablation leads to escape from receptor dependence. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(6):2616-21.

XI. ANEXOS

Anexo 1. Formato del consentimiento informado.

Investigador Principal: Dr. Diego MéndezRosito (diegomendezrosito@gmail.com)

Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Departamento de Neurocirugía

México, Distrito Federal

Título: *Estandarización de un biobanco de tumores del sistema nervioso para estudios de biología molecular que coadyuven a su diagnóstico y pronóstico*

A continuación se le explica y se le invita a participar en este estudio.

Por favor lea el contenido completo de la forma. Su firma en la parte de abajo indica que usted está de acuerdo en participar voluntariamente en el estudio.

Propósito: Este estudio pretende establecer un banco de tumores cerebrales para buscar genes que ayuden a clasificar, identificar y tratar estas neoplasias.

Procedimiento: Con su autorización, tomaremos 8 ml de su sangre y un pequeño fragmento del tumor que le será extraído por el cirujano. Este procedimiento no interferirá con su tratamiento o con su estudio histopatológico.

Productos Finales: Sus muestras serán usadas para obtener el material genético presente en su sangre y su tumor para buscar genes de probable interés para facilitar el diagnóstico, para establecer un pronóstico y para tratar el cáncer cerebral. Los conocimientos obtenidos con sus muestras servirán probablemente para un mejor diagnóstico de los tumores y se utilizarán para la escritura de artículos científicos, una conferencia, un libro u otra publicación.

Confidencialidad: Su nombre y cualquier nombre mencionado en su entrevista no serán usados al presentar los resultados de este proyecto.

Acuerdo del Participante:

He leído y me han explicado la información anterior. Mi firma a continuación indica que entendí la información expuesta anteriormente y que estoy de acuerdo en participar en este estudio.

Nombre (use por favor letra de imprenta)

Fecha

Firma