



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

**“Análisis de la expresión de marcadores moleculares
pronósticos en tumores astrocíticos pediátricos”**

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIÓL. PILAR AMELLALI BADILLO SUÁREZ

TUTOR PRINCIPAL: Dr. Diego Julio Arenas Aranda

Hospital de Pediatría, CMN SXXI (Facultad de Medicina)

COMITÉ TUTORAL: Dra. Martha Verónica Ponce Castañeda

Hospital de Pediatría, CMN SXXI (Facultad de Medicina)

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Facultad de Estudios Superiores Iztacala

México D.F

MARZO, 2013



Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 18 de junio de 2012, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (Biología Experimental)** de la alumna **BADILLO SUÁREZ PILAR AMELLALI** con número de cuenta 301585288, con la tesis titulada **ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES MOLECULARES PRONÓSTICOS EN TUMORES ASTROCÍTICOS PEDIÁTRICOS** realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**:

Presidente: **DR. GONZALO CASTILLO ROJAS**
Vocal: **DRA. VILMA MALDONADO LAGUNAS**
Secretario: **DR. RICARDO MEJÍA ZEPEDA**
Suplente: **DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**
Suplente: **DRA. MARTHA VERÓNICA PONCE CASTAÑEDA**

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 11 de febrero de 2013

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, por la formación académica que me brindo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada para realizar mis estudios de posgrado.326475/231728

A los miembros del comité tutorial, por el tiempo dedicado durante mis estudios de posgrado y por sus valiosas aportaciones en la fase experimental de este trabajo:

Dra. Martha Verónica Ponce Castañeda

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dr. Diego Julio Arenas Aranda.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

A los miembros de la Comisión Dictaminadora:

Dr. Gonzalo Castillo Rojas

Dra. Vilma Maldonado Lagunas

Dr. Ricardo Mejía Zepeda

Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo

Dra. Martha Verónica Ponce Castañeda

Por la dedicación y el tiempo invertido en la revisión de este trabajo, por sus consejos, observaciones, sugerencias y por compartir sus conocimientos con la finalidad de enriquecer este trabajo, gracias.

A la UNAM por abrirme las puertas de este recinto, por brindarme el orgullo de ser universitaria, por todas las oportunidades de crecimiento profesional y por ser parte trascendental de mi vida.

Al Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS), por las facilidades concedidas para la realización de este proyecto.

Al servicio de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Al banco de tumores del (Sistema Nervioso Central) del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, por su colaboración durante la colecta de muestras.

A la Dra. Judith Villa Morales por brindarme su apoyo constante dentro y fuera del laboratorio, por sus recomendaciones en la fase experimental, por su comprensión, por su enseñanza transmitida, por su paciencia y por forjar en mi un carácter más fuerte y analítico.

A la Dra. Eunice López, por sus sugerencias técnicas en los ensayos de PCR en tiempo real y por su apoyo en el análisis de resultados.

DEDICATORIAS

A Dios, por las bendiciones recibidas, por permitirme culminar uno más de mis sueños, pero sobre todo por estar en mi vida y por mostrarme día a día tu infinito amor y que a pesar de las dificultades mi vida esta llena de felicidad, luz, amor y bendiciones.

A mi Papá, por todo el amor y apoyo que me brindaste cuando más lo necesite, gracias por ser un gran amigo, por aceptarme con mis locuras y por permitirme ser auténtica.

A mi Mamá, por ser el mejor regalo que la vida me pudo dar, hermosa te admiro tanto. Gracias de todo corazón por haber estado a mi lado cuando me sentí perdida, por no dejarme vencer y por sostenerme de pie cuando creí perder las fuerzas, por ser mi hermoso ángel terrenal y llenar de amor y de luz mi vida ¡Te amo mamita hermosa!

A mí hermano Giovanni, por escucharme y apoyarme, por ser mi amigo, por enseñarme a ser más fuerte a defender lo que soy, por procurarme y por estar siempre para mí.

A mis abuelitos, por ser parte trascendental de mi vida, por todo su amor y entrega a la hermosa familia que ustedes edificaron, por su ejemplo de fortaleza y por seguir conmigo.

A mi tía Betty, por enseñarme a dar lo mejor de mí, por tu ejemplo de excelencia, entrega y bondad, por ser el pilar de la familia y por TODO lo que has hecho para que yo sea feliz, gracias por tu amor.

A mi tía Chabe, por tu cariño, por tu fortaleza y valentía, porque siempre estas cerca en los momentos más importantes.

A mi tía Ale, porque gran parte de lo que soy te lo debo a ti, por todo tu amor, ternura y dedicación, por incitarme a confiar en mí, por hacerme reír, porque cuando pierdo la fe me ayudas a encontrar la luz.

A mi tía Mosy, porque siempre has tenido las palabras precisas para tranquilizarme, por haberme dado luz y esperanza cuando lo necesite, por mostrarme el camino a seguir, por tu ejemplo de tenacidad.

A mi tía Male, por abrirme tus brazos, por recordarme que no estoy sola, por tu confianza, por los bonitos momentos que me has regalado, por tu cariño y amor, por tu ejemplo de lucha y superación.

A mis tíos Adolfo, Rodrigo y Rey, por su cariño, por mostrarme que puedo contar con ustedes en cualquier instante, por ser parte importante de mi familia.

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

A mi primo Daniel, por tu cariño, por tu ejemplo de fortaleza y superación.

A mis primitas, por ser los angelitos que alegran mi vida, por ser mi luz en esos días nublados, por convertir cada momento en algo mágico, por hacerme sentir importante y especial, por su amor. Xime y Marianita, gracias por la confianza que en mi han depositado, porque siempre tienen las palabras necesarias para disipar cualquier problema, por brindarme su amistad, por apoyar mis locuras. A mis nenas Gaby y Fer, por sus ocurrencias, las risas, por la emoción con la que hacen las cosas, porque en sus brazos siempre encuentro un cálido refugio. Mis niñas, las amo y admiro demasiado.

A Ismael, por las pláticas que nos ayudaron a entender al mundo y nos permitieron crecer, por tu hermosa amistad y por acompañarme en cada paso que doy y no dejarme sola.

A Judith por recordarme el significado de la amistad. Por tus consejos, tus regaños, por tu confianza, por las locuras que vivimos y por darme la fuerza para enfrentar lo que venga.

A Conny, por permitirme descubrir que dentro de una gran mujer puede seguir viviendo una niña, por todo el apoyo dentro y fuera del laboratorio, por tus consejos.

A Ary, porque estar aquí, porque emprendimos un difícil viaje juntas y lo estamos logrando, por todo lo que hemos aprendido. Nunca te podría olvidar hermanita y te estaré eternamente agradecida, tqmmm.

A Vivi, por tu amistad, por tu paciencia, por el apoyo que me has dado en repetidas ocasiones y por todos los momentos lindos que hemos compartido, tqmmm.

A Ruth, porque a pesar del tiempo seguimos juntas aunque no de forma física, por tu cariño y amistad.

A Maya, por tu amistad, por tu confianza, por escucharme y por hacerme parte de tu vida.

A Irma, por todas esas horas de trabajo y de café compartidas, por esas largas pláticas, por brindarme tu brazo cuando lo necesite, por hacerme reír, por tu apoyo y tu gran amistad.

A Xchel, por tu apoyo y tus consejos, por recordarme que muchos dones y aptitudes pueden converger en una misma persona haciéndola mucho más extraordinaria.

A Andy, por la confianza que depositaste en mí, por ser una gran amiga, por estar a mi lado, por tu ternura, por recordarme que los cuentos de hadas pueden volverse realidad.

A Lupita, por hacer más agradable mi estancia en el laboratorio, por todo tu apoyo.

A Nathaly, Danny, Cely y MaJo, por permitirme compartir momentos inolvidables y hermosas experiencias a su lado, gracias por llegar a mi vida y por su amistad.

A Flor, por escucharme, por tus palabras de aliento, por todo tu apoyo, pero sobre todo por tu amistad.

A mi jefe el **Profesor Samuel Meráz**, por la confianza que depositó en mí cuando inicié este proyecto y por las facilidades otorgadas en la Facultad, gracias por todo su apoyo.

A mis compañeros de trabajo **Biol. Soledad Chino** y **M. en C Luis Barbo**, por todo su apoyo, su comprensión, por sus consejos y por su amistad.

A mi familia del **REIKI: Lau, Bere, Ary, Enry, Erika, Ángel, Luigi, Diana y Pao** por todo lo que me han enseñado, por las asombrosas experiencias compartidas, por las risas, por ayudarme a aligerar la carga, por acompañarme en este camino de autodescubrimiento, por la luz que me han dado, pero sobre todo porque sin conocerme me acogieron y me hicieron sentir parte de algo especial, ¡Gracias!

ÍNDICE DE CONTENIDO

ABREVIATURAS	11
1. RESUMEN	13
1.1. ABSTRACT	15
2. INTRODUCCIÓN	17
2.1. DEFINICIÓN Y BIOLOGÍA DEL CÁNCER	18
2.2. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	20
2.3. LOCALIZACIÓN Y SIGNOS CLÍNICOS	26
2.4. DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO	27
2.5. BASE MOLECULAR DE TUMORES ASTROCÍTICOS	28
2.6. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFR)	35
2.7. ONCOGEN HOMÓLOGO AL THYMOMA VIRAL MURINO (AKT1).....	38
2.8. PROTEÍNA SIMILAR A LA PROMINA 1 (PROM1 o CD133).....	42
3. JUSTIFICACIÓN	45
4. HIPÓTESIS	46
5. OBJETIVOS	47
5.2.OBJETIVOS PARTICULARES	47
6. METODOLOGÍA GENERAL	48
6.1. CRITERIOS DE INCLUSIÓN:	48
6.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:.....	48
6.3. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES U87MG Y T98	48
6.4. CORTES HISTOLÓGICOS	49
6.5. EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDO	49
6.6. CUANTIFICACIÓN DE RNA.....	49
6.7. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)	50
6.8. PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.....	52
6.9. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	52
6.10. SDS-PAGE.....	53
6.11. WESTERN BLOT.....	53
7. RESULTADOS	54
7.1. ANÁLISIS DE RNA	59

7.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR). ..	60
AKT1	62
CD133	66
EGFR	69
7.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	75
7.5. WESTERN BLOT	76
8. ANÁLISIS DE RESULTADOS	82
EXPRESIÓN DEL mRNA DE AKT1	83
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AKT1	85
EXPRESIÓN DEL mRNA DE CD133	86
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CD133	88
EXPRESIÓN DEL mRNA DE EGFR	89
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EGFR	90
9. CONCLUSIONES	93
10. GLOSARIO	94
11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
11.1. REFERENCIAS DE INTERNET	105

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1 Clasificación de Tumores Astrocíticos OMS y hallazgos histológicos	23
Tabla 2 .Desarrollo o progresión tumoral	24
Tabla 3 Alteraciones moleculares más frecuentes en Astrocitoma	33
Tabla 4 Oligos de cada transcrito analizado	50
Tabla 5 Descripción de las muestras colectadas durante 2009-2010	54
Tabla 6 Concentración de RNA por muestra	59
Tabla 7 Valores de absorbancia registrados para cada muestra y la concentración a la cual corresponde.	75

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Incidencia de las neoplasias en pacientes pediátricos	21
Gráfica 2. Frecuencia de Astrocitomas de alto y bajo grado.	25
Gráfica 3. Frecuencia de Astrocitomas de alto y bajo grado	55
Gráfica 4. Frecuencia de Astrocitomas según el género.	55
Gráfica 5. Proporción de Tumores de Alto y Bajo Grado por edades.	56
Gráfica 6. Expresión Relativa de AKT1 (comparación con HPRT)	63
Gráfica 7. Expresión de AKT1 en comparación con el tejido de cerebro sano	64
Gráfica 8. Expresión relativa de CD133 en comparación con HPRT	67
Gráfica 9. Expresión de CD133 en comparación con el tejido de cerebro sano	68
Gráfica 10. Expresión relativa de EGFR en comparación con HPRT.	71
Gráfica 11. Expresión de EGFR en comparación con el tejido de cerebro sano	71
Gráfica 12. Expresión de AKT1, CD133, EGFR y como control de expresión HPRT.	73
Gráfica 13. Expresión de la proteína AKT1 y GADPH	78

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

Gráfica 14. Expresión de la proteína CD133 en comparación con GADPH	80
Gráfica 15. Comparación de la expresión de la proteína EGFR con GADPH.	81
Gráfica 16. Expresión de las proteínas AKT1, CD133, EGFR y GADPH	82

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1 Localización de Astrocitomas en el cerebro	26
Figura 2. Vías de Señalización de EGFR y PDGFR.....	29
Figura 3 Mecanismos de CDKN2 a través de INK4A/p16 y INK4B/p14.	31
Figura 4 Génesis molecular de los Glioblastomas de novo y Secundarios (KEGGS)	34
Figura 5 Localización del gen EGFR en el cromosoma 7.....	35
Figura 6 Estructura secundaria de EGFR.....	35
Figura 7 Proteína EGFR activa e inactiva	36
Figura 8 Principales Vías de Señalización de EGFR.....	38
Figura 9 Localización de AKT1 en el cromosoma 14.	39
Figura 10 Estructura secundaria de la proteína AKT1.....	39
Figura 11 Proteína AKT1 visualizada con PDB.Viewer	40
Figura 12 Vía de Señalización de AKT1.....	41
Figura 13 Localización de PROM1 en el cromosoma 4.....	43
Figura 14 Estructura de la proteína PROM1	43
Figura 15. Cultivos de las líneas celulares T98 y U87 (Microscopio invertido)	49
Figura 16 Posición de los oligos en la secuencia de mRNA de AKT1	51
Figura 17 Localización de los iniciadores en el mRNA de CD133.....	51
Figura 18 Posición de los “primers” en la secuencia de mRNA de EGFR.....	52
Figura 19 Localización de los oligos en el mensajero de GABBR1	52
Figura 20 Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de los pacientes de Alto Grado.....	57
Figura 21. Cortes histológicos de los pacientes de Bajo grado.	58
Figura 22 Electroforesis de RNA.	59
Figura 23 Tiempo Real de HPRT (Curva de Amplificación y Melt)	60
Figura 24 Visualización de productos de HPRT en gel de agarosa al 1.5%.....	61
Figura 25 Tiempo Real de AKT1 (Curva de Amplificación y Melt).....	62
Figura 26 Visualización de productos de AKT1 en geles de agarosa al 1.5%.....	63
Figura 27 Curvas del Tiempo Real obtenidas para CD133	66
Figura 28 Visualización de productos de CD133 Figura.....	67
Figura 29 Curvas registradas en el Tiempo Real de EGFR	69
Figura 30 Gel de agarosa al 1.5 de productos de EGFR.....	70
Figura 31 Gel de agarosa al 1.5 de productos de EGFR.....	73
Figura 32 Gel de Poliacrilamida para visualizar proteínas.....	76
Figura 33. Westernblot de AKT1 y GADPH.....	77
Figura 34 Westernblots de AKT1 (verde), contra GADPH (azul).....	77
Figura 35. Westernblots de AKT1 (verde), contra GADPH (azul).....	79
Figura 36. Electroinmunotransferencias de EGFR y GADPH.....	81

ABREVIATURAS

- AKT1:** Ongogen Homólogo al Thymoma Viral Murino
- AMPc:** Adenosin Monofosfato ciclico
- ATCC:** American Type Culture Cell
- BCA:** Acido Bicinconínico
- CD133:** Proteína Similar a la Promina 1
- CDK4:** Ciclina dependiente de la cinasa 4
- CDKN2:** Ciclina dependiente de la cinasa 2a/p16
- COX-2:** Cicloxigenasa 2
- CSC:** Células Madre de Cáncer
- Ct:** Ciclo al "Threshold"
- CTNNB:** Catenina (Proteína asociada a cadherina)
- Curva Melt:** Curva de Fusión
- D.O. :** Densidades Ópticas
- Dx.:** Diagnóstico
- EDTA:** Ácido Etilendiaminotetraacético
- EGFR:** Receptor del Factor de Crecimiento Epidermal
- ENT:** Enfermedades no Transmisibles
- EPGN:** Proteína epitelial mitogénica
- ERK:** Cinasa Reguladora Extracelular
- GMB:** Glioblastoma Multiforme
- GSC:** Glioblastoma stem-cell (Células madre de Glioblastomas)
- GSK3:** Glicogen Sintetas Cinasa 3
- HIC:** Hipertensión intracraneal
- HP CMN SXXI:** Hospital de Pediatría de Centro Médico Nacional Siglo XXI.
- HPRT:** Hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa
- INCan:** Instituto Nacional de Cancerología
- KEGG:** Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes
- LOH:** Pérdida de Heterocigocidad

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

MGMT: O- metilgunin-DNA-metiltransferasa

MIB-1: Ubiquitin-proteína-ligasa 3

MPM: Marcador de peso molecular

NNSC: Células madre neurales normales

PBS: Buffer de Fosfatos Salino

PDBV: Protein Data Bank Viewer

PDGFR: Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas

PI3K: Fosfatidil-inositol-3 cinasa

PIP2: Fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato

PKC: Proteína cinasa C

PLC: Fosfolipasa C

PTEN: Homólogo de la Fosfatasa y tensina

PVDF: Fluoruro de polivinilideno

RHNNM: Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México

SDS: Dodecil-sulfato de sodio

SNC: Sistema Nervioso Central

SOCS: Supresores de señalización de citocinas

STAT3: Transductor de señal y activador de la transcripción 3

TBE: Buffer (Tris-Borato-EDTA)

TBS-T: Buffer Salino Tris HCl - Twen

TS: Tejido sano

UTR: Región no Traducida

VEGF: Factor de Crecimiento Endotelial Vascular

WB: Western Blot

1. RESUMEN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo. En México es uno de los principales problemas de salud pública, constituye la segunda causa de muerte en la población. La mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones de los proto-oncogenes y genes supresores tumorales, añadiéndose nuevas mutaciones que alteran funciones celulares y otorgan nuevos atributos biológicos como: invasión, angiogénesis, motilidad celular, pérdida de la adhesión celular y metástasis. Los tumores del Sistema Nervioso Central en niños difieren de los tumores de adulto en los parámetros epidemiológicos, su clasificación y en las alteraciones genéticas. Hasta el momento no se cuenta con datos precisos acerca de los factores etiológicos que determinan el desarrollo de estos tumores en infantes. Entre los factores moleculares se han reportado posibles alteraciones en algunos oncogenes como KRAS, y R-RAS, se observa sub-expresión de los supresores tumorales PTEN, Rb y P53. Dentro de la génesis de estas patologías también se considera la sobre-expresión de genes involucrados con la proliferación celular tal es el caso de Ki-67, PROM y AKT1; y finalmente se registran amplificaciones y sobre-expresión de factores de crecimiento y sus receptores: EGFR y PDGF.

Por lo que se procedió a analizar la expresión de los genes PROM1, AKT1, y EGFR relacionados con diversas vías celulares relacionadas con cáncer y compararla entre tumores astrocíticos de alto y bajo grado a nivel de mRNA y proteína. Se cultivaron las líneas celulares T98 y U87 manteniéndose a 37°C con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda; las cuales fueron utilizadas como controles positivos y como control negativo se utilizó cultivo primario de cerebro sano. Por otra parte, se colectaron muestras de tumores durante un año; se reportan 11 muestras con diagnóstico de astrocitoma confirmado y 3 de diagnóstico dudoso dando un total de 14 muestras obtenidas. Se analizaron los cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina y eosina para verificar diagnóstico y el porcentaje de tejido tumoral. A partir del tejido criopreservado se llevó a cabo la extracción de RNA total, para proceder a la síntesis de cDNA utilizando transcriptasa reversa (Super Script II) y a las reacciones de PCR en tiempo real de cada uno de los transcritos, y de HPRT el cual fue utilizado como control de expresión constitutiva. Finalmente, se realizaron las extracciones de proteínas para proceder a las electroinmunotransferencias (Western blot) de las tres moléculas con los anticuerpos primarios: Akt1 (PAN) (m), Anti- CD133 (m) y EGFR (m) utilizando a GADPH como control de expresión.

De las muestras analizadas el 28.57% fueron de alto grado y el 71.43% restante corresponden a tumores de bajo grado. Por otra parte, se reporta que el 42.85% de los pacientes son de género femenino y el 57.1% de género masculino por lo que se aprecia un comportamiento similar en ambos grupos lo cual sugiere que aparentemente no hay predisposición a desarrollar este tipo de neoplasias en alguno de los sexos. Finalmente, se reporta que en infantes menores de 5 años predominan Astrocitomas de Bajo grado. El gen AKT1 se expresa en una proporción mayor a 2 en comparación a HPRT en 8 muestras y en las líneas celulares T98 y U87, mientras que en las 6 muestras restantes y el tejido sano se expresan de forma similar. No obstante 11 muestras registraron valores que sobrepasan el sitio de corte de +1, lo que indica la sobreexpresión significativa de este transcrito en comparación con el tejido sano.

Para el transcrito CD133 de las 14 muestras se reporta expresión relativa menor a +1, sin embargo en las 4 muestras correspondientes a tumores de alto grado y las líneas celulares T98 y U87, se observa un ligero incremento del mRNA. Por otra parte los valores de expresión relativa del gen EGFR en las 14 muestras se encuentran por arriba del sitio de corte de +1, pero únicamente 4 de las muestras sobrepasan el 1.5 de expresión al igual que las dos líneas celulares. Es preciso recalcar que las diferencias de expresión relativa se calculan considerando los valores de HPRT, no obstante tanto para CD133 y EGFR estas diferencias no resultaron ser significativas.

En los valores obtenidos de las electroinmunotransferencias de GADPH, AKT1 y EGFR, se evidencia que la intensidad de las bandas y los valores de las D.O. es mayor conforme incrementa el grado tumoral. La proteína CD133 se expresa de manera normal en 9 pacientes pues la señal obtenida es similar a la registrada para GADPH. Se sugiere que al estar involucrado CD133 en la diferenciación celular, existe una disminución de este transcrito ya que las células cancerosas pierden paulatinamente esta capacidad y se propone que el ligero incremento que se observa en muestras de tumores de alto grado se debe a la función que desempeña durante el proceso de angiogénesis.

Para la proteína AKT1 los resultados indican sobreexpresión en los diferentes grados tumorales. Considerando que esta proteína se encuentra involucrada en diferentes vías de señalización tales como: P13K/Akt1, vía de las MAPK, apoptosis y adhesión celular, es necesario analizar las posibles consecuencias que se puedan derivar de la sobreexpresión. El incremento de la expresión en 8 de los 14 pacientes, así como en las líneas celulares T98 y U87 sugiere que este patrón de expresión puede estar involucrado en el proceso la adhesión celular; el cual es un paso crítico en el proceso de metástasis que se activa por los eventos y factores extracelulares. Este tipo de presión extracelular promueve la fosforilación de AKT1 y por tanto la reducción de la forma no activada, lo que suprime la adhesión de las células cancerosas dando lugar a la progresión tumoral.

Los resultados de EGFR muestran diferencia de expresión de esta proteína, ya que los valores de D.O registrados para los 4 pacientes de alto grado son mayores a los de las muestras restantes. Esta diferencia de expresión entre tumores de alto y bajo grado coincide con lo reportado previamente ya que una de las alteraciones más frecuentes en este tipo de neoplasias es la sobreexpresión de esta molécula en un 80% de los pacientes pediátricos, sin embargo, estas diferencias no son significativas. La sobreexpresión de EGFR se ha asociado a la expresión de receptores mutantes crónicamente activados EGFRvIII, que promueven la activación persistente de vías de señalización (Ras/ERK y P13K/Akt1) y por tanto incrementa la proliferación celular y la reducción en los mecanismos de apoptosis.

Los resultados obtenidos demuestran la importancia de las moléculas elegidas en este estudio en el desarrollo de los tumores astrocíticos pediátricos, razón por la cual es imperativo continuar con el análisis de posibles marcadores que permitan identificar a los pacientes que presenten riesgo elevado o para aquellos que cursen con un pronóstico desfavorable.

1.1. ABSTRACT

Cancer is a leading cause of death worldwide. In Mexico is one of the major public health problems, is the second cause of death in the population. Most tumors are initiated by mutations of proto-oncogenes and tumor suppressor genes, adding new mutations that alter cell functions and provide new biological attributes such as invasion, angiogenesis, cell motility, loss of cell adhesion and metastasis. Central nervous system tumors in children differ from adult tumors within the epidemiological parameters as well as in classification and genetic alterations. So far there is no precise data on the etiological factors that determine the development of these tumors in infants. Among the molecular factors, alterations have been reported in some as KRAS oncogenes and R-RAS, sub-expression is observed in tumor suppressor PTEN, Rb and P53. In the genesis of these conditions is also considered the over-expression of genes involved in cell proliferation as in the case of Ki-67, PROM and AKT1, and finally amplifications and overexpression of growth factors and their receptors are registered: EGFR and PDGF.

It was proceeded to analyze the expression of genes PROM1, AKT1, and EGFR, related to various cellular pathways associated with cancer and compare it between astrocytic tumors of high and low level of mRNA and protein. Cell lines T98 and U87 were cultured maintained at 37 ° C with 5% CO₂ and a humidified atmosphere, which were used as positive and for the negative control, primary culture of healthy brain was used. Otherwise, tumor samples were collected during one year, 11 samples are reported with confirmed diagnosis of astrocytoma, 3 of dubious diagnostic giving a total of 14 samples. Histopathological sections were analyzed stained with hematoxylin and eosin to verify the diagnosis and percentage of tumor tissue. From the cryopreserved, extraction of the total RNA was held, to proceed to the synthesis of cDNA using reverse transcriptase (SuperScript II) and the PCR reactions in real time each of the transcripts, and HPRT which was used as control of constitutive expression. Finally, protein extractions were carried out to proceed to electroimmunotransferences (Western blot) of the three molecules with the primary antibodies: Akt1 (PAN) (m) Anti-CD133 (m) and EGFR (m) using GAPDH as an expression control.

Of the samples tested, 28.57% were high grade and the remaining 71.43% correspond to low-grade tumors. Moreover, it is reported that 42.85% of the patients are female and 57.1% male gender so seen similar behavior in both groups suggesting that there is no apparent predisposition to develop this type of tumor in either sex. Finally, it is reported that in infants under 5, low-grade astrocytomas predominate. AKT1 gene is expressed at a higher rate compared to 2 HPRT in 8 samples and in the T98 and U87 cell lines, whereas the remaining 6 samples and healthy tissue express similarly. However, 11 samples ecoreded values exceeding the cut site of +1, which indicates significant overexpression of this transcript compared to the healthy tissue.

For the CD133 transcript of the 14 samples, relative expression less than +1 is reported, but in the 4 samples from high-grade tumors and cell lines T98 and U87, there was a slight increase in the mRNA. Moreover the relative expression values of the EGFR gene in the 14 samples are above cut site +1, but only 4 samples exceed 1.5 of expression as well as two cell lines. It should be stressed that the relative expression differences

are calculated by considering the values of HPRT, however for CD133 and EGFR these differences were not significant.

The values obtained from electroimmunotransferences GADPH, AKT1 and EGFR, it is evident that the intensity of the bands and the values of OD is greater as tumor grade increases. The CD133 protein is expressed normally in 9 patients because the signal obtained is similar to the observed for GAPDH. It is suggested that as the CD133 is involved in cellular differentiation, there is a decrease of this transcript as cancer cells gradually lose this ability and it is suggested that the observed slight increase in tumor samples was high due to the function that is performed in the process of angiogenesis.

For AKT1 protein, results indicate overexpression in the different tumor grades. Considering that this protein is involved in various signaling pathways such as P13K/Akt1, the MAPK pathway, apoptosis and cell adhesion, it is necessary to analyze the possible consequences that may result from overexpression. The increased expression in 8 of 14 patients, as well as in cell lines T98 and U87 suggests that this pattern of expression may be involved in cell adhesion process, which is a critical step in the process of metastasis which is activated by extracellular factors. This type of extracellular pressure promotes phosphorylation of AKT1 and therefore reducing the non-activated form, which suppresses the adhesion of cancer cells leading to tumor progression.

EGFR results show differential expression of this protein, since the OD values reported for patients with high grade 4 are higher than those of the remaining samples. This difference in expression between tumors of high and low degree coincides with what was previously reported since one of the most frequent alterations in these tumors is the overexpression of this molecule, presented in 80% of pediatric patients. However, these differences were not significant. EGFR overexpression has been associated with the expression of chronically activated EGFRvIII mutant receptors that promote persistent activation of signaling pathways (Ras / ERK and P13K/Akt1) and therefore increases the cellular proliferation and the reduction in apoptosis mechanisms.

The results demonstrate the importance of the molecules chosen in this study in the development of pediatric astrocytic tumors, which is why it is imperative to continue the analysis of potential markers in order to identify patients with high risk or those who have a poor prognosis.

2. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades no transmisibles (ENT) son la principal causa de mortalidad en todo el mundo, pues se cobran más vidas que todas las otras causas combinadas. Contrariamente a la opinión popular, los datos disponibles demuestran que casi el 80% de las muertes por ENT se dan en los países de ingresos bajos y medios. Dentro de estas enfermedades se encuentran las cardiovasculares, la diabetes, las enfermedades pulmonares obstructivas y el cáncer.

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo; en 2008 causó 7,6 millones de defunciones (aproximadamente un 13% del total). Se estima que alrededor del 30% de las muertes por cáncer son debidas a factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol (OMS, 2012).

Aproximadamente más de dos tercios de las muertes causadas por cáncer registradas se producen en países de ingresos bajos y medios; ya que en cualquier población la alimentación desempeña un papel importante en el estado de salud y enfermedad de la gente; así, la disposición de alimentos se relaciona íntimamente con los recursos económicos para adquirirlos, de manera que es lógico pensar que a menores ingresos económicos, menor calidad de alimentación. Por lo tanto, la calidad de vida y salud en esas condiciones de carencia es muy importante. El incremento del porcentaje estimado en la incidencia de cáncer hacia 2030, será mayor en los países de ingresos bajos (82%) y medios bajos (70%), en comparación los países de ingresos medios altos (58%) y altos (40%)(OMS, 2010).

Actualmente cada año, de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), se diagnostican 12 millones de personas con cáncer, de las cuales más de siete millones fallecen. La OMS pronostica que de no adoptarse medidas, para 2030 habrá 26 millones de nuevos casos, de los cuales 17 millones morirán por el padecimiento.

En México, el cáncer es uno de los principales problemas de salud pública, no solo por el número de muertes que ocasiona sino también por los estragos que causa en el entorno de los pacientes y por los costos de la atención médica que demanda. A partir de la década de 1990, constituye la segunda causa de muerte en la población general después de la diabetes mellitus y las enfermedades cardiovasculares. La Secretaría de Salud reporta que en México cada hora mueren seis personas por culpa de este mal; en los mismos sesenta minutos, otras once más reciben la noticia de que padecen cáncer. Cada año se diagnostican en el país 120,000 nuevos casos, de los cuales 75,000 fallecen debido a una detección tardía. Las cifras convierten a este padecimiento en una de las principales causas de muerte en la población mexicana. Por género, las estadísticas arrojan que hasta ahora hay una mayor incidencia entre las mujeres, quienes representan el 55% de los pacientes, por 45% de los varones (INCan). En el país los tipos de cáncer más comunes en las mujeres son los de mama y el cérvico-uterino, con 16,000 y 12,000 diagnósticos nuevos al año, respectivamente. La población masculina padece en mayor medida cáncer de próstata, testicular y de colon. Además, el pulmonar

que se presenta por igual a ambos sexos (Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas en México (RHNNM)). Por otra parte se ha reportado que la leucemia es el más común en los niños, aunque la Secretaría de Salud destaca que en la última década se logró cambiar la estadística de siete menores muertos por cada diez casos con este mal, a siete infantes tratados exitosamente por cada diez enfermos.

Dentro de este tipo de patologías se encuentran los tumores del Sistema Nervioso Central, cuya incidencia en pacientes adultos es muy elevada por lo que los estudios correspondientes a este tipo de neoplasias abarcan generalmente a pacientes entre los 40 y 65 años. Sin embargo, se ha observado un incremento de estos tumores en infantes, esto se debe posiblemente a la mejora en los elementos diagnósticos o bien a la mejor caracterización de determinados subtipos (Gilles, et.al., 1995). Por lo que, es necesario identificar las causas de su desarrollo, así como, la génesis molecular ya que este conocimiento abre la puerta a nuevas dianas terapéuticas.

Los tumores del Sistema Nervioso Central en niños difieren de los que aparecen en edad adulta no solo en la histología sino también en muchos parámetros epidemiológicos, en las células precursoras, su clasificación, las proporciones de subtipos patológicos y en la presentación clínica, porque ésta en los niños depende de la localización del tumor y de la edad en la que se presenta. Estos tumores presenta una incidencia de 2.76 a 4.03/ 100, 000 niños al año (Vega, et.al., 2008). En México cada año alrededor de 700 niños reciben un diagnóstico de glioma, no obstante los datos epidemiológicos y estadísticos son variables.

Los tumores cerebrales pediátricos varían considerablemente en su distribución histológica, topográfica y por sexos a lo largo de la infancia; lo cual sugiere probablemente dinámicas de crecimiento tumoral que provienen de tipos individuales que ocurren en periodos específicos de la vida de los infantes, razón por la cual los epidemiólogos los consideran entidades únicas (Márquez-Rivas, et.al., 2010).

El diagnóstico y pronóstico de las neoplasias del sistema nervioso central en la infancia por su localización y extensión, siguen considerándose un desafío para el oncólogo pediatra, por lo cual es imperativo desarrollar nuevos proyectos de investigación enfocados a identificar nuevos marcadores moleculares, si se pretende aumentar la supervivencia y la calidad de vida de los pacientes que desarrollan estas patologías ya que a pesar de que los tratamientos utilizados generalmente son efectivos siguen siendo invasivos por lo que dejan grandes secuelas en los niños pues las estructuras afectadas difícilmente se regeneran en su totalidad (Grovas A. et. al. 1997).

2.1. DEFINICIÓN Y BIOLOGÍA DEL CÁNCER

El cáncer es el término genérico que designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del organismo; pueden ser tumores malignos o neoplasias benignas. Una característica del cáncer es la multiplicación rápida de células anormales que se extienden más allá de sus límites habituales y pueden invadir partes adyacentes del cuerpo o propagarse a otros órganos, proceso conocido como metástasis. Las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer. El cáncer comienza con la transformación de una

célula normal en tumoral; por un proceso multifásico y suele consistir en la progresión de una lesión precancerosa a un tumor maligno. Estas alteraciones son el resultado de la interacción entre los factores genéticos del paciente y agentes externos (Luque y Herráez, 2008).

Este conjunto de enfermedades tienen en común que se originan de una serie de modificaciones en la información genética de las células somáticas lo que conduce a la desregulación de los procesos celulares y a la alteración de la capacidad celular para mantener controlado el crecimiento (Weksberg *et al* 2001).

Existen determinados genes cuya expresión conduce en un momento determinado, a la supervivencia o muerte celular, generalmente a través de la síntesis enzimática. La gran mayoría de las neoplasias se inician por mutaciones o expresiones anormales de los proto-oncogenes y genes supresores de tumor, añadiéndose nuevas mutaciones que alteran otras funciones celulares y otorgan nuevos atributos biológicos como: invasión, angiogénesis, motilidad celular, pérdida de la adhesión celular, alteraciones inmunológicas y metástasis (Renan, 1993).

La afectación de cada función celular varía con el tipo de tumor. La gran mayoría requiere de inicio de cuatro a siete mutaciones en genes claves para que se produzca la progresión neoplásica. Las células dañadas que escapan a los mecanismos de apoptosis perpetúan las anomalías en su descendencia (Luque y Herráez, 2008)

Existe un equilibrio particular en cada órgano en lo concerniente a proliferación y muerte celular. A este estado fisiológico se le denomina cinética celular normal y se regula en cada tejido según su función. La ruptura de este equilibrio a favor de la acumulación de células, ya sea por mecanismos genéticos o epigenéticos, es la esencia del origen de las neoplasias. Este proceso durante el cual las mutaciones sucesivas convierten una célula normal en un clon de células neoplásicas se denomina carcinogénesis o tumorogénesis (Ferbeyre y Salinas, 2005)

El ritmo normal de mutaciones y sus mecanismos de reparación, así como las vías hacia la apoptosis, se ven afectados en el cáncer, ya que de forma habitual las células son capaces de reparar la gran mayoría de sus mutaciones. A esta peculiaridad se le denomina fenotipo mutador y es considerado un elemento crucial en la progresión de una neoplasia. Las mutaciones en oncogenes y en genes supresores de tumores, son de expresión dominante, que causan la pérdida recesiva de la función de cada uno de estos (Sarasin, 2003).

Los genes cuya expresión promueven la supervivencia y la proliferación celular se denominan oncogenes, y aquellos que la inhiben e inducen la apoptosis se les denominan genes supresores. En la actualidad se conocen decenas de genes diferentes, que están asociados a tipos tumorales específicos. Aunque los oncogenes son fundamentales en este proceso, sólo se han detectado en un 15-30% de los tumores humanos. Sin embargo, las alteraciones en los genes supresores son muy frecuentes (Lara-Jimenez *et al.*, 2004).

Se ha establecido que las mutaciones de los genes supresores de tumor contribuyen al proceso de carcinogénesis, cuando ambos alelos pierden su función. Frecuentemente la mutación inicial ocurre en uno de

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

los alelos, el evento siguiente puede ser una delección cromosómica o una recombinación mitótica entre el cromosoma que porta el alelo mutante y el cromosoma que tiene un alelo normal (Weksberg *et al.*, 2001).

Los genes supresores inhiben el crecimiento celular en condiciones normales. Cuando se produce una mutación en estos genes, sus proteínas no se expresan o dan lugar a proteínas no funcionales, favoreciendo la aparición del proceso de carcinogénesis o tumorogénesis, al no existir un control de la proliferación celular. Para que estos genes supresores adquieran la capacidad de generar tumores, necesitan sufrir mutaciones independientes en ambos alelos, de manera que pierdan completamente su capacidad funcional. Es decir, la alteración se manifiesta con carácter recesivo (Stratton *et al.*, 1996).

También puede ser heredada esta alteración en la línea germinal, lo que explica el carácter hereditario de determinados tumores, cuya frecuencia es elevada en una misma familia. En este caso, uno de los alelos se hereda alterado, por lo que sólo se necesita una mutación en el otro alelo, para que se manifieste la enfermedad. Los mecanismos por los cuales se puede alterar la expresión de los genes supresores son similares a los descritos para los oncogenes. Son numerosos los genes oncosupresores estudiados, entre los más conocidos se encuentran: p53, retinoblastoma (Rb), Supresor del cáncer colorectal (DCC), Proteína mutante del carcinoma colorectal (MCC), Adenomatosis poliposis coli (APC), Neurofibromina (NF1), (NF2) y (H19). El 90% de los tumores tienen alteraciones epigenéticas similares que impiden que los genes inhiban normalmente el desarrollo de cáncer. Por ello, el conocimiento de la epigenética abre la puerta a nuevas dianas terapéuticas (Esteller, 2007).

2.2. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

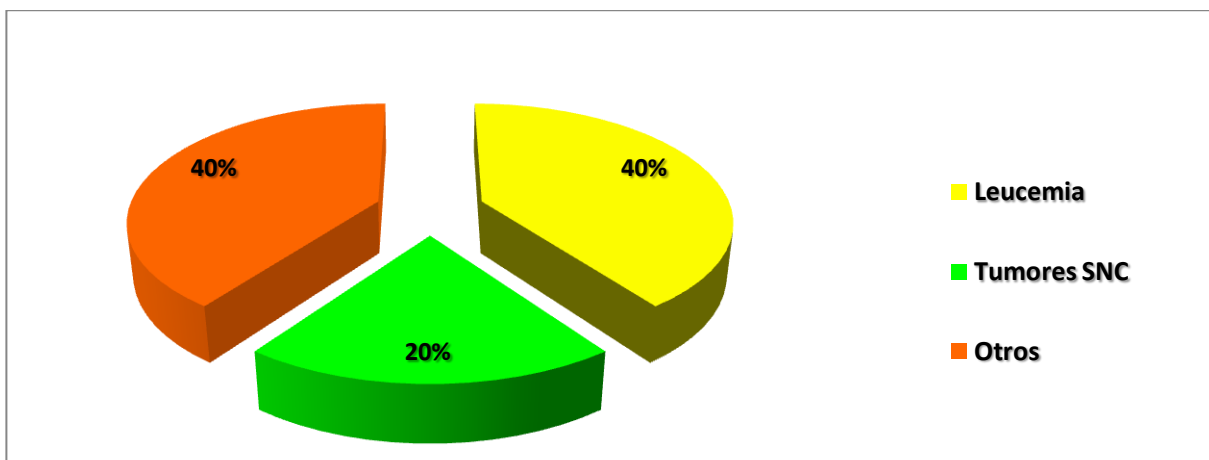
Hasta el momento no se cuenta con datos precisos acerca de los factores etiológicos que determinan el desarrollo de los tumores del sistema nervioso central (SNC) en pacientes pediátricos. Es factible que el origen sea un mecanismo molecular multifactorial, porque se han descrito diversos factores, sin que ninguno se haya comprobado de forma concluyente, por lo que es importante profundizar el conocimiento en esta área de la salud. Actualmente el único factor externo que sea descrito como agente causal de este tipo de tumor es la irradiación previa del encéfalo la cual es considerada como un factor ambiental (Surawicz, *et.al.*, 1999).

Por otro lado, estas neoplasias han sido relacionadas con pacientes que padecen Neurofibromatosis tipo 1, que presentan mutación en el gen neurofibromina cuya proteína tiene homología con RAS que funciona como supresor tumoral, ocasionando que estos pacientes desarrollen gliomas hipotalámicos. Por otro lado, el síndrome de Li-Fraumeni, originado por mutaciones en líneas germinales de p53, predispone a los niños al desarrollo de tumores de alto grado, como los astrocitomas anaplásicos (Monsalve, *et.al.*, 2011). Mientras que el síndrome de Turcot asocia poliposis colónicas y neoplasias intracraneales con diversos padecimientos ocasionados por mutaciones específicas en diversos genes supresores de tumor y reparadores del DNA como p53 y MDM2 y por la inestabilidad de algunos microsatelites con tendencia mayor a desarrollar gliomas (Giunti *et.al.*, 2009).

La exposición previa a tratamientos con radioterapia craneal (leucemias agudas, linfomas y otros tumores), incrementan el riesgo a desarrollar algún tipo de astrocitoma de alto grado, con una relación directa de dosis efecto y con un periodo de latencia de 9 a 12 años posterior a la exposición, por lo que se recomienda la valoración clínica de forma regular durante un periodo mínimo de 10 años posterior a la exposición. Se recomienda que el intervalo para la valoración clínica neurológica en pacientes con factores de riesgo sea de 6 a 12 meses (Maher, *et.al.*, 2009).

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 20% de la totalidad de neoplasias de la población pediátrica, son el segundo grupo más frecuente de tumores infantiles después de las leucemias que representan el 40% (Villarejo 2007). Trabajos recientes del National Cancer Institute describen un incremento de tumores cerebrales en niños por lo que son considerados las neoplasias sólidas pediátricas más frecuentes además de ser reportados como los tumores cuyos índices de morbilidad y mortalidad son altamente significativos en la población ya que hasta el momento se ha logrado tener mayor éxito en los tratamientos contra las leucemias (Serra, *et.al.*, 2009). Por otra parte se ha reportado una incidencia superior en los niños varones sobre las niñas que oscila entre el 60-68.3%. (Gurney, *et.al.*, 1999).

Por la ausencia de un programa nacional sobre registros de cáncer en general específicamente de los niños, en México sólo existen datos sobre la incidencia de cáncer en niños del Distrito Federal y derechohabientes del IMSS, y sobre la frecuencia de estas enfermedades en algunos estados de la República. Donde se reporta que en los niños mexicanos los principales grupos de cáncer que se presentan son las Leucemias, los tumores del sistema nervioso central y los linfomas. Algunos estados tienen una incidencia alta (Chiapas, Guerrero, Puebla). Dentro de los tumores del SNC, la incidencia más alta reportada es para los niños de Chiapas con una tasa de 31.9, Guerrero de 30.3 y Nuevo León con una tasa de 19.2. La incidencia de los dos primeros es similar a la de países del oeste de Europa Los niños con tumores sólidos se diagnostican en más de 50 % en estadios avanzados (III-IV). (Fajardo, *et.al.*, 2007).



Gráfica 1. Incidencia de las neoplasias en pacientes pediátricos (Villarejo, 2007)

Dentro de los tumores cerebrales, los denominados gliomas son los más frecuentes, dividiéndose en astrocitomas, oligodendrogliomas y ependimomas; observándose mayor similitud entre los dos primeros ya que en el caso de los ependimomas son considerados en su totalidad tumores de bajo grado porque difícilmente evolucionan a un estadio más avanzado, esto se puede ver reflejado en los grados de progresión señalados para estas neoplasias (Yachnis, 1997).

Los astrocitomas son tumores que se originan en las células gliales denominadas astrocitos; constituyen las neoplasias neurogliales más abundantes, con frecuencia se ubican en la fosa posterior del cerebro niño. Su clasificación en difusos y circunscritos es una forma útil de valorar el pronóstico en los pacientes. La clasificación de la OMS modificada para Pediatría se basa en conceptos histopatológicos y morfológicos considerados por Bailey P. y sus colaboradores en (1996), donde se consideraban únicamente 5 tipos de astrocitomas, sin embargo esta clasificación ha sido modificada constantemente (Rosemberg y Fujiwara, 2005). En la tabla 1, se presenta la clasificación que actualmente es utilizada para el diagnóstico en pacientes pediátricos.

Los gliomas de bajo grado son un grupo heterogéneo de tumores, que en la mayoría de los casos no sufren transformación maligna y ocasionalmente pueden tener una regresión espontánea, sin embargo si pueden recurrir aún si fueron removidos completamente. Pueden afectar de manera negativa la calidad de vida, aún en los pacientes que presentan astrocitomas pilocíticos en cerebelo que son tratados solo con cirugía. Los pacientes con este tipo de tumores, están en riesgo de presentar alteraciones adaptativas, cognitivas, así como de lenguaje, memoria y atención. Se estima que constituyen del 30 al 50% de los tumores en el sistema nervioso central en niños (Sievert, et.al., 2009).

Los astrocitomas pilocíticos se presentan más frecuentemente en infantes y es trascendental diferenciarlos de los astrocitomas fibrilares difusos, debido al pronóstico favorable asociado a los astrocitomas pilocíticos como causa de la falta de infiltración tumoral del parénquima cerebral, a la facilidad de resección y a su crecimiento. Su distribución, topografía, los patrones tisulares, rasgos histológicos, patrón de crecimiento y los factores pronósticos permiten considerarlos una entidad bien definida (Taquechel, et.al., 2009).

Los xantastrocitomas se desarrollan generalmente en niños y adultos jóvenes, se caracterizan por su carácter circunscrito (monofocal) y localización superficial cercana a meninges. La histopatología incluye un patrón fascicular, células astrocitarias pleomórficas, astrocitos lipidizados o xánticos, no presentan mitosis, necrosis o hiperplasia endotelial (Márquez, et. al., 2007).

Otra de las neoplasias circunscritas benignas es el astrocitoma subependimario de células gigantes, el cual se asocia al complejo de esclerosis tuberosa, generalmente se ubica en el ventrículo lateral, se originan desde nódulos subependimarios. Generan obstrucciones del foramen de Monro e hidrocefalias unilaterales. Los astrocitomas difusos tienen inherente tendencia a la progresión maligna. Están mal delimitados y son microscópicamente infiltrantes, presentan una máxima incidencia en los hemisferios y en el tronco cerebral (Pollack et.al., 1995 y Varlet, 2004).

Tabla 1. Clasificación de Tumores Astrocíticos y hallazgos histológicos (OMS)

TIPO DE TUMOR	HISTOLOGÍA	FRECUENCIA	MALIGNIDAD
Astrocitoma pilocítico	Células alargadas Crecimiento lento Ausencia de Mitosis Fibrillas gliales Rosenthal Prolongaciones astrocitarias : capiliformes	10% neoplasias gliales pediátricas	Grado I
Astrocitoma pineal	Localización alrededor de la glándula pineal Células diferenciadas	2-4% tumores de crecimiento lento	Grado I
Xantastrocitoma pleomórfico	Células astrogliales pleomórficas Xantomización citoplásmica Entramado vascular de paredes escleróticas Infiltrados inflamatorios crónicos	Poco frecuente Agresivo	Grado I
Astrocitoma subependimario	Neoplasia circunscrita astrocitos gigantes, con frecuentes infiltrados linfocitarios	5% de los pacientes	Grado I
Astrocitoma Protoplásmico	Corticales Células del citoplasma prominentes	25% tumores infiltrantes	Grado II
Astrocitoma Fibrilar	Células similares a la sustancia blanca. Células pequeñas, ovales y diferenciadas. Aumento moderado de la celularidad. Soporte fibrilar. Proteína glial ácido fibrilar GFAP	Variante más frecuente	Grado II
Astrocitoma Gemistocítico	Hemisferios cerebrales Células redondas Citoplasma eosinófilico Citoplasma Excéntrico		Grado II
Astrocitoma Difuso	Hiper celularidad Degeneración microquística Atipia nuclear Producen satelitosis cuando los astrocitos rodean a las neuronas	30% Gliomas de bajo grado más frecuentes	Grado II
Astrocitoma anaplásico	Variabilidad citoplásmica Hiper celularidad regional o difusa Anaplasia Incremento de la complejidad nuclear	Tumores infiltrantes difusos	Grado III
Glioblastoma multiforme	Crecimiento acelerado Diseminación dinámica. Mitosis Atípicas Necrosis	Tumores infiltrantes y hemorrágicos	Grado IV

Por otro lado los glioblastomas de alto grado representan cerca del 10% de todos los tumores cerebrales pediátricos. Su comportamiento es agresivo ocasionando invasión local, por lo que el pronóstico es desfavorable a pesar de los tratamientos hasta el momento disponibles. Tanto en hombres y mujeres se

presentan con una distribución similar. Se presentan con mayor frecuencia en niños de entre 15 y 19 años de edad y cerca del 30% se originan en la región supratentorial (hemisferios cerebrales) (Fangusaro, et.al., 2009).

Los tumores anaplásicos son de tipo fibrilar, con pleomorfismos o hiperchromasia. Los glioblastomas multiformes son tumores altamente vascularizados, masas con patrones tisulares que en ocasiones son infiltrantes aunque pueden llegarse a presentar masas unifocales con mitosis típicas ó atípicas numerosas y proliferación vascular endotelial ó focos necróticos (Pérez, et.al., 2001).

El grado de malignidad dependerá de su crecimiento, de la obstrucción que produzcan, de su ubicación, así como de su propagación (Sievert, et.al., 2009). Los tumores de gran malignidad crecen con rapidez, y pueden diseminarse fácilmente a todo el cerebro. Los astrocitomas de escasa malignidad por lo general se circunscriben a un área determinada y crecen lentamente, razón por la cual los tratamientos y el pronóstico difieren en cada caso tal como se muestra en la tabla 2.

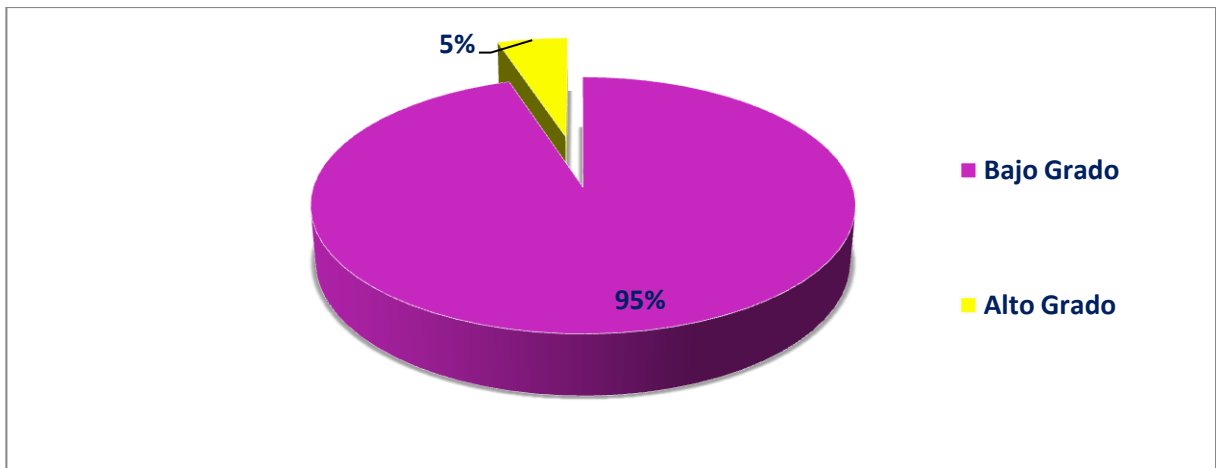
Tabla 2. Desarrollo o progresión tumoral.

Tumores de evolución lenta (Bajo grado)
<p><u>Tumores de grado I benignos, de crecimiento lento y circunscripto.</u> Pueden curarse mediante la extirpación quirúrgica (resección) del tumor y radiación Sobrevida de 5 años o más; eventual curación</p> <p><u>Tumores de grado II De crecimiento lento, pero con límites imprecisos, o de extensión.</u> Según el paciente, la alternativa puede ser radiación, quimioterapia o cirugía Sobrevida de 3 a 5 años.</p>
Tumores de evolución rápida (alto grado)
<p><u>Tumores de grado III Tumores anaplásicos, su evolución es más rápida.</u> Extirpación de la mayor cantidad de tumor posible, sin empeorar las funciones neurológicas. Radioterapia para prolongar la supervivencia Sobrevida de 1 a 3 años.</p> <p><u>Tumores de grado IV Tumores malignos, muestran signos histológicos de crecimiento muy rápido en todas las regiones examinadas.</u> Resección del tumor, radiación y quimioterapia Sobrevida de menos de 1 año.</p>

En la mayoría de los astrocitomas se realiza una resección parcial o total dependiendo del grado tumoral y la zona de obstrucción; por ejemplo la mayoría de los tumores astrocíticos de bajo grado como los pilocíticos son curables únicamente con cirugía, por lo que no existe necesidad de emplear un tratamiento complementario. Aunque generalmente, se recomienda el uso de la quimioterapia para el tratamiento de tumores cerebrales en infantes, no obstante este tipo de tratamiento está contraindicado en pacientes menores de 3 años, en los que los efectos cognitivos son evidentes, por lo que los pacientes son recurrentes con un mal pronóstico (Laack, et.al., 2005).

El uso de la temozalamida vía oral es común en estas neoplasias. La temozalamida es un agente alquilante cuyo mecanismo de acción consiste en inhibir la replicación del DNA; es un profármaco que se transforma espontáneamente en el organismo en monometil-triazelamidazol-carboxamida, su metabolito activo. La activación de estos productos implica un proceso oxidativo con formación de metildiazonio, que es rápidamente escindido en nitrógeno molecular y un ion carbonio que actúa como elemento alquilante. Este ion ocasiona la metilación de algunas bases nitrogenadas, formando radicales libres que provoca la degradación del DNA e incluso roturas cromosómicas (Robinson *et.al.*, 2010).

Es importante recalcar que el 95% de los tumores astrocíticos pediátricos son de escasa malignidad, a diferencia de los tumores de los adultos, sin embargo, ocasionan secuelas importantes a quienes lo presentan (Fisher, *et.al.*, 2008). En los niños son más frecuentes las masas tumorales unifocales; y los casos de metástasis a causa de estos tumores son esporádicos, no obstante las estructuras afectadas no se regeneran adecuadamente y muchas veces las formas benignas, evolucionan hacia la malignidad (Johrmann, *et. al.*, 1985).



Gráfica 2. Frecuencia de Astrocitomas de alto y bajo grado en población pediátrica (Sales Llopis, 2009).

Es importante mencionar que en estudios recientes se ha reportado que los astrocitomas de bajo grado se desarrollan generalmente dentro de los 3 primeros años de vida del infante hasta en un 35.7% de los pacientes con neoplasias sólidas, dentro de éstos se reportan a los astrocitomas pilocíticos que representan el 18% de los casos. Por otra parte se ha mostrado que los astrocitomas de alto grado son más frecuentes después de los 5 años de edad en un 43.2%, de éstos los astrocitomas difusos se presentan en un 14%, mientras que los astrocitomas anaplásicos y glioblastomas multiformes aportan el 9.2% cada uno de ellos.

Es preciso recalcar que estos datos son aproximados debido a que las estimaciones de las incidencias no son precisas por diferentes motivos, entre los que se encuentra la problemática de la clasificación de estos tumores. En las primeras series se clasificaban como neoplasias de alto grado algunas entidades clínicas o lesiones que realmente no lo eran, generando así un sesgo en el momento de estimar los valores de incidencia de cada subtipo tumoral (Márquez, *et.al.*, 2007).

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

Otro factor importante que influye notablemente en el pronóstico de los pacientes que reciben diagnóstico de astrocitoma es la localización del tumor ya que las decisiones del tratamiento a seguir dependerán del tipo de tumor y de su ubicación (Vega, *et.al.*, 2008).

2.3. LOCALIZACIÓN Y SIGNOS CLÍNICOS

Los tumores astrocíticos pediátricos pueden desarrollarse en el cerebelo, los hemisferios cerebrales, y el tálamo o el hipotálamo. Los niños con tumores en el cerebelo exhiben cefalea, vómitos, e inestabilidad al caminar. Con frecuencia, los tumores en los hemisferios cerebrales generan convulsiones; ocasionalmente existe debilidad en brazos y piernas y ligeros desvanecimientos. En la figura 1, se muestra un esquema del cerebro en el que se indican las zonas más frecuentemente afectadas por los diferentes tipos de astrocitomas.

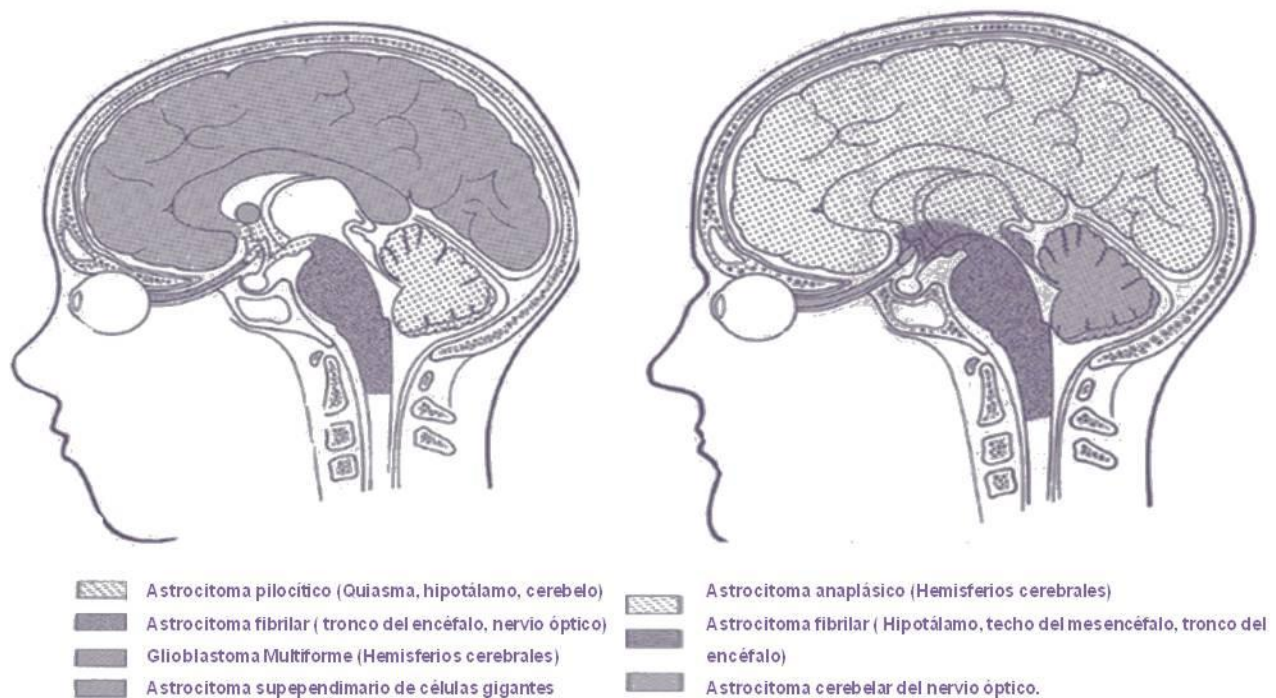


Figura 1. Localización de Astrocitomas en el cerebro (Villarejo, 2007).

Los tumores en el hipotálamo provocan problemas de pérdida visual o de oscurecimiento del campo, mientras que los tumores en el tálamo generalmente producen cefaleas y debilidad en las extremidades (Kleihues P. *et. al* 1993).

Otros de los síntomas que complementan el cuadro clínico de estos pacientes además de las convulsiones, son los problemas de visión doble y estrabismo, así como, las alteraciones cognitivas y las crisis de personalidad; sin embargo, varios de estos síntomas pueden ser sutiles ocasionando así un retardo en el diagnóstico de la patología. La cefalea es un síntoma tardío en los niños ocasionada por el síndrome de

hipertensión intracraneal (HIC), siendo persistentes las cefaleas frontales e ipsilaterales a la lesión. En los lactantes se presenta irritabilidad en episodios y cambios sutiles de carácter junto con un rápido crecimiento del perímetro craneal lo cual se considera el equivalente a las cefaleas en los niños mayores (Perdomo *et.al.*, 2007).

Un evento frecuente en los tumores astrocitarios de bajo grado es la presencia de crisis epilépticas ya que se trata de lesiones de lento crecimiento razón por la cual los focos epileptógenos tendrían mayor posibilidad de desarrollarse desencadenando diferentes tipos de crisis (Heuch *et.al.*, 1998).

Los astrocitomas parietales ocasionan alteraciones hemianestésicas de difícil diagnóstico ya que estos signos, sobre todo en lactantes, pasan casi siempre desapercibidos hasta que se acompañan de claras hemiparesias o monoparesias. Los tumores localizados en el lóbulo occipital producen defectos del campo visual muy leves por lo que son silentes hasta que se objetivan en la exploración complementaria una vez diagnosticada la lesión, habitualmente por hipertensión intracraneal (Blaney, *et.al.*, 2006).

2.4. DIAGNÓSTICO Y PRONÓSTICO

Actualmente, se utilizan diversas herramientas diagnósticas en este tipo de padecimientos como la radiología craneal, la tomografía de emisión de positrones, la ecografía, la tomografía computarizada, y la resonancia magnética la cual es sensible en lesiones pequeñas y en lesiones cercanas a la fase posterior, al tronco cerebral, o a la base del cráneo. No obstante la tomografía computarizada es la herramienta más comúnmente utilizada porque la mayoría de los centros de salud cuenta con el equipo, así como el bajo costo que representa y la posibilidad de realizarse sin anestesia.

Los factores pronósticos de los astrocitomas, se pueden dividir en los relacionados al tumor como la histología, siendo de peor pronóstico los grado III y IV de la OMS (astrocitoma anaplásico y glioblastoma multiforme, respectivamente); otros marcadores histopatológicos varían desde la valoración de los índices de mitosis, necrosis, diferenciación y proliferación celular (Ki-67 y MIB-1) y finalmente angiogénesis o vascularización, así como los parámetros inmunohistoquímicos referentes a la ausencia de expresión de genes supresores tumorales, sobre expresión de oncogenes y proteínas de adhesión celular, así como de factores de crecimiento, genes involucrados en el ciclo celular, receptores hormonales y algunos factores relacionados con la resistencia terapéutica (Tan *et.al.*, 2007).

Desde el punto de vista funcional el pronóstico de los pacientes tiende a ser malo, ya que son frecuentes en casi la mitad de los pacientes, los trastornos endocrinos, problemas crónicos como paresias mínimas o ataxia y finalmente un empeoramiento de su estado clínico. Las recurrencias de estos tumores se originan generalmente dentro del límite del tumor primario o en los márgenes de la zona de irradiación no obstante la progresión tumoral que presentan estas lesiones son independientes o secundarias a la radioterapia (Márquez-Rivas *et. al.*, 2010).

Dentro de los factores moleculares, se han reportado posibles alteraciones en algunos oncogenes que se han implicado en el proceso de carcinogénesis tales como KRAS, y R-RAS (Muñoz J., *et. al* 2000). También que se observa sub-expresión de algunos supresores tumorales tales como PTEN, Rb y P53, este último en algunos casos se sobre-expresa, o se pierde la función de la proteína (Chozik B. *et. al* 1994). Por otro lado, dentro de la génesis de estas patologías también se considera la sobre-expresión de genes involucrados con la proliferación celular tal es el caso de Ki-67 (Tan. *et.a.,/* 2005), CD133 y AKT1 (Fonnet *et. al.*, 2009); de igual forma se han registrado amplificaciones y sobre-expresión de factores de crecimiento y sus receptores: EGFR y PDGF. Estos eventos tienen como consecuencia la modificación de diferentes vías de señalización entre las que se encuentran la de las (MAPK) Activador mitogénico de la proteína cinasa y la vía de señalización del Calcio (Faily. *et. al* 2007).

La sobre-expresión de COX-2(Ciclo oxigenasa 2) en las células tumorales está asociada con gliomas más agresivos y es un fuerte predictor de baja sobrevida, pero no se correlaciona con la inmunotinción positiva de p53, la expresión de bcl-2, la pérdida de expresión de la proteína del retinoblastoma, o la sobre-expresión de MIB-1 (Shono, *et.al.*, 2001).

2.5. BASE MOLECULAR DE TUMORES ASTROCÍTICOS

Los estudios de pérdida de heterozigosidad (LOH) constituyen el método más ampliamente usado, desde el punto de vista molecular, para determinar la pérdida de material genético, sin embargo debe de ser apoyado por otras técnicas de Biología Molecular más puntuales si se pretende mejorar la práctica médica porque hasta el momento se cuenta con evidencia suficiente para conocer que la etiología de estos tumores no sólo involucra regiones cromosómicas completas si no afectaciones en diversos genes (Beroukhim, *et.al.*, 2007).

En la génesis de los tumores cerebrales existen alteraciones moleculares que son características de cada tipo de tumor y de su progresión evolutiva. La formación de astrocitomas de bajo grado y su subsiguiente progresión hacia Astrocitoma Anaplásico y Glioblastoma Multiforme implican una adquisición progresiva de alteraciones de distintos genes supresores y oncogenes (Perdomo *et.al.*, 2007). Es importante mencionar que si bien los Astrocitomas de bajo grado son los más comunes en los niños es muy probable la evolución de estos si no se detectan a tiempo a una entidad de alta malignidad. Para el desarrollo de un Glioblastoma se han descrito dos vías, la primera involucra la progresión tumoral directa a un tumor de alto grado el cual recibe el nombre de Glioblastoma primario o *de novo*, y la segunda comprende la presencia inicial de un tumor Astrocítico de bajo grado, el cual va evolucionando a un tumor de grado II, grado III, para finalmente dar lugar a un tumor de grado IV, el cual recibe el nombre de Glioblastoma Multiforme secundario. Para la formación de cada uno de estos tipos tumorales son necesarios diferentes eventos (Muñoz *et.al.*, 2000 y Fonnet, *et.al.*, 2012).

La biología de los gliomas malignos como la mayoría de los otros tipos tumorales se asocia con el desbalance de la expresión de las proteínas que controlan de manera positiva o negativa el ciclo celular, la proliferación, la motilidad, la neoformación vascular y el reconocimiento del sistema inmune. Estos fenómenos

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

son el resultado de cambios en el nivel de expresión de varios genes o de involucrar la pérdida de su expresión (Furnari *et al.*, 1996).

La señal para que la célula normal proliferara de forma normal se inicia en la superficie celular, donde los factores de crecimiento liberados por la matriz extracelular o por el propio tumor interactúan con los receptores específicos en la membrana, desencadenando diversos mecanismos de señalización intracelular que afectan a la expresión génica para promover la división celular. Pueden existir alteraciones y mutaciones en cada una de estas vías que en conjunto o de forma independiente pueden dar lugar a la pérdida de regulación del ciclo celular, la angiogénesis, la proliferación y favorecer la invasión (Luque y Herráez 2008).

La frecuencia de las alteraciones genéticas que están presentes en Glioblastomas secundarios y Glioblastomas *de novo* son diferentes, así como, la edad de los pacientes en la que se presentan. Mientras que los Glioblastomas *de novo* suelen aparecer en edades más tardías, los Glioblastomas secundarios suelen presentarse en edades más tempranas (Franco *et al.*, 2007).

Las alteraciones genéticas más frecuentes incluyen la pérdida, ganancia o amplificación de diferentes cromosomas las cuales, como ya se ha mencionado, dan lugar a alteraciones en la expresión de proteínas que juegan un papel importante en la regulación de la proliferación celular. Se han observado varias alteraciones genéticas comunes a nivel cromosómico (la pérdida de 17p, 13q, 9p, 19, 10, 22q, 18q y amplificación de 7 y 12q). Estas alteraciones conducen a cambios en la expresión de varios genes, como p53, retinoblastoma (Rb), interferón $\text{INF } \alpha / \beta$, AMP cíclico dependiente de la cinasa 2 CDKN2. MDM2 se reporta mutado en varios tipos de cáncer avanzado, el receptor del factor de crecimiento epidérmico EGFR, factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), el receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGFR), ubiquitina-ligasa de la proteína p53 homóloga de ratón (MDM2), (GLI), cinasa dependiente de ciclina 4 (CDK4) y Ácido N-acetilneuramínico sintasa (SAS) durante la génesis y progresión de los gliomas humanos (Perdomo, *et al.*, 2007).

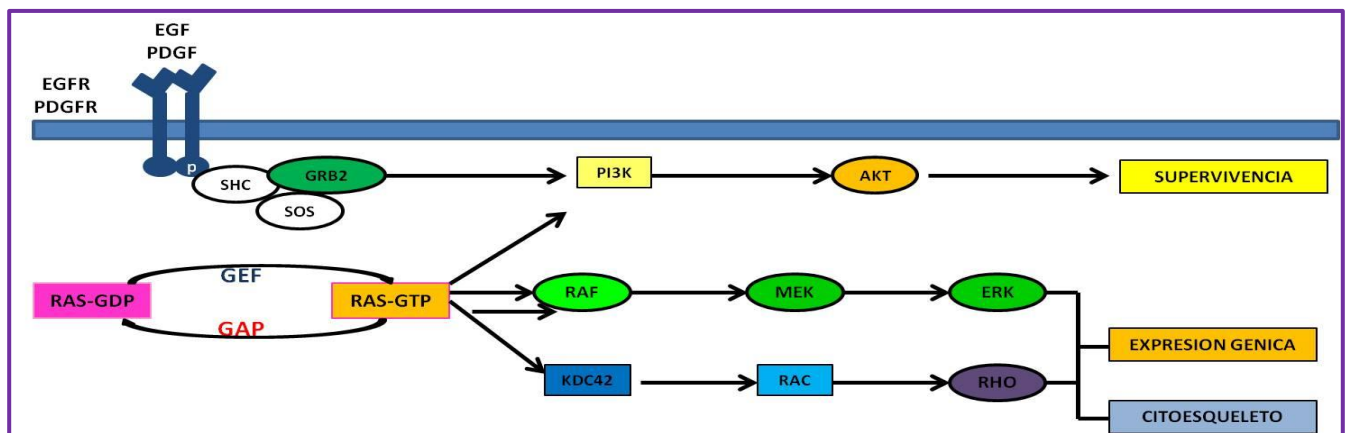


Figura 2. Vías de Señalización de los receptores del factor de crecimiento epidérmico y del derivado de plaquetas.

Estudios recientes sugieren que la expresión alterada de otros genes como MET, MYC, factor de crecimiento transformante TGF β , CD44, factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF); la molécula de adhesión celular relacionada con la neuroglia (HNR-CAM); (NCAM L1); p21WAF1/CIP1; TRKA; genes de reparación como MMR, C4-2, D2-2 y a nivel protéico, catepsinas, tenascina, metaloproteasas de la matriz, los inhibidores tisulares de metaloproteasas, la sintetasa de óxido nítrico, las integrinas, receptor de la interleucina - 13 (IL-13R), conexina43, receptores del activador uroquinasa del plasminógeno (uPARs), proteínas de matriz extracelular y las proteínas de choque térmico también están asociados con la génesis de los gliomas humanos. En conjunto, estos hallazgos apuntan a la acumulación de múltiples mutaciones genéticas asociadas a grandes cambios en la expresión génica en la etiología de los gliomas humanos (Sehgal, 1998)

Los pacientes que presentan tumores con alteración del gen que codifica la enzima reparadora MGMT tienen diferente pronóstico, ya que la presencia de estas alteraciones predicen qué gliomas van a responder o no a los agentes alquilantes. La MGMT (*O-metilgunin-DNA-metiltransferasa*) es una enzima reparadora que retira los grupos metilo, que los agentes alquilantes (radicales mutagénicos y citotóxicos) intercalan en la posición O₆ de la guanina, evitando de esta manera la ruptura de la hebra de DNA. Cada vez que la MGMT incorpora un grupo metilo a su molécula, es irreversiblemente inactivada y se requiere de una nueva síntesis. De este modo, la capacidad de reparación de lesiones en el DNA de una célula, depende del número de moléculas de MGMT y por tanto de la tasa de síntesis *de novo* de la misma (Dong, *et. al.*, 2001).

La acumulación de mutaciones en gliomas subsecuente a la inactivación de MGMT no parece ser aleatoria ya que si bien esta inactivación produce acumulación de mutaciones en el oncosupresor TP53, dichas alteraciones son prácticamente inexistentes en otro gen. La metilación aberrante de MGMT produce una mejor respuesta a tratamientos con temozolomida en gliomas. Por lo tanto, la ausencia de la proteína o la inactivación del gen es un factor de mal pronóstico debido a que los pacientes que poseen metilación en este gen acumulan más mutaciones (Franco, *et. al.*, 2007).

La supervivencia es significativamente menor en tumores pediátricos que tienen amplificado el brazo largo del cromosoma 1 o en aquellos infantes que portan eliminación del locus 10q23/PTEN. También existen hallazgos de eliminación del complejo p14ARF21 y la pérdida del locus 10q23, alteraciones que se involucran con el ciclo celular, sin embargo, son de buen pronóstico (Jiang, *et. al.*, 2009).

Las alteraciones más frecuentes en los astrocitomas de bajo grado son la pérdida de la región cromosómica 17p31.1 y la presencia de mutaciones en el gen supresor tumoral p53 en un 65% de los casos. Los pacientes con síndrome de Li Fraumeni (heredan el gen p53 mutado) presentan con mayor frecuencia este tipo de tumores, por lo que se sugiere que este gen puede estar implicado en el desarrollo inicial de los astrocitomas. Sin embargo, se ha mostrado la presencia de mutaciones en este gen en todos los grados de astrocitoma esporádico, por lo que se ha interpretado que los astrocitomas de alto grado portadores de alteraciones en p53 son el resultado de la progresión de astrocitomas de bajo grado (Zheng, *et.al.*, 2008).

En la mayoría de los tumores la pérdida de función del gen p53 se asocia con estadios avanzados de la enfermedad. La elevada incidencia de alteraciones de este gen en astrocitomas de bajo grado podría explicar la capacidad de estas neoplasias de infiltrar tejidos anexos desde el inicio del padecimiento (Perdomo, *et. al.*, 2007).

Es decir que la sobre-expresión de p53 y otro tipo de mutaciones de TP53 están relacionadas con una evidente peor evolución, mientras que los niños que muestran baja expresión de este marcador presentaron supervivencia de 5 años. Las anomalías en la expresión de p53 son mucho más frecuentes en GBM que en astrocitomas anaplásicos u otros gliomas de grado III. De igual forma se encontró una relación con la edad ya que los niños pequeños presentan menor frecuencia de la mutación de este gen, lo cual sugiere que los gliomas malignos de niños menores de tres años pueden tener una vía génica diferente a p53 (Furnari, *et. al* 1996).

Como ya se ha mencionado, la presencia de Astrocitomas de alto grado suele considerarse como el resultado de la progresión de tumores de bajo grado. Las alteraciones citogenéticas más frecuentes en estos tipos de tumores son las pérdidas alélicas de los cromosomas 9p, 11p, 13q y 19q (Koschny, *et. al* 2002).

Muchas de estas alteraciones afectan a genes implicados en la regulación de la progresión del ciclo celular. En el 50% de los glioblastomas secundarios se ha descrito pérdida del gen CDKN2 que se localiza en el cromosoma 9, el cual está involucrado en la codificación de las proteínas INKA/p16 y el complejo ARF/p14. La pérdida de la región cromosómica 13q14, donde se localiza el gen supresor de tumores RB, se observa en el 35% de los pacientes con glioblastoma y hasta en un 15% de los casos se encuentra amplificación del gen CDK4 (Failyly *et. al.*, 2007).

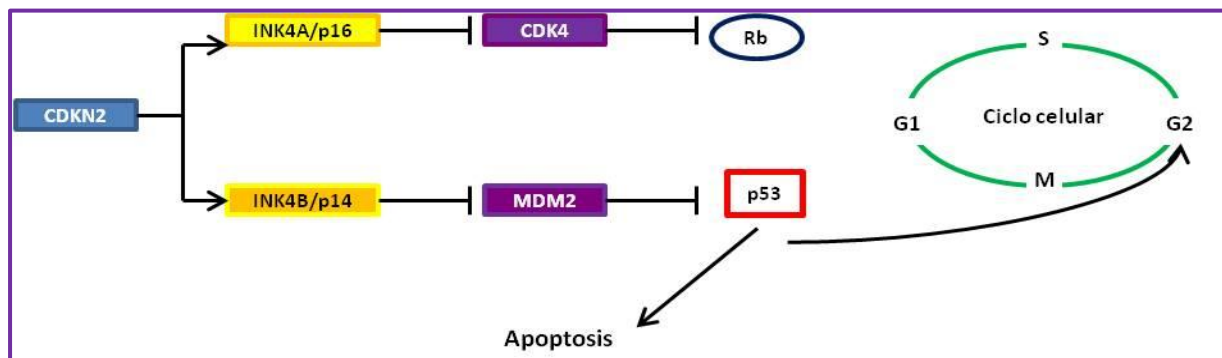


Figura 3 Mecanismos de CDKN2 a través de INK4A/p16 y INK4B/p14.

Las alteraciones en genes que intervienen en la vía del retinoblastoma INK4A- CDK4-Rb, aparecen hasta en el 80% de los Glioblastomas multiformes y en un 50% de los astrocitomas anaplásicos y son excluyentes por lo que cualquier mutación dentro de la vía tiene efectos equivalentes. El 20% restante de los astrocitomas de alto grado muestran incremento de la expresión de CDK6, Ciclina E y Ciclina D1 o baja expresión de E2F (Ueki, 1996).

Estudios genéticos demuestran que los procesos de iniciación y progresión tumoral presentes en astrocitomas de alto grado están también presentes en el GBM primario, sin embargo el carácter de progresión rápida de estos tumores implica diferencias. Las mutaciones en el gen CDKN2, la mayoría pérdidas homocigotas, son más frecuentes en el 40% de los glioblastomas primarios y en un 4% de los glioblastomas secundarios a diferencia de las mutaciones de p53, que se detectan en el 60% de los Glioblastomas secundarios contra el 10% de los gliomas primarios (Zheng, et.al., 2008).

La manifestación rápida de Glioblastomas primarios se podría explicar por pérdidas homocigotas del locus de CDKN2(regulador del ciclo celular) que afectarían la función tanto de INK4A/p16 como ARF/p14 desregulando así las rutas de p53 y RB (Ohgaki, et.al.,2004). Se ha correlacionado también con la evolución final de los tumores cerebrales la expresión del antígeno nuclear Ki-67. La supervivencia a 5 años es del 33.7% para niños con expresión de KI-67 menores al 18% (Tan, P-H. *et. al* 2005).

Por otra parte, se ha encontrado que el EGFR está sobre-expresado en el 40-60% de los GBM, razón por la cual se están diseñando nuevos esquemas terapéuticos cuya diana es EGFR, como ETB y gefetinib. El 40% de los GBM primarios presentan amplificación del gen que codifica para el receptor del Factor de Crecimiento Epidermal, mientras que esta alteración es poco frecuente en los glioblastomas secundarios. Además en muchos de estos tumores se detectan reordenamientos intragénicos que generan una proteína truncada que está activa continuamente EGFRVIII. El aumento en la expresión del EGFRVIII confiere una ventaja de crecimiento para la célula tumoral (Sugawa *et.al.*, 1990 y Van der Valk, *et.al.*, 1997).

En un 40-45% de los GBM primarios se objetiva mutación del gen PTEN, siendo más frecuente que en los secundarios. Dicha mutación se relaciona con un peor pronóstico en un subconjunto de pacientes. La combinación de la amplificación gen EGFR y pérdida de heterocigosidad (LOH) del cromosoma 10, son de peor pronóstico para los pacientes (Rong *et.al.*, 2005).

La pérdida del brazo largo del cromosoma 10 es la alteración más común asociada a Glioblastomas multiformes primarios. La pérdida de uno de los alelos de PTEN se presenta en más del 30% de los glioblastomas *de novo* pero es raro en Glioblastomas secundarios (Bing-Hua y Ling-Zhi, 2009). PTEN funciona como regulador negativo de la ruta de señalización del crecimiento de PI3K-Akt. Se ha descrito la actividad de Akt1 en tumores donde PTEN es deficiente, ya que la mayoría de las mutaciones se encuentran en su dominio de actividad de fosfatasa (Schwartzbaum, *et.al.*, 2010).

- **GBM de novo:** amplificación del gen EGFR, ausencia de mutaciones del p53, más frecuente en mayores de 60 años y comportamiento más agresivo.
- **GBM secundario:** más frecuente en jóvenes, ausencia de amplificación del gen EGFR y mutación del p53.

También se considera otro evento importante la desregulación a nivel proteico, un ejemplo de este tipo de fenómenos lo ilustra la proteína transportadora de glucosa (GLUT1), cuya expresión a nivel de RNAm está incrementada, mientras que en forma de proteína se encuentra reducida dependiendo del grado tumoral como

consecuencia de errores en el plegamiento y fallas durante sus modificaciones postraduccionales la cual la convierte en una proteína no funcional (Tsukamoto *et. al* 1996).

Es importante recordar que la mayoría de los estudios de tumores del sistema nervioso central se refieren a pacientes adultos, aún son escasas las investigaciones en niños, sin embargo se sabe que existen diferencias entre ambos grupos como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3 Alteraciones moleculares más frecuentes en Astrocitomas

Alteraciones moleculares	% gliomas adulto	% gliomas del niño
Amplificación EGFR	30-40	5-6
Sobre-expresión EGFR	30-40	80-85
Amplificación PDGFR	10-15	8-10
Mutaciones TP53	30-35	30-35
Mutaciones Rb	70-85	10-25
Mutaciones PTEN	20-30	12-17
Inestabilidad de microsatélites	0-8	15-30

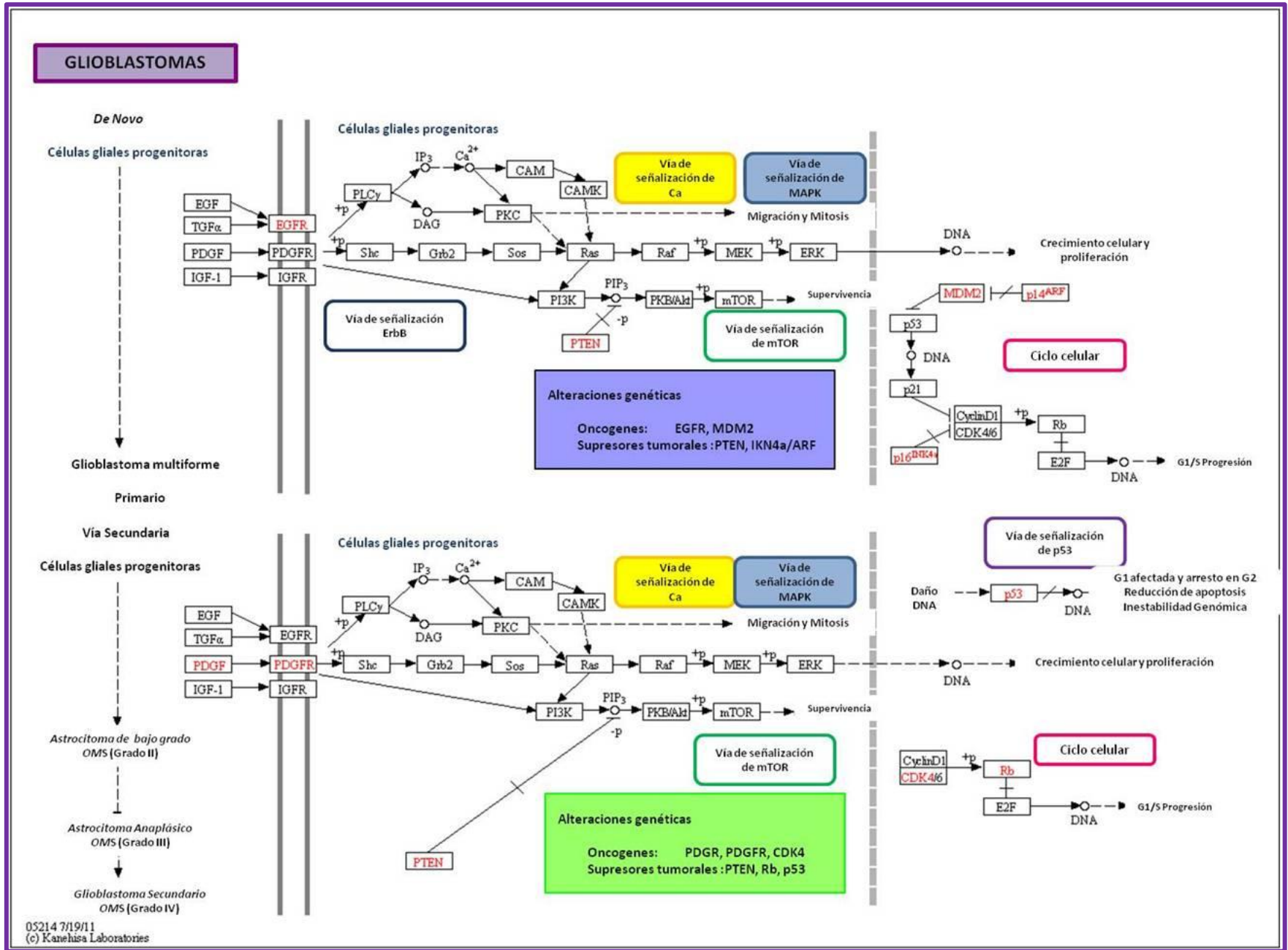
Estas diferencias denotan la importancia de estudiar a pacientes pediátricos de la población mexicana para poder determinar o sugerir un panel más específico de genes alterados que puedan utilizarse como marcadores moleculares de esta patología, sin olvidar que un marcador debe cumplir con ciertas características, porque deben ser moléculas que se pueden identificar y caracterizar fácilmente que definan un genotipo determinado y que permitan la asociación de genotipos con fenotipos específicos.

Lo anteriormente mencionado deja en evidencia que hasta el momento se han descrito diferentes mecanismos que dan lugar a tumores del SNC, así como, dos vías principales de las cuales depende el tipo de tumor generado, los eventos genéticos más frecuentes en los Astrocitomas y la acumulación de alteraciones genéticas necesarias para la evolución de dichos tumores a otros de alto grado de malignidad, las cuales se resumen en la figura 4 (KEGG, 2011).

Mostrando la importancia de buscar algunos genes y proteínas que nos permitan identificar diferencias entre los diferentes estadios para que el análisis de éstos pueda ser incluido en los estudios realizados a los pacientes que ingresen al Hospital de Pediatría de CMN, SXXI con diagnóstico o sospecha de Astrocitoma; se han planteado proyectos que permitan elegir posibles genes que puedan funcionar como marcadores moleculares. Tal es el caso de EGFR el cual como ya se ha mencionado se encuentra sobre-expresado en la mayoría de los astrocitomas pediátricos, el gen AKT1 que está involucrado en la proliferación celular, cuya sobre-expresión también ha sido reportada en este tipo de patologías y finalmente CD133 que se encuentra involucrado en la diferenciación celular, evento que se ve alterado en las neoplasias.

Figura 4. Génesis molecular de los Glioblastomas de novo y Secundarios (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes "KEGG")

Sci. Atlas Amelaki Stadilla Suarez



2.6. RECEPTOR DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDERMAL (EGFR)

Los factores de crecimiento pertenecen a una familia de polipéptidos que se unen a sus correspondientes receptores y estimulan la proliferación y diferenciación celular tanto en las células normales como en las malignas. Uno de los receptores de factores de crecimiento cuya unión a su ligando específico lleva a la proliferación celular es EGFR (HGNC:3236). El gen que codifica esta proteína se localiza en el cromosoma 7 en la región 7p11.2 (Figura 5), presenta 30 exones dentro de los cuales se distribuyen 188 281 pb y de éstas únicamente 3 630 pb forman parte del transcrito que dará lugar a la proteína (Ensembl:ENSG00000146648).

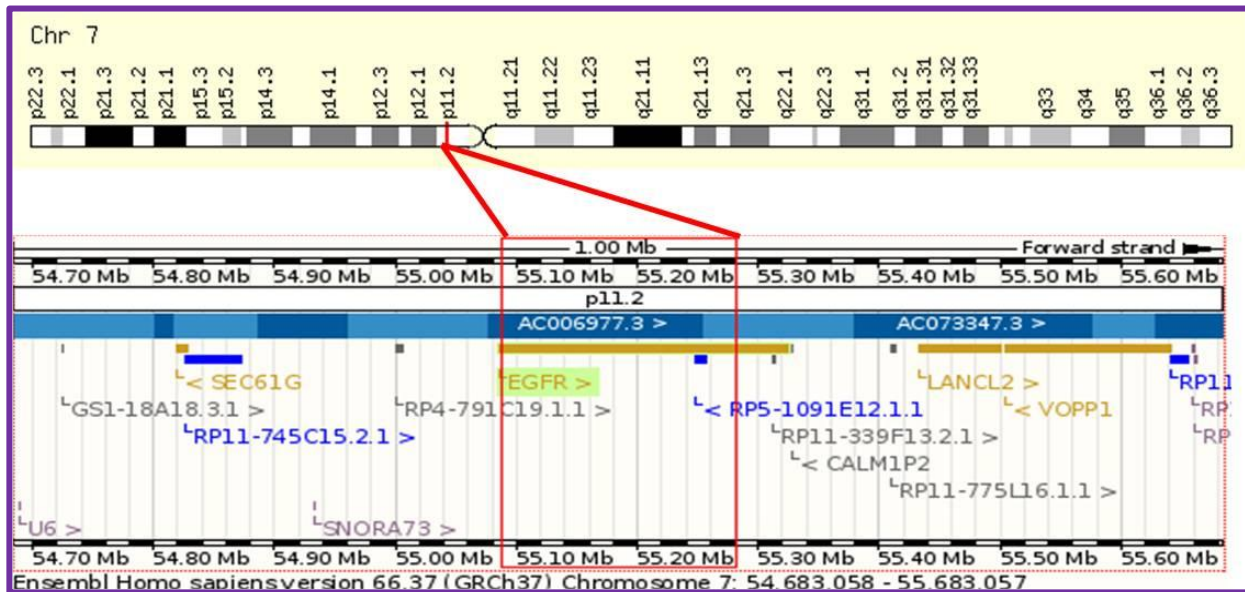


Figura 5 Localización del gen EGFR en el cromosoma 7 (Ensembl 2012)

El producto del gen del EGFR es un polipéptido constituido por 1 210 aminoácidos cuyo peso molecular es de 170 kDa y su producto se localiza en la superficie celular de la mayoría de las células. La estructura secundaria de esta proteína incluye 26 Hélices α , 50 láminas β y 15 giros o "loops" (Figura 6). Es importante mencionar que la presencia de las hélices α en este polipéptido facilitarían la inserción de esta molécula en la membrana celular (dominios transmembranales) (Jura, *et.al.*, 2009).



Figura 6 Estructura secundaria de EGFR

La proteína consta de tres dominios: Dominio extracelular de unión al ligando que está constituido por cuatro subdominios, de los cuales el dominio III es el responsable de la unión al ligando. Dominio transmembrana que contiene una secuencia de carácter hidrofóbico gracias a la cual atraviesa la membrana. Dominio intracelular en el que reside la actividad tirosina cinasa del receptor y que también es el encargado de la regulación negativa del receptor. Por otra parte, se han descrito cinco sitios de autofosforilación, necesarios para la internalización del receptor tras la unión del ligando (Lu, *et.al.*, 2010).

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

El receptor de EGF es estable e inactivo en su forma CDK / Src debido a la mutación de un residuo de lisina catalítica su conformación es similar a la forma activa, esta proteína exhibe sus restos hidrófobos en el extremo N-terminal que se muestra en el punto magenta de la Figura 7. Las CDK están sujetas a la activación alostérica por ciclinas (a). Durante la activación, estos residuos hidrófobos quedan expuestas, creando una interfase a la que se unen activadores alostéricos de estas cinasas. En el caso del receptor de EGF, el dominio cinasa (activador de cinasa) se convierte en un activador del receptor mediante la formación de un dímero de cabeza y cola asimétrica (b) (Jura, et.al., 2011).

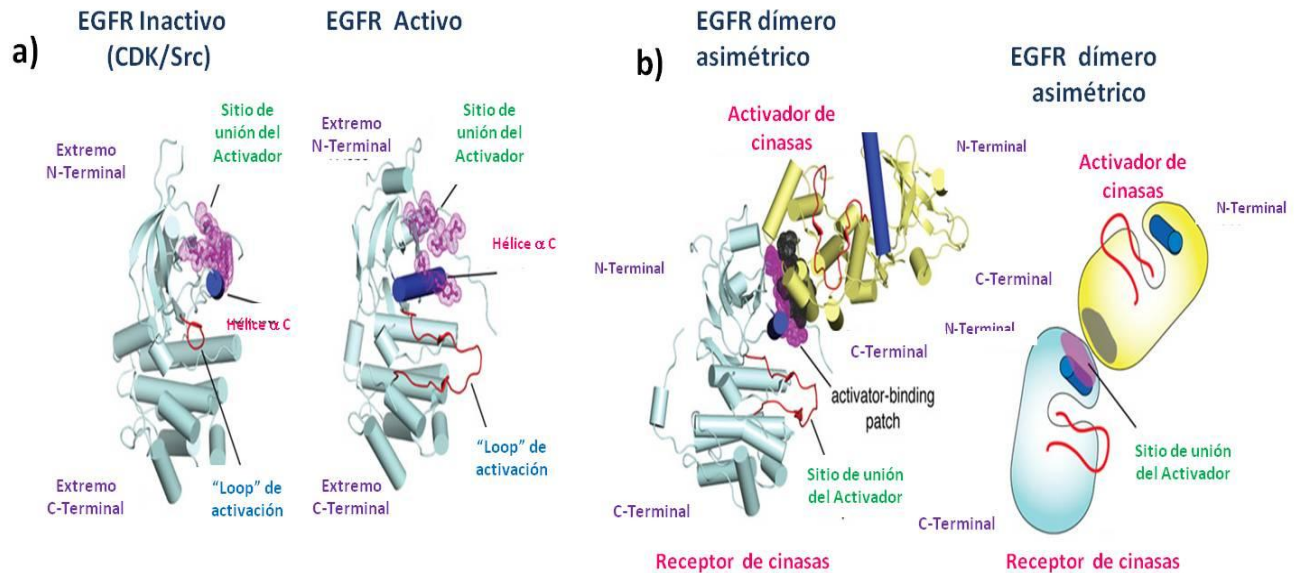


Figura 7. Proteína EGFR activa e inactiva.

La unión del ligando al EGFR induce cambios conformacionales en el receptor y la homo o la heterodimerización, activando la tirosina cinasa intracelular, y conduciendo a la autofosforilación de los principales residuos citoplasmáticos, necesaria para su actividad biológica (Zhang X, et.al., 2007). El receptor fosforilado recluta proteínas adaptadoras, como GRB2 que a su vez activa río abajo complejas cascadas de señalización. Activa por lo menos 4 grandes cascadas de señalización, incluyendo RAS-RAF-MEK-ERK, AKT-cinasa PI3, PLC gamma PKC. También fosforila otras proteínas, como Rgs16, utilizando su actividad GTPasa, también fosforila a MUC1 y aumenta su interacción con SRC y CTNNB1/beta-catenina (Li, et.al., 2001).

Los principales ligandos del EGFR son el factor de crecimiento epitelial EGF y el TGF α ; sin embargo, se han descrito varios ligandos como anfiregulina, EPIGEN / EPGN, la CTB / betacelulina, epirregulina / EREG y HBEGF / EGF de unión a heparina; los cuales son capaces de activar al EGFR por vía auto- o paracrina mientras permanecen unidos a la membrana (Arcaro, et. al., 2000). La autofosforilación del extremo C-terminal remueve un sustrato inhibitor y permite el acceso de otros sustratos celulares al dominio tirosín cinasa (Yarden Y, 2001 y Zhang X, et.al., 2007).

La tirosín cinasa activada del EGFR fosforila a un amplio número de sustratos celulares entre los que se incluyen la fosfolipasa-C; (PLC-MAPK (proteína cinasa mitogénica) y GAP (ras GTPasa-proteína activada). La activación de la PLC; lleva a la liberación de Ca^{2+} de los compartimentos intracelulares y se genera diacilglicerol que activa a la proteína kinasa C (PKC), que es una serina treonina proteína cinasa que hace que el receptor se deslocalice. También Ras puede ser activada por la tirosina cinasa del EGFR y esto conduce a la proliferación celular y a la síntesis de DNA (Ver figura 8). En esta vía están incluidos un amplio número de factores de transcripción nucleares y otros factores proteicos. La tirosina cinasa también es la responsable de la progresión del ciclo celular de fase G1 a fase S.

La proteína EGFR Puede formar heterodímeros con ErbB2 por lo que puede formar parte de este complejo y de PIK3C2A o PIK3C2B. La interacción con ERFF11, inhibe la dimerización del dominio de la cinasa y por tanto la autofosforilación (Jura, *et.al.*, 2011). Se ha descrito su interacción con GAB2 y GRB2, está última es una proteína adaptadora que permite el acoplamiento del receptor hacia diferentes vías de señalización. La interacción con STAT3 regula corriente abajo el proceso de proliferación celular. Mientras que la interacción con RIPK1, provoca la activación de NF-kappa-B (Habib, *et.al.*, 2001).

La metilación de EGFR mejora la interacción con PTPN6 para fosforilarlo, esta unión inhibe la activación del complejo MAPK / ERK dependiente de EGFR (Ogiso, *et.al.*, 2002). La interacción con COP1 es relevante, ya que esta es esencial para la regulación de EGF dependiente del transporte nuclear de EGFR por el transporte retrógrado desde el aparato de Golgi al retículo endoplásmico (Wang, *et. al.*, 2010).

Finalmente, como reguladores negativos de esta proteína se han descrito tres moléculas principalmente. Cbl provoca la ubiquitinación de EGFR y por tanto está involucrada en la normalización de los niveles de la proteína (Gur, *et.al.*, 2004). La ubiquitinación del receptor de EGF ha sido relacionada con la internalización de su señal y la degradación lisosomal. La mutación de los sitios de ubiquitinación de EGFR ha sido identificada por espectrometría de masas, estas mutaciones inhiben la actividad cinasa de EGFR, lo que conduce a la inhibición de la internalización de su señal. Sin embargo, la proteína mutante (15KR) que sufre defectos en el proceso de ubiquitinización, si es interiorizada en una tasa similar a la de la proteína EGFR de tipo silvestre aunque requiere de la presencia de la clatrina, del adaptador GRB2 y de la ubiquitina ligasa Cbl es decir que el proceso de internalización de EGFR, puede ser controlado por las cinasas y por la ubiquitinación dependiente e independiente (Huang, *et.al.*, 2007).

Sin embargo, también SOCS5 regula la degradación de EGFR mediante TCEB1 (ubiquitinación) y TCEB2 (degradación proteasomal) (Zhang X., *et.al.*, 2007). La expresión de SOCS5 conduce a una marcada reducción en los niveles de expresión de EGFR mediante la promoción de la degradación de EGFR. La reducción en los niveles de EGFR y la señalización inducida por EGF en células que expresan SOCS5 requiere tanto los dominios de homología Src BOX-2 y SOCS de SOCS5. Curiosamente, el EGFR es degradada por SOCS5 antes de la unión de EGF con un ligando y de manera independiente a c-Cbl. SOCS5 puede asociarse con EGFR y contratar a la ubiquitina ligasa E3 para promover la degradación del EGFR manteniendo la homeostasis del EGFR (Kario, *et.al.*, 2005).

El complejo ligando-receptor activo es endocitado y degradado en los lisosomas o reciclado a la membrana plasmática. La endocitosis y degradación del receptor forman parte de la regulación negativa de la señal transducida por EGFR. Para que EGFR sea endocitado se requiere un dominio regulador en el extremo C-terminal de la región intracelular del receptor (Tarcic, *et.al.*, 2009).

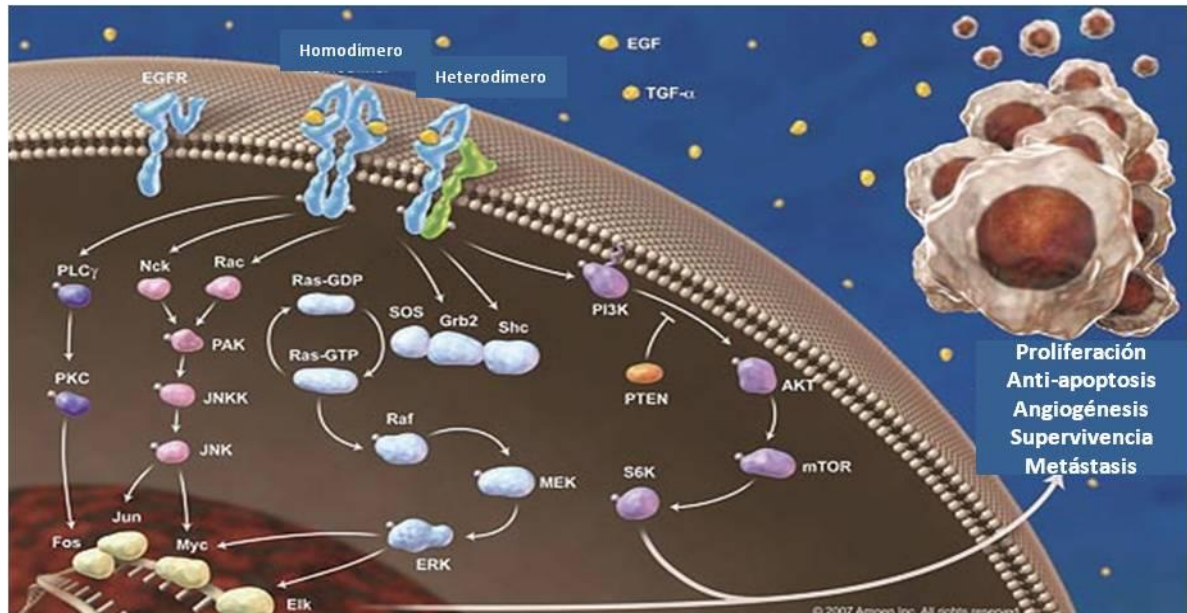


Figura 8. Principales Vías de Señalización de EGFR

El gen del EGFR se encuentra amplificado en aproximadamente el 40% de los glioblastomas. En la mitad de los casos donde no hay amplificación del gen se dan reordenamientos dando lugar a transcritos y proteínas aberrantes (Van der Valk, *et.al.*, 1997).

2.7. ONCOGEN HOMÓLOGO AL THYMOMA VIRAL MURINO (AKT1)

Dentro de la familia de proteínas cinasa B, se han descrito tres proteínas que son codificadas en los humanos por genes diferentes: AKT1, AKT2 y AKT3. Estas proteínas desempeñan un papel importante en la señalización celular en mamíferos. Estas enzimas pertenecen a la superfamilia de las serina / treonina proteína cinasas no específicas (Heron-Milhavet, *et.al.*, 2011). El primer gen descrito fue AKT1 (HGNC: 391) el cual se localiza en la región cromosómica 14q32.32-q32.33 (Ver figura 9), está constituido por 26,396pb dispuestas en 15 exones, no obstante sólo 2,761pb forman parte del mRNA. Se han encontrado para este gen múltiples variantes como consecuencia de “splicing” alternativo (Ensembl:ENSG00000142208).

Las cinasas poseen un dominio catalítico común, de 250 a 300 aminoácidos. Este dominio contiene claves aminoácidos conservados entre las cinasas y se cree que desempeñan un papel esencial en la catálisis (Jones, *et.al.*, 1991). La serina-treonina proteína cinasa codificada por el gen AKT1 se encuentra catalíticamente inactivo en suero y en fibroblastos inmortalizados. AKT1 y AKT2 son activados por el factor de

crecimiento derivado de plaquetas (PDGF; esta activación es rápida y específica, y se suprime por mutaciones en el dominio de homología de pleckstrin de AKT1 (Franke, *et.al.*, 1995).

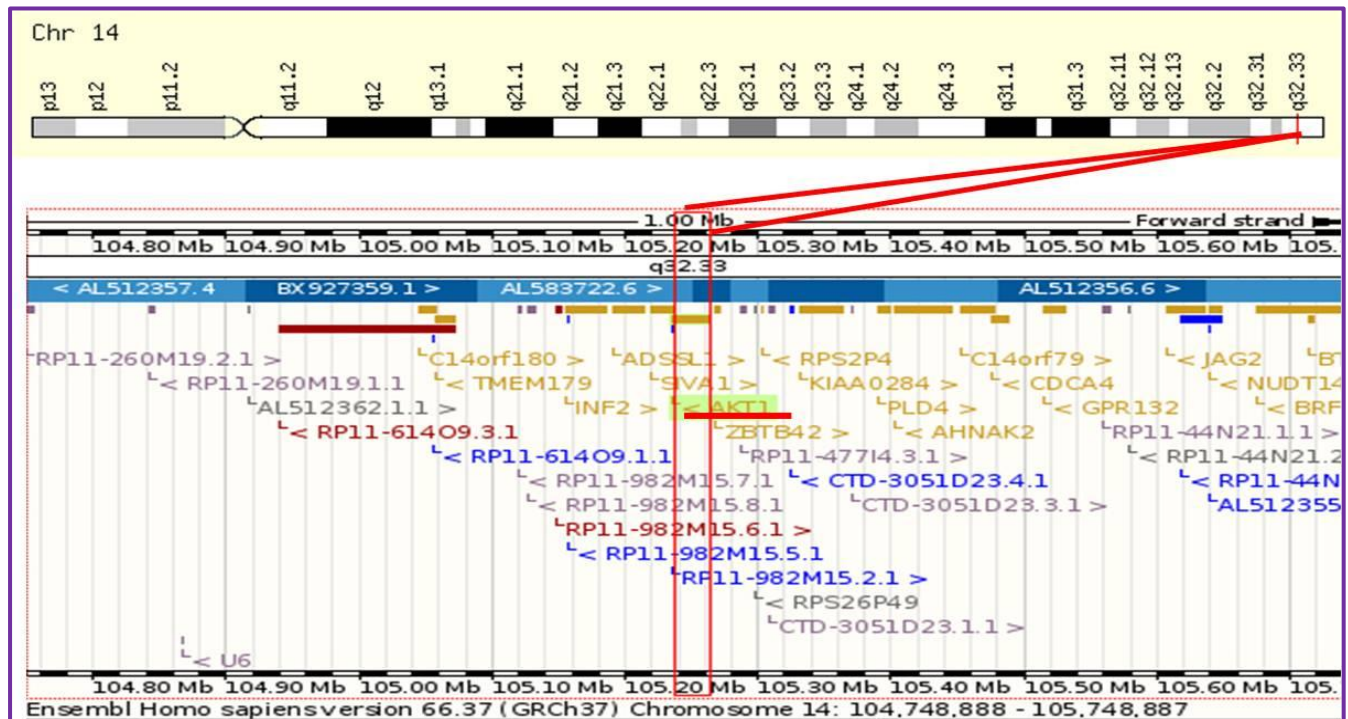


Figura 9. Localización de AKT1 en el cromosoma 14.

La proteína AKT 1 está formada por 480 aa y su peso molecular es de 60 kDa, dentro de su estructura secundaria se han descrito muchas hélices α (Ver figura 10). Posee dominios PH, dominio con homología a la Pleckstrina. Estos dominios se unen con alta afinidad a los fosoinositoles PIP3 (fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato) y al PIP2 (fosfatidilinositol 3,4-bisfosfato) y presenta en su mayoría sitios hidrofóbicos (Carpten, *et.al.*, 2007). La proteína presenta 17 hélices α , 15 láminas β y 2 giros o “loops”.



Figura 10. Estructura secundaria de la proteína AKT1 (Ensembl).

Al activarse un receptor acoplado a la proteína G o un receptor tirosina cinasa tal como un receptor de insulina (RI), activan a la fosoinositol 3-cinasa (PI3K) que va a fosforilar PIP2 para formar PIP3. En la figura 11 se observa en azul fuerte los aac hidrofílicos los cuales son minoría y están dispuestos hacia el exterior de la proteína, y en el interior de la molécula en magenta y azul agua, dos de los sitios principales en los que se une AKT1 con sus diversos sustratos, es importante recalcar que la proteína posee aproximadamente 5 diferentes

sitios de unión a ligandos y depende de la conformación que tome la proteína estarán disponibles, por otra parte el tamaño de AKT1 facilita su desplazamiento dentro de la célula.

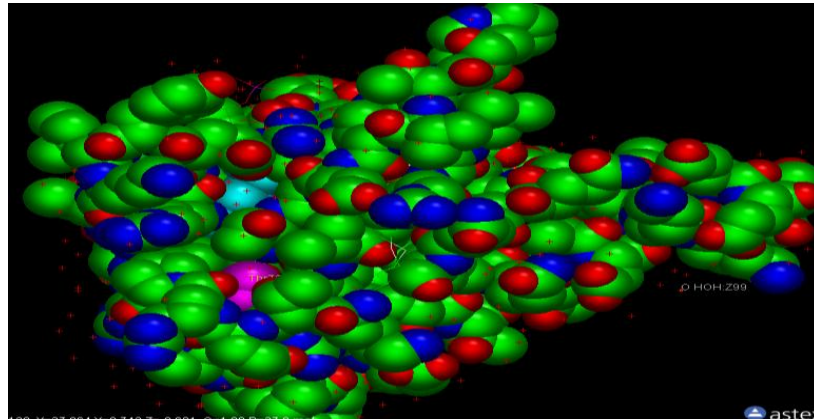


Figura 11 Proteína AKT1 visualizada con PDB.Viewer

AKT1 está involucrada directamente con las en cascadas de señalización que regulan la supervivencia celular, en la inhibición de procesos apoptóticos, en la señalización de la insulina, la angiogénesis y además es clave en la patogénesis de enfermedades degenerativas como la hipertrofia del músculo esquelético (crecimiento de tejido). También AKT1 está implicada como principal factor de muchos tipos de cáncer (fue originalmente reconocida como un oncogen en retrovirus). Se ha reportado que las respuestas biológicas que darán las células depende del sustrato que se una a AKT, el sustrato será el responsable de desencadenar el proceso de muerte celular o el de supervivencia (Franke, *et.al.*, 2003).

La proteína codificada por el gen AKT1 es catalíticamente inactiva en suero y en fibroblastos inmortalizados. AKT1 puede ser activada por el factor de crecimiento derivado de plaquetas. La activación es rápida y específica, se inhibe por mutaciones en el dominio de homología a Pleckstrina. Se ha demostrado que la activación se produce a través de PI3K; por lo que AKT1 se considera mediadora río abajo de esta vía, la cual se desencadena con el reclutamiento de AKT1 a la membrana plasmática a través de su dominio PH (Ver figura 12)(Fan, *et.al.*, 2006). La proteína es activada por la fosforilación en dos sitios clave, (Ser308) fosforilada por PDK1 y (Thr478) fosforilada por la mTOR y ADN-PK (Sarbasov, *et.al.*, 2005).

No obstante no sólo es mediador del factor PDGF, por que se han presentado evidencias de su actividad a través de otros factores de crecimiento tales como EGF e IGF-1, de igual forma se han reportado más de 100 posibles sustratos para esta proteína. AKT1 controla efectos antiapoptóticos de IGF-1, regula negativamente la cascada de JNK; participa en la biosíntesis de óxido nítrico, juega un papel importante en el transporte de glucosa por la translocación del SLC2A4/GLUT4 a la superficie celular mediada por la insulina inducida (Alessi, *et.al.*, 1996).

La fosforilación de PTPN1 en la (Ser-50) modula negativamente la actividad de fosfatasa de AKT1 previniendo la desfosforilación de los receptor de insulina y por tanto la atenuación de la señalización de la misma. La fosforilación de TBC1D4 desencadena la unión de este efector a proteínas inhibitoras, evento que se requiere para que se estimule el transporte de glucosa (Kane, *et.al.*, 2002).

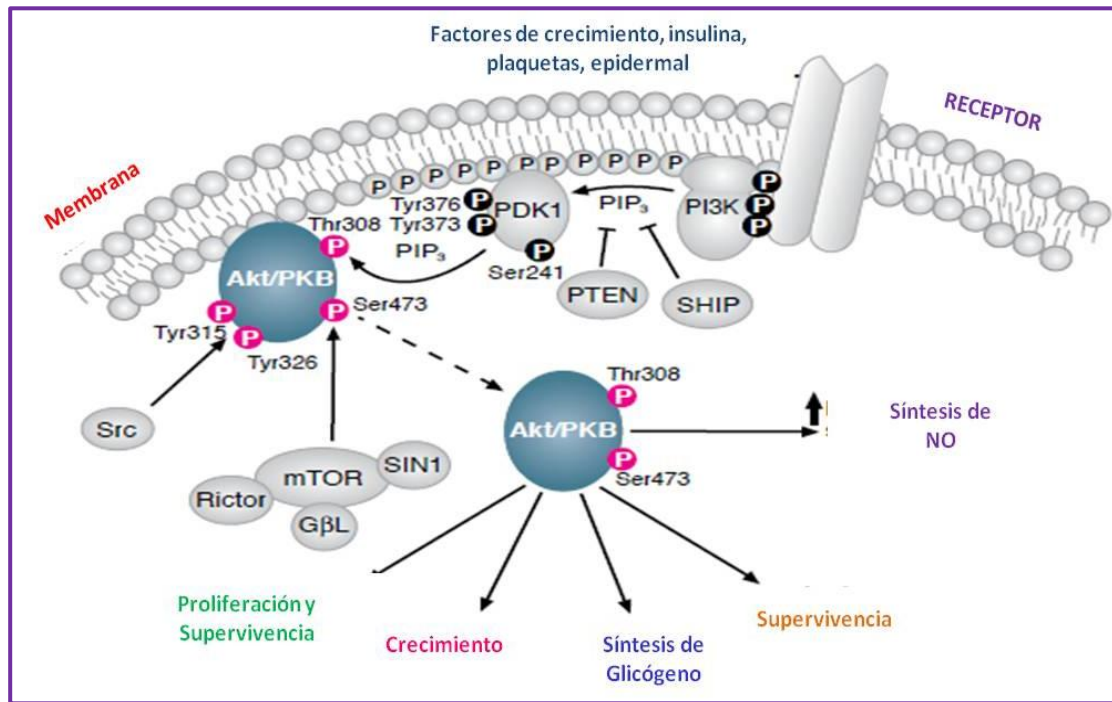


Figura 12. Vía de Señalización de AKT1.

AKT regula también el almacenamiento de glucosa en forma de glicógeno mediante la fosforilación de GSK3A en (Ser-21) y GSK3B en la (Ser-9), ocasionando la inhibición de su actividad como cinasa. Se ha sugerido que la fosforilación de la GSK3 por AKT también es un mecanismo que conduce la proliferación celular al activar diversos factores de crecimiento (Franke, *et.al.*, 2003).

El mecanismo de supervivencia celular puede ser mediado por AKT1 a través de la fosforilación de MAP3K5 (vía de señalización de apoptosis). La fosforilación de (Ser-83) disminuye la actividad de MAP3K5 estimulada por el estrés oxidativo y por lo tanto previene la apoptosis. Factores de supervivencia pueden suprimir la apoptosis de una manera independiente de la transcripción mediante la activación de AKT1, que a su vez fosforila e inactiva a los componentes de la maquinaria apoptótica. Es esencial para la regulación mediada por SPATA13 y por tanto interviene en la migración celular y en los mecanismos de adhesión (Kim, *et.al.*, 2001).

AKT está involucrada en la fosforilación de los miembros de los factores FOXO (familia "Forkhead"), que conduce a la unión de las proteínas 14-3-3 y a la localización citoplasmática; en particular, FOXO1 es fosforilada en (Thr-24), (Ser-256) y en (Ser 319-) mientras que FOXO3 y FOXO4 son fosforilados en sitios equivalentes (Jang, *et.al.*, 2007).

AKT tiene un papel importante en la regulación de la transcripción del gen NF-kappa-B-dependiente y regula positivamente la actividad de CREB1, AMP cíclico (AMPc). La fosforilación de CREB1 induce la unión de proteínas accesorias que son necesarias para la transcripción de genes de supervivencia como BCL2 y MCL1. AKT fosforila a ATP citrato ACLY en la (Ser-454), regulando su actividad y la síntesis de ácidos grasos. Activa la isoforma 3B de la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos PDE3B a través de la fosforilación de (Ser-273), dando como resultado la reducción de los niveles de AMP cíclico y la inhibición de la lipólisis (Duffy y Montminy, 1998).

En el desarrollo del sistema nervioso AKT1 es un mediador crítico de factor de crecimiento que induce la supervivencia neuronal. Estos factores pueden suprimir la apoptosis de forma independiente a través de la activación AKT1, que se fosforila e inactiva componentes del maquinaria apoptótica, favoreciendo posteriormente procesos de diferenciación.

AKT1 funciona como modulador clave de la vía de señalización Akt-mTOR por lo que controla el ritmo del proceso de la integración neuronal en el recién nacido y durante la neurogénesis adulta, el desarrollo dendrítico y la formación de sinapsis. Lo anteriormente mencionado deja en claro la importancia de esta molécula en el SNC pero sobre todo en la génesis de algunas patologías por las vías de señalización que desencadena (Jiang *et.al.*, 2009).

2.8. PROTEÍNA SIMILAR A LA PROMINA 1 (PROM1 o CD133)

El gen PROM1 también conocido como CD133 (HGNC: 9454) se localiza en el brazo corto del cromosoma 4, en la región 4p15.32, presenta 29 exones y un total de 115,775 pb de las cuales únicamente 4,257 bp codifican para la proteína (Ver figura 13). Este gen se expresa a partir de al menos cinco promotores alternativos que son dependientes del tejido o dicho de otra forma tejido específico. Se han descrito 21 variantes o isoformas del gen. Generalmente se expresa en las células madre, donde se cree que interviene en la supresión de la diferenciación y proliferación celular, la expresión de este gen también está asociada con varios tipos de cáncer. (Ensembl:ENSG00000007062).

Este gen codifica para una glicoproteína transmembranal pentaspan de 865 aa que tiene un peso aproximado 112.443 g/mol y un punto isoeléctrico de 6,97 y una carga de 7.29. La proteína se localiza en la membrana plasmática apical de las células epiteliales por lo que es considerado un marcador de la superficie celular reconocido por AC133. Se ha propuesto como un regulador clave Durante los primeros estadios del desarrollo de la retina y de la morfogénesis del disco. Participa en la regulación de las vías de señalización MAPK y Akt. En células de neuroblastoma suprime la diferenciación celular e inhibe el crecimiento de neuritas en una manera dependiente de RET (Lehnus, *et.al.*, 2013).

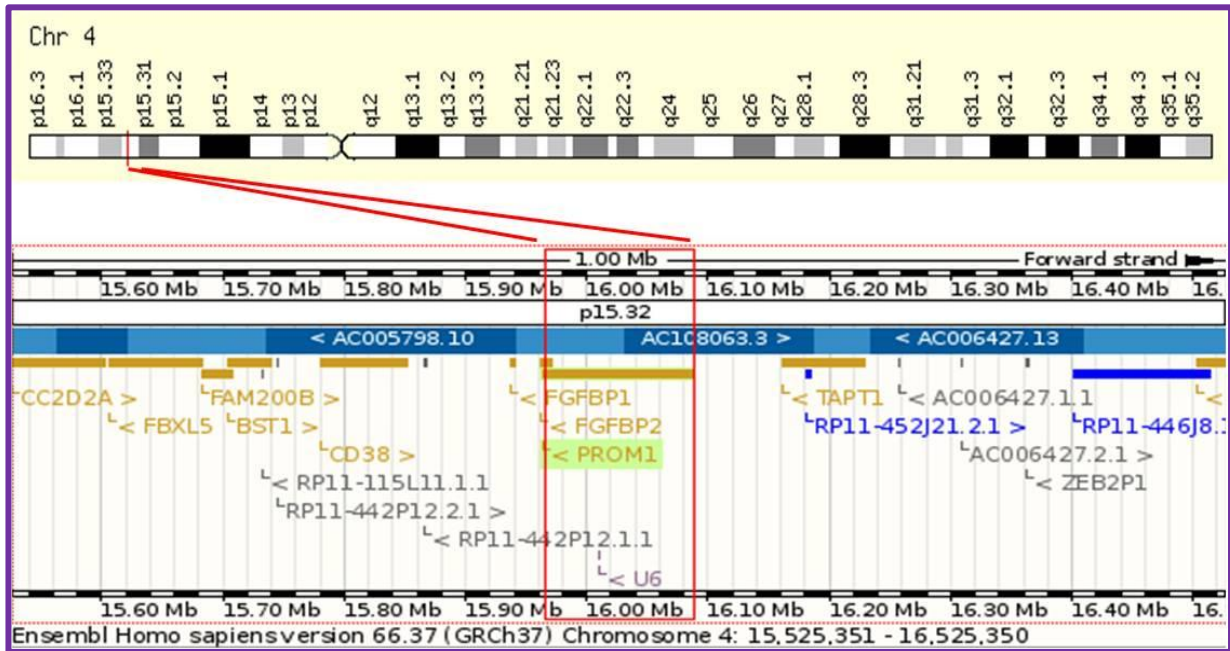


Figura 13. Localización de PROM1 en el cromosoma 4 (Ensembl).

Esta proteína presenta cinco dominios transmembranales de los cuales dos son helicoidales con una configuración de enlaces de hidrógeno alfa-, 3-10 -, y hélices π , mientras que el número de láminas β es bajo debido al predominio de “loops” o giros (Ver figura 14). Presenta ocho sitios de glicosilación y tres sitios de fosforilación. Se liga el colesterol en microdominios de la membrana plasmática (Triángulo blanco y Rojo , figura 14).

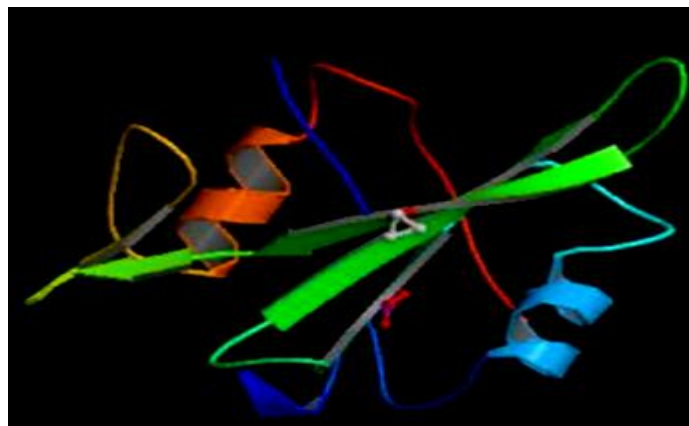


Figura 14. Estructura de la proteína PROM1 visualizada con PDBiewer.

La expresión de este gen también está asociada con varios tipos de cáncer. Interactúa de manera selectiva y no covalente con actinina por lo que juega un papel importante en el arreglo celular, también está implicada en la adhesión celular al interactuar con cadherina la cual sufre modificaciones en células neoplásicas para dar lugar a la metástasis (Rath, *et.al.*, 2013). CD133 es considerado un marcador de NNSC y GBM. Se ha correlacionado la expresión de este gen con el incremento de actividad de catepsinas ya que las células que expresan CD133 e incremento en esta clase de proteasas tienen mayor potencial migratorio ocasionando

el comportamiento invasivo característico en los gliomas, por lo que también es considerado un marcador pronóstico de supervivencia para los pacientes con GBM (Ardebili, et.al., 2011).

CD133 desempeña un papel en la organización de la membrana plasmática apical de las células epiteliales. Durante el desarrollo de la retina temprana actúa como un regulador clave de la morfogénesis del disco. Participa en la regulación de las vías MAPK y AKT1. En las células de neuroblastoma suprime la diferenciación celular, tales como el crecimiento neurítico de forma dependiente a RET (Takenobu *et.al.*, 2011)

Se ha descrito que la isoforma 1 se expresa selectivamente en células madre hematopoyéticas CD34, en el hígado del feto, la sangre del cordón umbilical, en sangre periférica de adultos y en las células progenitoras de médula ósea tanto de adultos como de fetos. No obstante también se expresa en una serie de tejidos no linfoides, incluyendo la retina, páncreas, placenta, riñón, pulmón cerebro y el corazón.

La Isoforma 2 se expresa predominantemente en los fetos en el hígado, el músculo esquelético, el riñón, la placenta y en adultos en el corazón, el páncreas, el pulmón, hígado, así como en células madre hematopoyéticas y en las células epidérmicas basales. La expresión de esta isoforma es relativamente baja en la médula ósea, y apenas detectable en la sangre periférica. La proteína se expresa en la retina de los adultos en las células fotorreceptoras (Mizrak, et.al., 2008).

Las alteraciones en CD133 son la causa de diferentes patologías ópticas dentro de las que destacan: la RP41, CORD12, MCDR2 y la enfermedad de Stargardt. La retinitis pigmentosa tipo 41 (RP41) también conocido como degeneración retinal dependiente de prominina sigue un patrón de herencia autosómica recesiva. RP es una distrofia retiniana, perteneciente al grupo de las retinopatías pigmentarias, se caracteriza por depósitos de pigmento retiniano visible en el examen del fondo de ojo y la pérdida principal de los bastones seguida por la pérdida secundaria de los conos. A medida que la enfermedad avanza, pierden el campo visual y la visión periférica (Zhang Q, et.al., 2007).

Los defectos en el gen PROM1 también se han asociado a la distrofia hereditaria de conos y bastones (CORD12) caracterizada por depósitos de pigmento retiniano visible en el examen del fondo de ojo, sobre todo en la región macular y la pérdida inicial de foto-receptores de los conos seguidos por la degeneración varilla. Esto conduce a la disminución de la agudeza visual y la sensibilidad en el campo visual central. Pérdida severa de la visión se produce antes que en la retinitis pigmentosa (Maw, *et.al.*, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de marcadores moleculares se ha convertido en una gran herramienta en diversas patologías debido a que permiten mejorar los diagnósticos. Dichos marcadores son moléculas como proteínas y genes cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable (fenotipo), que puede detectarse fácilmente.

Los marcadores de DNA constituyen una generación diferente de marcadores moleculares porque no son afectados por el ambiente, están presentes en cualquier estadio del individuo, permiten una detección temprana, se requiere poca cantidad de DNA para los análisis y permiten conocer o distinguir diferentes entidades patológicas y el factor de riesgo de cada paciente.

Para el caso del cáncer ha sido necesario analizar algunos genes que se expresan de forma diferente en las células afectadas y en las células normales los cuales son denominados marcadores tumorales. Son sustancias que se pueden encontrar en cantidades anormales en la sangre, orina o tejidos de algunos pacientes con cáncer por lo que pueden usarse para ayudar a diagnosticar el cáncer, predecir cómo responderá el paciente a algunas terapias en particular, verificar cómo responde el paciente al tratamiento o determinar si el cáncer ha regresado. Sin embargo, no se pueden usar solamente los marcadores tumorales para diagnosticar el cáncer; deben usarse junto con otras pruebas.

Gracias al avance de las tecnologías de diagnóstico se han incrementando el número de casos reportados al año. Esta situación es de vital importancia debido a que los cánceres en niños presentan una velocidad de progresión tumoral mayor como consecuencia de las características metabólicas propias de la infancia (Yong. et. al 2004). La desregulación de la proliferación celular y supresión de la apoptosis permiten la progresión neoplásica, por lo que es fundamental identificar las diferencias en la expresión de los genes relacionados con estas rutas; por las repercusiones terapéuticas de estas discrepancias.

Es necesario recordar que los avances de la inmunohistoquímica y de la genética molecular brindan la posibilidad de estudiar mejor este tipo de tumores para encontrar nuevos marcadores pronósticos y blancos terapéuticos si se pretende mejorar la práctica médica y con ello incrementar los niveles de supervivencia de los pacientes.

4. HIPÓTESIS

-Se observará sobreexpresión en los genes relacionados con la proliferación celular (CD133 y EGFR), mientras que los relacionados con apoptosis (AKT1) se encontrarán disminuidos o ausentes conforme incrementa el grado tumoral en astrocitomas pediátricos.

5. OBJETIVOS

-Analizar la expresión de los genes PROM1, AKT1, y EGFR relacionados con diversas vías celulares relacionadas con cáncer y compararla entre tumores astrocíticos de alto y bajo grado a nivel de mRNA y proteína.

5.2OBJETIVOS PARTICULARES

-Analizar los patrones de expresión de genes asociados a proliferación y apoptosis a nivel de (mRNA) mediante qRT-PCR en diferentes grados de tumores astrocíticos.

-Relacionar los cambios en los patrones proteicos de cada transcrito con los grados tumorales.

6. METODOLOGÍA GENERAL

Este proyecto fue aprobado por las comisiones de bioética y de investigación del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Para la realización de este estudio se tomaron en cuenta los siguientes datos y criterios:

PQ : diagnóstico realizado por oncología clínica y anatomía patológica

Muestras: Tumores colectados durante septiembre de 2009 a agosto de 2010 (Frescos y posteriormente crioconservados).

Control Negativo: - Cerebro sano (Cultivo primario)

Control Positivo: - Líneas celulares U87 y T98G (Glioblastoma Multiforme)

6.1 CRITERIOS DE INCLUSIÓN:

1. Pacientes menores de 16 años con diagnóstico de astrocitoma establecido por el servicio de Patología del Hospital de Pediatría (HP) del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
2. Pacientes que cuentan con los datos necesarios en el expediente para la hoja de recolección.
3. Pacientes en quienes se realizó biopsia-resección y se cuenta con muestra en el banco de tumores de SNC (Sistema Nervioso Central) del HP CMN Siglo XXI.

6.2. CRITERIOS DE EXCLUSIÓN:

1. Pacientes cuyo diagnóstico no sea confirmado
2. Muestras que no hayan sido preservadas adecuadamente

6.3. CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES U87MG Y T98

Para tener controles de expresión tanto de RNA como de proteínas, se realizó una búsqueda para determinar las líneas celulares más apropiadas para el estudio. Se eligieron las líneas T98G y la U87 las cuales fueron adquiridas de ATCC. La línea celular T98G [T98-G] cuyo número de acceso es (CRL-1690™) proviene de un Glioma de grado IV de un hombre caucásico de 61 años de edad, mientras que la línea celular U87 cuyo número de acceso es (HTB-14™) procede de un Glioblastoma de hombre caucásico de 44 años.

Se procedió a descongelar las dos líneas seleccionadas, se mantuvieron a 37°C por 1min, posteriormente, se adiciono PBS ajustando el volumen a 10 ml, para ser centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. Se depositaron en cajas de cultivo celular de 25 cm² previamente humedecido con DMEM suplementado con antibiótico/antimicótico 1% y un 10% de suero fetal bovino. Se incubaron a 37°C, y con 5% de CO₂ y atmósfera húmeda cambiando el medio cada que fue necesario.

Para conocer el número de células/mL y el porcentaje de viabilidad celular se utilizó una cámara de Neubauer y como colorante de exclusión, azul de tripano 0.4%, después de ser contadas las células presentes

en 1ml se utilizo la siguiente formula, para determinar la cantidad total: $(\# \text{ cel totales})(\text{Dilución})(V_T)(10,000)$. Fue necesario seguir la cinética de crecimiento de cada línea celular, lo que permitió determinar en qué momento los cultivos fueron confluentes para las extracciones de RNA y Proteínas. Es preciso recalcar que en el momento de alcanzar la confluencia en los cultivos fue necesario resuspender las células y dividir las en otras cajas de cultivo porque al ser adherentes estos tipos celulares comienzan a separarse de la superficie y los cultivos decaen.

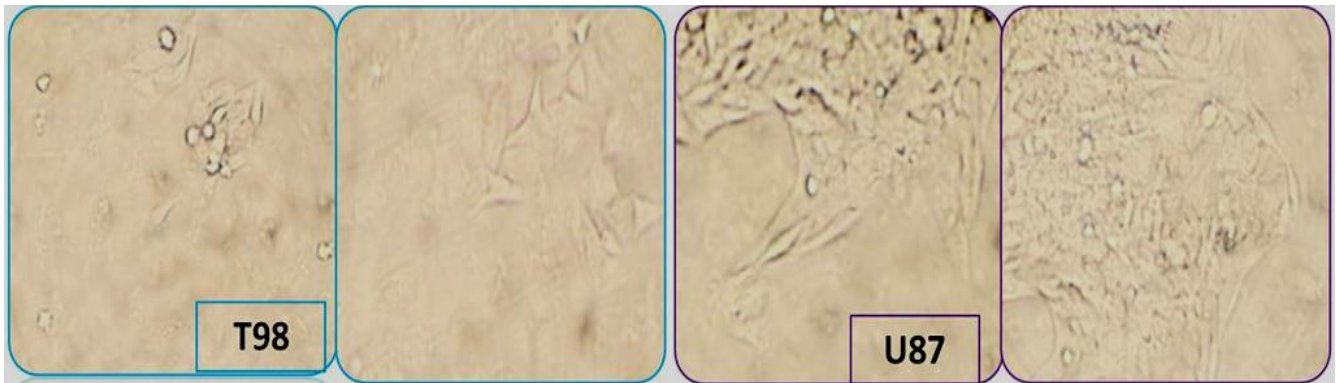


Figura 15. Cultivos de las líneas celulares T98 y U87 (Microscopio invertido)

6.4. CORTES HISTOLÓGICOS

De las muestras colectadas crioconservadas se realizaron los cortes con microtomo, para verificar que el tejido analizado presentara un mínimo de 80% de células cancerígenas para evitar falsos positivos o negativos y para rectificar el diagnóstico. Los cortes histológicos fueron teñidos con hematoxilina - eosina y analizados con ayuda de un patólogo.

6.5 EXTRACCIÓN DE RNA TOTAL DE TEJIDO

A partir de 70-100mg de tejido tumoral crioconservado a -70°C después de la resección, se llevó a cabo la extracción de RNA total, siguiendo el protocolo de Chomczynski *et al*, (1987) con modificaciones, mediante TRIzol Reagent (Invitrogen). El análisis cualitativo del RNA total de las muestras procesadas, se llevo a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%, utilizando SyBR Gold como agente intercalante y luz UV.

6.6 CUANTIFICACIÓN DE RNA

La cuantificación se llevó a cabo en el Nanodrop (Thermo Scientiphic), calibrado a una longitud de onda ultravioleta de 260 nm; utilizando $1\mu\text{l}$ de cada muestra. Para calcular el grado de pureza se tomó en cuenta el coeficiente $260 \text{ nm} / 280 \text{ nm}$. Esta medición fue repetida en el momento que iniciaba el análisis de cada gen con la finalidad de asegurar que se partía de la concentración deseada ya que las técnicas elegidas son cuantitativas y se debe eliminar el mayor número de variables.

6.7 TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (RT-PCR)

Las reacciones de síntesis de cDNA se llevaron a cabo utilizando de 100 ng de RNA total, 0.5 mg/ml de oligo dT, Buffer RT (1X), 2mM de MgCl₂, 0.50mM de dNTPs, 25 UI de Inhibidor de RNAsas, y 20 UI de transcriptasa reversa (Super Script II). El programa de amplificación consistió en 65°C durante 5 minutos, 42°C por 2 minutos, 42°C por 50 minutos y 70°C por 15 minutos, se agregó RNasa H y por último fueron sometidos a 37°C por 20 minutos.

Para llevar a cabo la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) en tiempo real de cada uno de los transcritos, se utilizaron los siguientes iniciadores de los cuales AKT1 y CD133 fueron diseñados para este estudio, mientras que EGFR y HPRT fueron seleccionados de la bibliografía, buscando que cada oligo cumpliera con las especificaciones necesarias para poder ser utilizado en PCR en Tiempo Real, tal es el caso de la amplificación de fragmentos cortos no mayores a 250 pb, criterio que no fue posible cubrir para el gen HPRT (hipoxantina guanina fosforibosiltransferasa) cuyo fragmento amplificado excede los 400pb y localización de los fragmentos flanqueados en sitios conservados que no involucraran más de dos exones cuya posición no fuera en los extremos de las secuencias de los mensajeros

Tabla 4. Oligonucleotidos de cada transcrito analizado.

Primer Forward		Primer Reverse	
Gen: EGFR	TM: 56.2°C	Gen: EGFR	TM: 57.2°C
F5'- ATGCTCTACAACCCACCAC -3'		R5'- GCCCTTCGCACTTCTTACAC -3'	
Gen: AKT1	TM: 60°C	Gen: AKT1	TM: 60°C
F5'- CATCACACCACCTGACCAAG-3'		F5'- CTCAAATGCACCCGAGAAAT -3'	
Gen: CD133	TM: 60°C	Gen: CD133	TM: 60°C
F5'- GCCAGCCTCAGACAGAAAAC -3'		F5'- CCAAGCCTTAGGAGCATCTG -3'	
Gen : HPRT	TM: 60°C	Gen : HPRT	TM: 60°C
F5'- GCCAGCCTCAGACAGAAAAC -3'		F5'- CCAAGCCTTAGGAGCATCTG -3'	

Inicialmente se llevó a cabo la amplificación en tiempo real de cada una de las muestras del gen (HPRT), el cual fue utilizado como control de expresión constitutiva en el Corbett Research Rotor-Gene; partiendo de 100 ng. El programa de amplificación consistió en un calentamiento de 95° durante 5 minutos y 35 ciclos de 95° por 30 segundos, 60° por 30 segundos y finalmente 72 durante 30 segundos.

Posteriormente, se procedió a la estandarización de las PCR, para cada uno de los genes en estudio (CD133, AKT1 y EGFR). Para lo que se realizaron gradientes de temperatura con la finalidad de encontrar la temperatura óptima de alineamiento, partiendo de la temperatura obtenida a partir de calcular el contenido de AT y GC de acuerdo a la formula de Wallace ($T_m = 2(A+T) + 4(G+C)$) y los tiempos necesarios en este paso y en la extensión y las concentraciones de MgCl₂.

Para AKT1 se utilizó el siguiente programa: Un paso inicial (calentamiento) a 95° por 5 minutos, seguido por 36 ciclos de 95°C por 20 segundos, 60°C por 20 segundos y finalmente 72°C por 25 segundos. Para adquirir la curva de fusión (Melt) se utilizó un calentamiento de 45 segundos en el paso 1, y uno de 5 segundos en los siguientes pasos, la temperatura de adquisición fue de 80-95°C. Se utilizó SyBR GREEN como fluorocromo (marcador). Obteniendo fragmentos de 200pb (Ver figura 16).

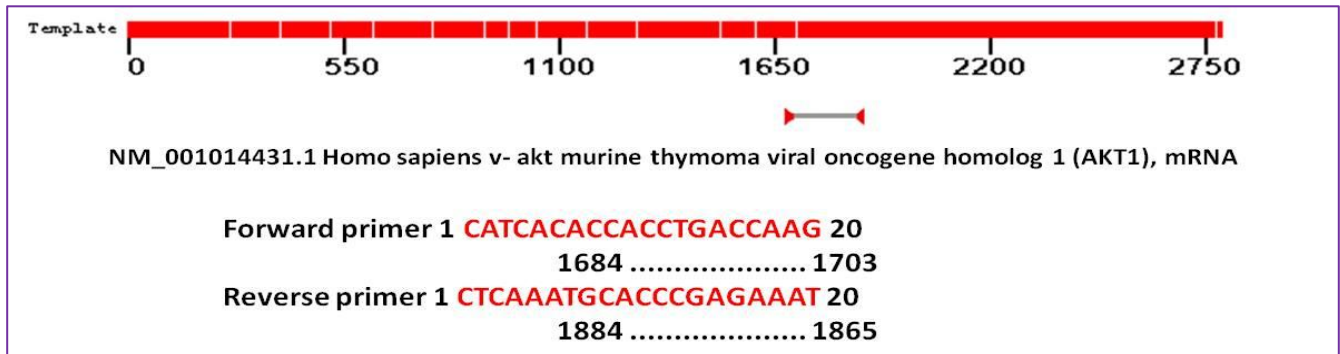


Figura 16. Posición de los oligos en la secuencia de mRNA de AKT1.

En el caso de CD133 se amplificaron fragmentos de 250 pb iniciando en la base 370 y finalizando en la 622 (Ver figura 17). Se utilizó el siguiente programa: Calentamiento a 95°C por 5 minutos, con 40 repeticiones de 95°C por 20 segundos, 61.6°C por 23 segundos y al final 72°C por 30 segundos. Los valores de Ct (ciclo en el que incrementa el valor de fluorescencia) fueron registrados para cada muestra y sus dos repeticiones. Para obtener la curva de fusión se utilizaron las condiciones descritas para AKT1.

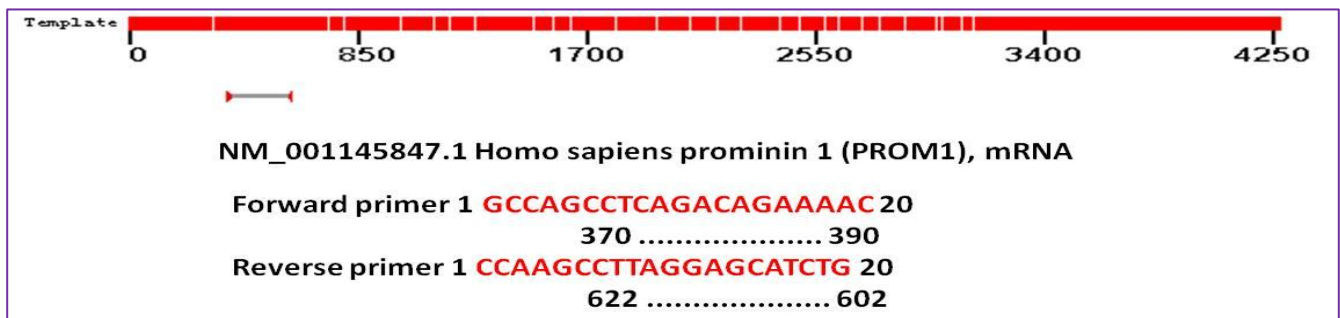


Figura 17. Localización de los iniciadores en el mRNA de CD133.

Finalmente, para EGFR se obtuvieron fragmentos de 193 pb flanqueando de la posición 1,048 a la 1.240 (Ver figura 18). Se amplificó con el programa siguiente: Calentamiento de 95°C por 3min, con 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 56.7°C por 25 segundos y al final 72°C por 30 segundos, se registraron los valores de Ct obtenidos en cada repetición.

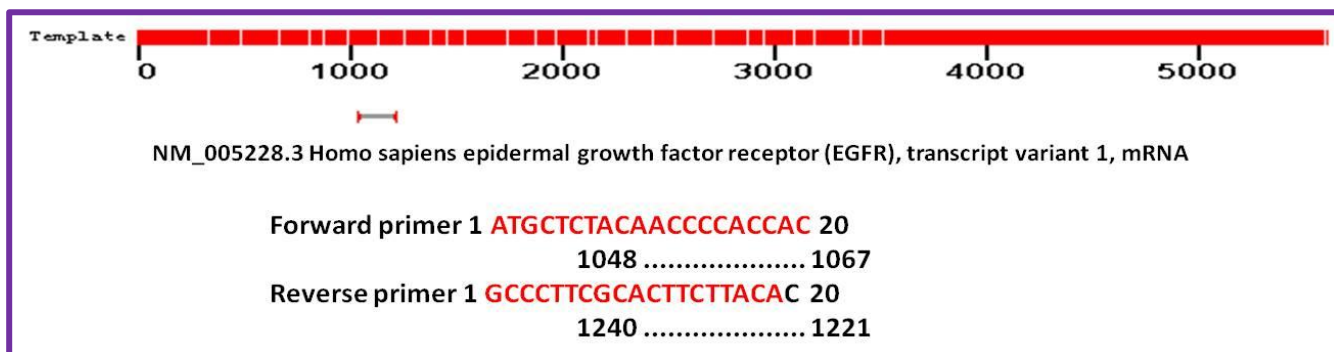


Figura 18. Posición de los primers en la secuencia de mRNA de EGFR.

Por otra parte, se llevó a cabo la Reacción en Cadena de la Polimerasa en punto final del receptor de GABA B de las dos líneas celulares utilizadas y de la muestra de cerebro sano, con la finalidad de comprobar la naturaleza de dichas muestras y que ambas procedían de cerebro para identificar si las muestras utilizadas como controles fue la adecuada. Los “primers” utilizados son F5’- GCCGCTGTGTCCGAATCTGCT-3’ y R5’- CTGCGCGCCGTTCTGAGTGT-3’, que flanquean un fragmento de 220 pb (Ver figura 19).

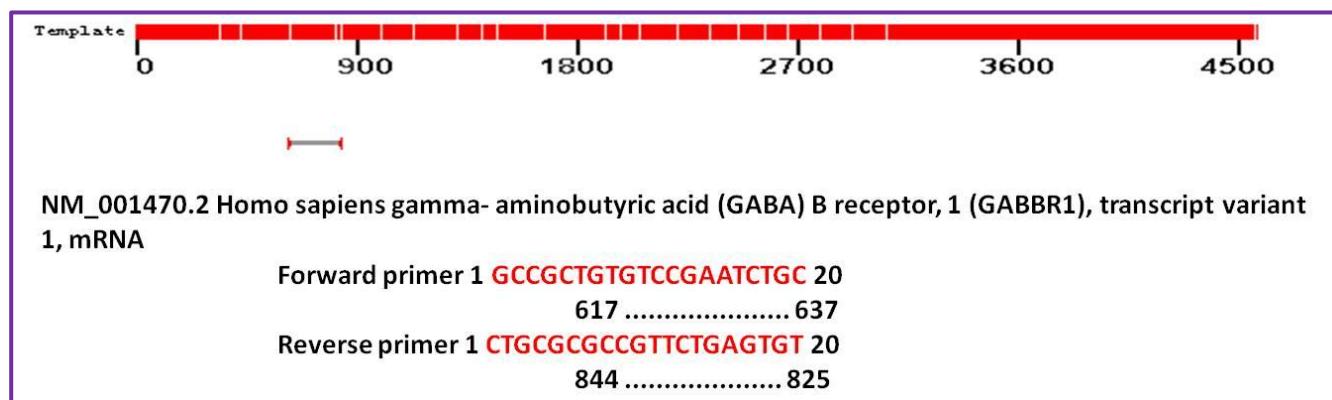


Figura 19. Localización de los oligos en el mensajero del receptor de (GABA)B.

6.8 PURIFICACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR A PARTIR DE GELES DE AGAROSA

El producto de PCR se analizó cualitativamente en geles de agarosa al 1.5% del cual se cortaron las bandas correspondientes a cada gen, estos fueron purificados mediante el Kit de Purificación de Electroforesis Marligen. Para posteriormente ser secuenciadas.

6.9 EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

Se pesaron de 30-100 mg de tejido tumoral congelado para la extracción de proteínas utilizando 500 µl de solución de lisis con NP40 como detergente aniónico para homogeneizar las células mediante

pulverización con nitrógeno líquido para mantener congelada la muestra; se centrifugó durante 10 minutos a 6,000 rpm a 4°C, se transfirió el sobrenadante a tubos estériles y se almacenaron a -30°C. Para la cuantificación de proteínas se utilizó el kit de Micro BCA ácido bicinónico (Pierce) registrando valores de absorbancia a una longitud de onda de 562 nm en el Nanodrop; para lo cual fue necesario realizar la curva de calibración de albúmina con concentraciones desde 0.2 mg hasta 2 mg / ml (solución salina). Cabe señalar que por cada cuantificación que se realizó se utilizaron triplicados para las curvas y duplicados de las muestras.

6.10 SDS-PAGE

Una vez cuantificadas las proteínas se ajustaron para ser visualizadas mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 10 y 5% durante 1hr y 30 minutos a 120 Volts con la finalidad de verificar la integridad del material obtenido y así proceder con la técnica de electroinmunotransferencia. Los geles fueron teñidos con azul de comassie en agitación moderada durante una noche y destañados con una solución de ácido acético (7.5%) y metanol (40%).

6.11 WESTERN BLOT

Se realizaron las electroinmunotransferencias (Método húmedo) de las tres proteínas utilizando a GADPH (Santa Cruz) como control de expresión Se cargaron 40 µg de los extractos proteicos en geles SDS-PAGE los cuales se corrieron a 120V durante 1hr y media. Posteriormente, se transfirieron a membranas de PVDF las cuales permanecieron previamente con metanol durante 10min para su activación. Para EGFR y CD133 las transferencias se llevaron a cabo durante 16-17 hrs a 30 V, mientras que para AKT1 y GADPH fueron de 2hr a 100V manteniéndose en cuarto frío.

Se bloquearon las membranas con leche descremada (Svelty) disuelta en TBS-T durante 4hr a temperatura ambiente para prevenir uniones no específicas. Se incubaron las 'membranas' con los anticuerpos primarios: Akt1 (PAN) (m), Anti- CD133 (m) y EGFR (m) (Cell Signaling) en diluciones 1:1000 y para GADPH 1:1400 durante toda la noche. Se realizaron tres lavados con 15 ml de TBS-T durante 20 minutos. Para la segunda incubación de la 'membrana' se utilizó el anticuerpo secundario IGG-HRP en dilución 1:5000, permaneciendo a temperatura ambiente durante una 1hr. Se repitieron los lavados con TBS-T en agitación constantes. Se reveló la membrana mediante la reacción de la peroxidasa (HRP) y biotina (Thermo Scientiphic), permaneciendo durante 10 minutos en cuarto frío. Las membranas fueron expuestas en placas auto radiográficas de sensibilidad azul (Kodak) durante 10min, finalmente las placas fueron reveladas y fijadas.

Las bandas obtenidas en las placas fueron documentadas (escaneadas) en un fotodocumentador (Bio Rad) para poder realizar el análisis densitométrico obteniendo los valores en D.O. para cada muestra. El valor para GADPH del cultivo primario de cerebro sano fue considerado como 1 por ser una proteína que se expresa de forma ubicua en las células, para así poder normalizar los valores obtenidos en las proteínas problema e identificar diferencias significativas en la expresión de las mismas.

7. RESULTADOS

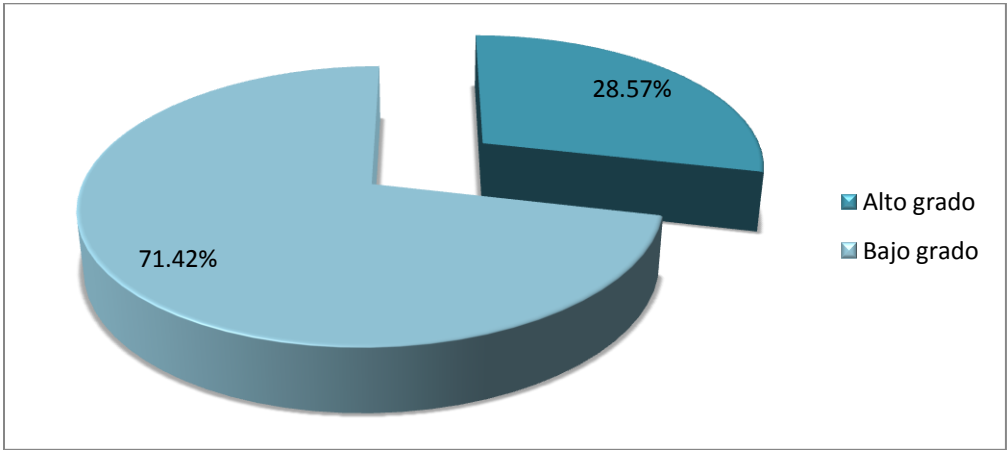
Considerando los criterios de inclusión anteriormente descritos se seleccionaron las muestras que fueron sometidas al estudio. En la Tabla 5, se presentan los datos actualizados de las 14 muestras colectadas en el periodo establecido los cuales fueron proporcionados por el Banco de Tejidos del Hospital de Pediatría del CMN SXXI; es importante señalar que el diagnóstico fue modificado para tres muestras, no obstante cabe destacar que según la opinión de los patólogos dos de estas muestras sí corresponden a tumores astrocíticos de alto grado, por lo que se solicitó la revisión de las laminillas correspondientes a estos casos por lo que si fueron incluidos en el estudio.

Tomando en cuenta los datos y las muestras colectadas, se reportan un total de once muestras con diagnóstico de astrocitoma confirmado y dos de diagnóstico dudoso.

Tabla 5. Descripción de las muestras colectadas durante 2009-2010.

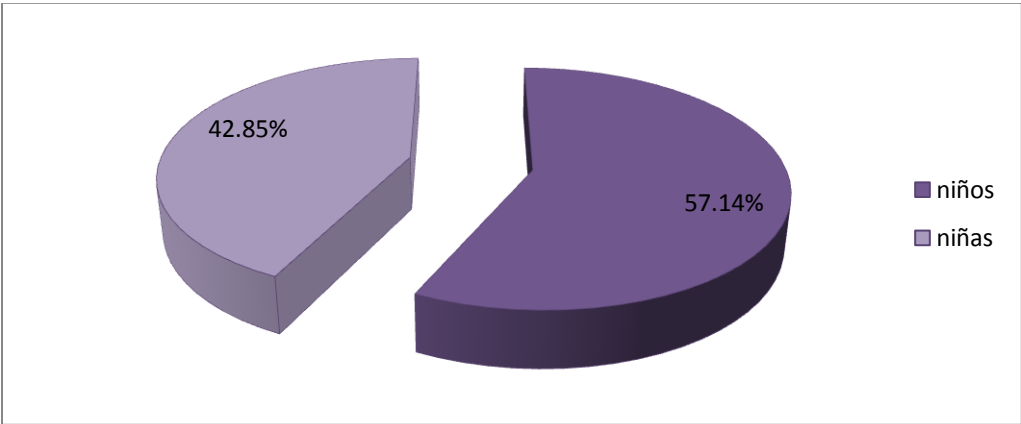
Clave ID	Sexo	Edad	Diagnóstico	Sitio	Cambio Diagnóstico
1	M	14años	GLIOBLASTOMA MULTIFORME	REGIÓN PINEAL	
2	M	2 años	ASTROCITOMA PILOCÍTICO	TÁLAMO	
3	M	7años	ASTROCITOMA FIBRILAR	REGIÓN PINEAL	
4	F	12años	GLIOBLASTOMA MULTIFORME	SUPRATENTORIAL	
5	M	7años	ASTROCITOMA DE BAJO GRADO	TALLO CEREBRAL	
6	F	5años	ASTROCITOMA FIBRILAR	FOSA POSTERIOR	
7	F	14años	ASTROCITOMA FIBRILAR	INFRATENTORIAL	
8	M	3meses	ASTROCITOMA DE BAJO GRADO	TALLO CEREBRAL	MENINGIOMA FIBROSO
9	F	4años	ASTROCITOMA FIBRILAR	SUPRATENTORIAL	
10	M	10años	ASTROCITOMA ANAPLÁSICO	PARIETAL IZQUIERDO	OLIGODENDROGLIOMA ANAPLÁSICO
11	M	7años	ASTROCITOMA DE BAJO GRADO	HIPOTÁLAMO	
12	M	15años	GLIOBLASTOMA MULTIFORME	TEMPORAL IZQUIERDO	
13	F	2años	ASTROCITOMA BAJO GRADO	FOSA POSTERIOR	EPENDIMOMA
14	F	3 años	ASTROCITOMA PILOCÍTICO	TALLO CEREBRAL MESENFÁLICO	

Como se observa en la gráfica 3, de los catorce pacientes incluidos en el estudio se reportan cuatro con astrocitomas de alto grado que corresponden al 28.57%, y diez de bajo grado por lo que se observa un predominio de estos tumores aportando 71.43% restante.



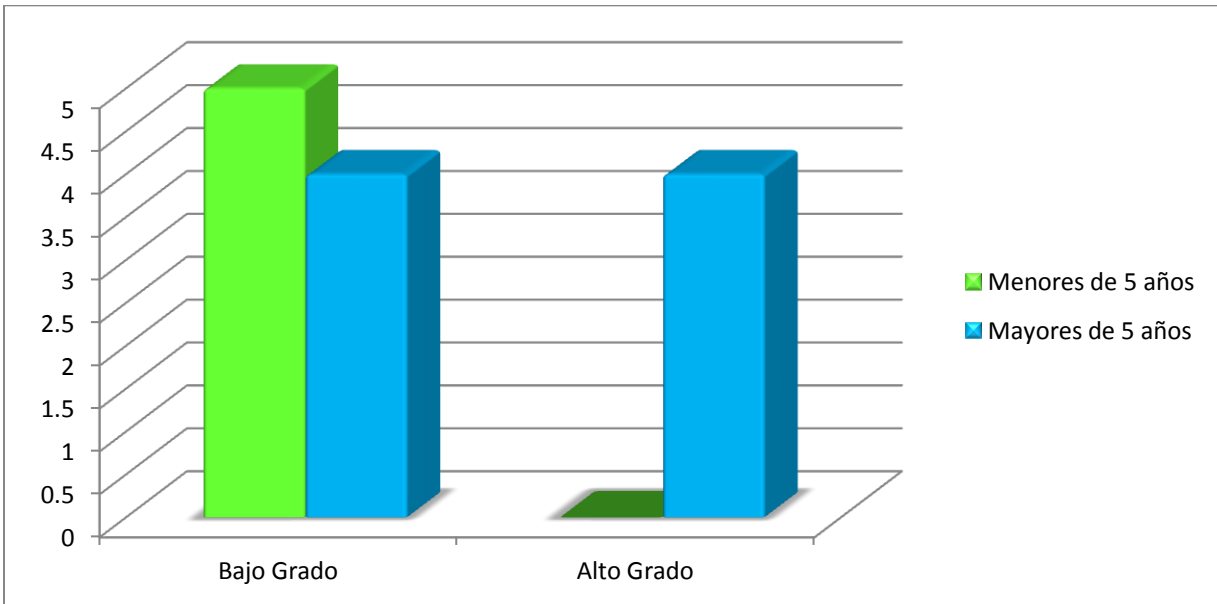
Gráfica 3. Frecuencia de Astrocitomas de alto y bajo grado.

Es importante mencionar que de los pacientes analizados seis son del género femenino aportando el 42.85% del total, y ocho del género masculino, se aprecia un comportamiento similar en ambos grupos lo cual demuestra que aparentemente no hay predisposición a desarrollar este tipo de neoplasias en alguno de los sexos (Ver gráfica 4).



Gráfica 4. Frecuencia de Astrocitomas según el género.

Por otra parte se reporta un comportamiento similar al descrito por Perdomo en el (2001) ya que los infantes menores de cinco años presentaron diagnóstico de Astrocitoma de Bajo grado, mientras que los mayores de esa edad fueron diagnosticados en proporciones similares tanto en Bajo y Alto Grado.



Gráfica 5. Proporción de Tumores de Alto y Bajo Grado por edades.

Se analizaron los cortes histopatológicos teñidos con hematoxilina y eosina para verificar el diagnóstico y el porcentaje de tejido tumoral. Las siguientes figuras muestran las imágenes obtenidas en microscopio óptico de cada laminilla, las cuales fueron organizadas dependiendo el grado tumoral. En verde se presentan los pacientes correspondientes a alto grado (1,4,10,12), en rosa los tumores astrocíticos de bajo grado (2,3,5,6,7,8,9,11,13,14), para la muestra 2 fue necesario solicitar otra porción de tejido ya que el primer corte realizado presentaba el 70% de células sanas, no obstante el último corte fue el que se utilizó para el análisis.

En las imágenes correspondientes a las muestras 10 y 13 se observan grandes similitudes con los cortes obtenidos de las muestras (1,4 y 12) las cuales sí recibieron diagnóstico de astrocitoma confirmado, lo cual sugiere que el diagnóstico que inicialmente se tenía para el tumor 10 de astrocitoma anaplásico sí es correcto por lo que se decidió incluirlo en el estudio.

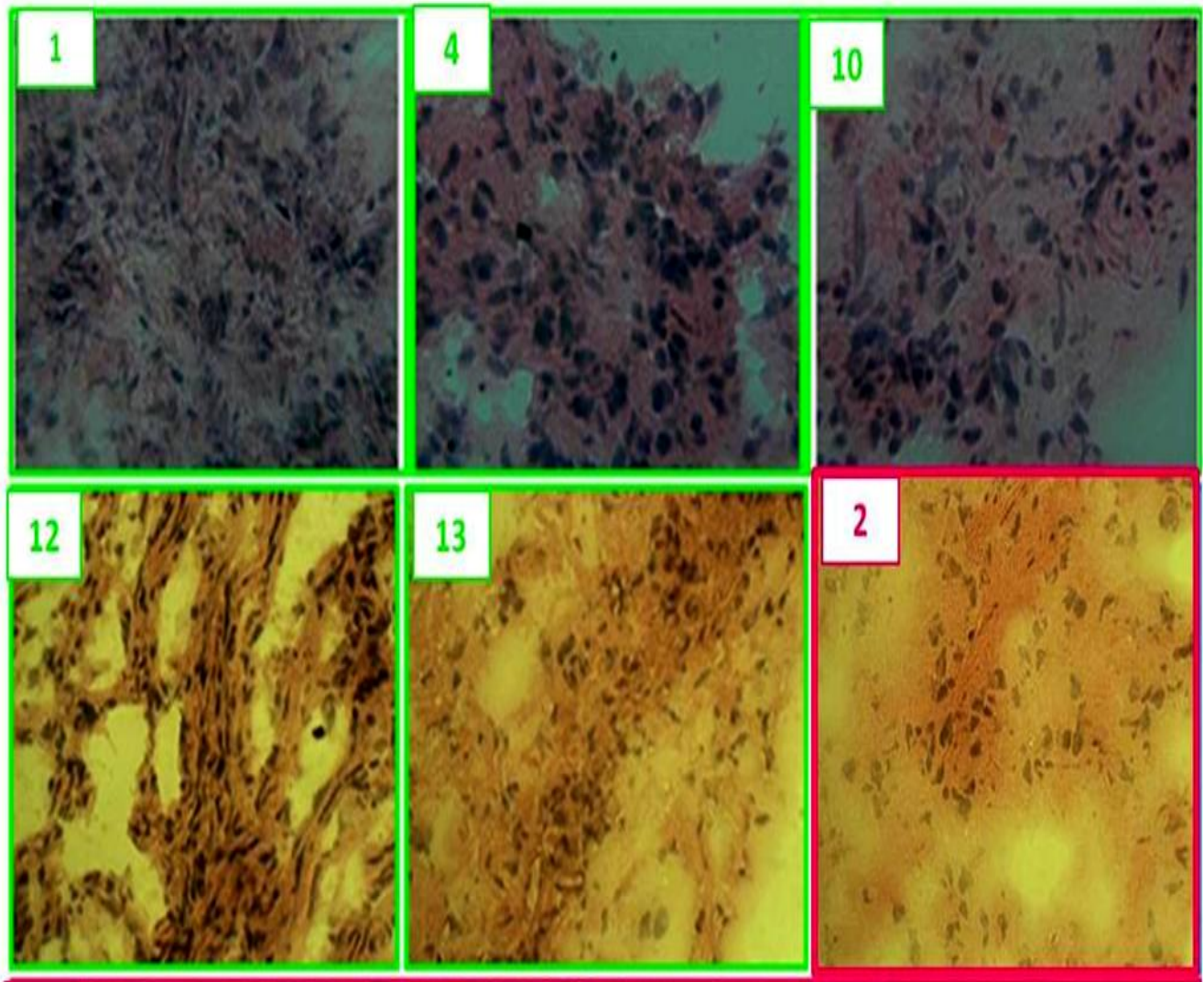


Figura 20. Cortes histológicos teñidos con hematoxilina y eosina de los pacientes de Alto Grado.

Retomando los hallazgos histopatológicos anteriormente descritos se pueden observar en las imágenes anteriores algunas de estas características como el alto grado de heterogeneidad, la hiper celularidad, atipia nuclear, pleomorfismo celular y nuclear, hiper cromatismo. Generalmente en los tumores correspondientes al grado II y III aun no hay proliferación vascular exagerada ni necrosis. Sin embargo muchos patólogos han tomado como norma la presencia de necrosis intratumoral en las neoplasias astrocíticas para establecer el diagnóstico de glioblastoma multiforme. Dos nuevos sistemas de clasificación por grados han

argumentado que el diagnóstico de este tipo de tumor puede ser hecho sin la presencia necesaria de focos necróticos ni de la proliferación endotelial.

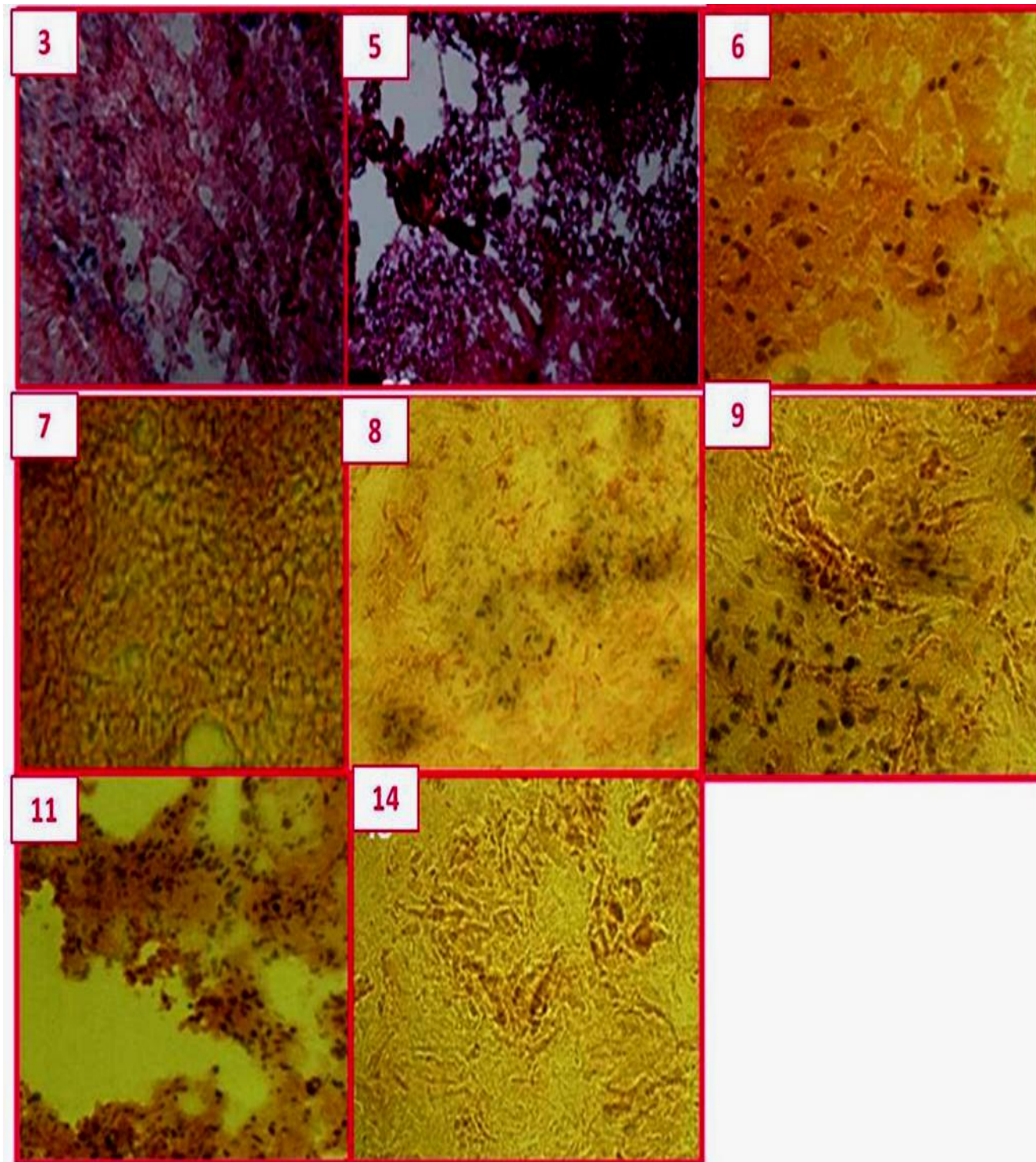


Figura 21. Cortes histologicos de los pacientes de Bajo grado. Teñidos con hematoxilina y eosina (Microscopio óptico)

7.1. ANÁLISIS DE RNA

En la siguiente tabla se muestran los valores obtenidos en la cuantificación del RNA para cada muestra, expresada en ng/ μ l, así como el coeficiente 260/280 que indica el grado de pureza; es preciso mencionar que todas los RNA registraron valores entre 1.5 a 1.9 lo cual comprueba que tienen la calidad necesaria para ser sometidas al análisis.

Tabla 6 Concentración de RNA por muestra

Clave	[ng/ μ l]	260/280
1	208.03	1.67
2	100.15	1.84
3	364.92	1.67
4	613.15	1.70
5	187.76	1.69
6	304.19	1.76
7	132.04	1.77
8	1063.17	1.53
9	923.85	1.50
10	307.31	1.68
11	203.12	1.81
12	772.45	1.76
13	401.35	1.59
14	701.3	1.62
CONTROL	591.0	1.68
T98	452.1	1.89
U87	624.5	1.82

Con la finalidad de revisar la integridad del RNA total de los tumores y de los cultivos celulares, se realizaron electroforesis en geles de agarosa al 2%, durante 1hr a 70V. En la figura 22 se evidencia que de las muestras 2, 13 y 14 se obtuvo menor concentración de RNA y la calidad del mismo fue más baja, por lo que fue necesario ajustar en todos los casos las concentraciones para partir de la misma cantidad y los resultados obtenidos en los análisis de expresión fueran comparables.

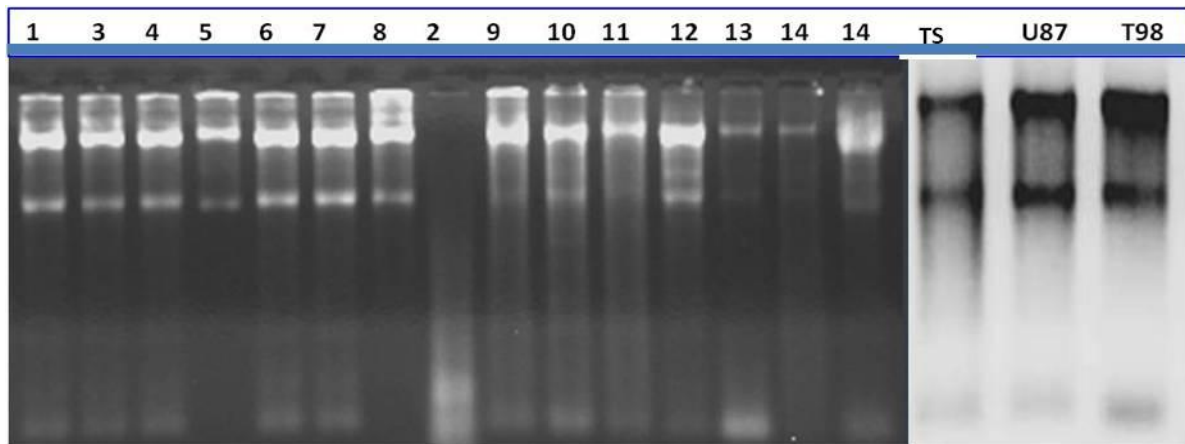


Figura 22 Electroforesis de RNA. Los dígitos en los carriles corresponden a las claves otorgadas a cada paciente.

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

7.2. TRANSCRIPCIÓN REVERSA Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA EN TIEMPO REAL (RT-PCR).

Se realizó la amplificación de HPRT de todas las muestras en tiempo real por triplicado. Se registraron los valores de Ct para el análisis posterior. En la siguiente figura se presentan a) la curva de cuantificación y b) la curva de fusión (Melt) obtenidas para este gen y en c) se observan valores de Ct obtenidos en los 14 tumores.

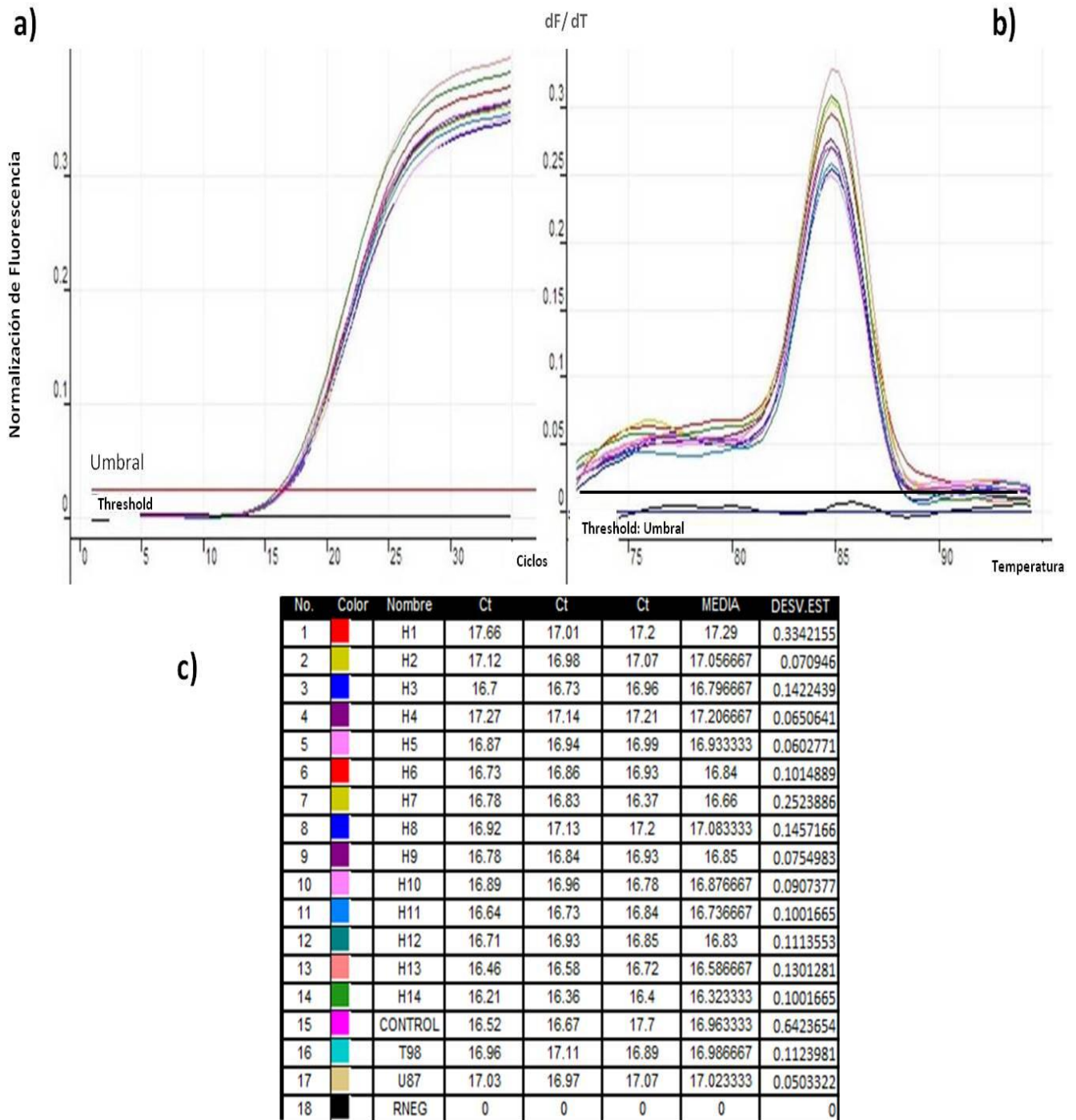


Figura 23 Tiempo Real de HPRT (Curva de Amplificación y Curva de Fusión (Melt)).

Los productos de PCR fueron visualizados en geles de agarosa a 1.5% utilizando Buffer TBE a 0.5%, la electroforesis se llevó a cabo durante 1 hora aproximadamente a 70V. En los cuales se observa la expresión constante de este transcrito (HPRT). Los fragmentos esperados eran 450 pb, lo que indica que las bandas observadas en la siguiente figura efectivamente corresponden a los amplificados.

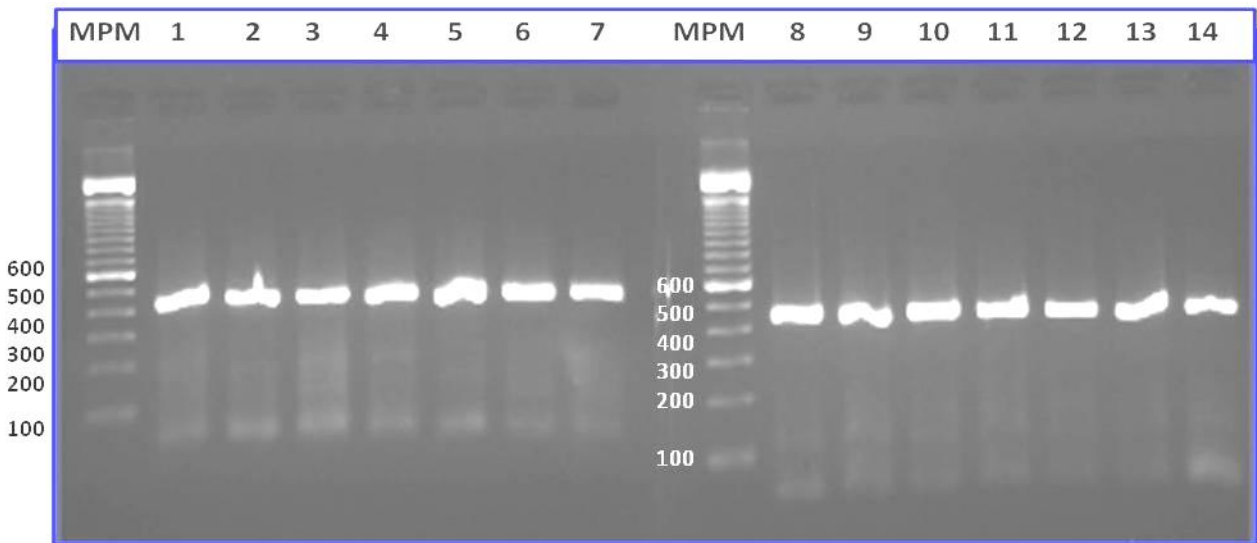
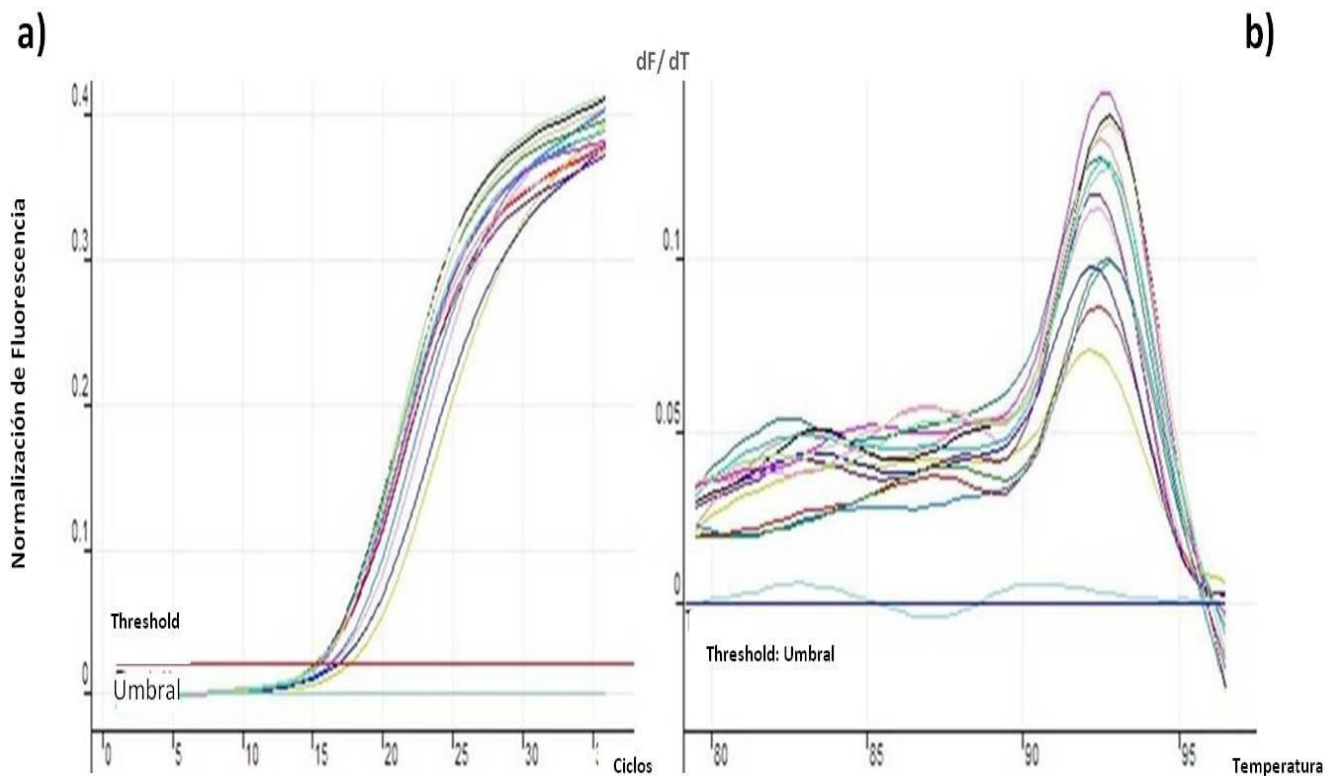


Figura 24. Visualización de productos de HPRT en gel de agarosa al 1.5%.

Una vez obtenidos los valores de expresión para HPRT se procedió al análisis de los otros genes ya que esto demostró que tanto la calidad del material genómico utilizado fue la necesaria y la concentración registrada para cada muestra fue verídica, lo que nos indica que los valores de Ct de los genes revisados en estudio, pueden ser analizados utilizando HPRT para su normalización.

AKT1

Posteriormente, se analizó AKT1 con las condiciones previamente descritas, las muestras se metieron por triplicado para obtener datos significativos. Se registraron los valores de Ct para sacar el promedio y poder calcular el ΔCt utilizando como referencia los promedios de Ct registrados para HPRT. Figura 5 a) curva de amplificación, b) curva de fusión y c) valores de Ct obtenidos en los 14 tumores.



c)

No.	Color	Nombre	Ct	Ct	Ct	MEDIA	DESTA
1	Red	A1	15.55	15.89	15.6	15.68	0.1835756
2	Yellow	A2	16.55	19.01	16.01	17.19	1.59912476
3	Blue	A3	16.56	17.1	16.74	16.8	0.27495454
4	Purple	A4	15.65	15.19	15.26	15.3667	0.24785749
5	Pink	A5	15.21	16.25	16.5	15.9867	0.68412962
6	Cyan	A6	16.37	15.21	15.3	15.6267	0.64531646
7	Teal	A7	15.63	16.2	16	15.9433	0.28919428
8	Light Blue	A8	15.59	15.75	15.98	15.7733	0.19604421
9	Green	A9	15.33	15.65	15.93	15.6367	0.30022214
10	Magenta	A10	15.65	14.97	14.9	15.1733	0.41428654
11	Black	A11	15.38	15.2	15.64	15.4067	0.2212088
12	Light Cyan	A12	15.43	15.49	15.03	15.3167	0.25006666
13	Light Green	A13	15.6	15.4	15.67	15.5567	0.140119
14	Light Blue	A14	15.49	15.94	15.76	15.73	0.22649503
15	Red	CONTROL	16.46	16.35	16.92	16.5767	0.30237945
16	Yellow	T98	15.45	14.56	15.37	15.1267	0.4923752
17	Blue	U87	15.89	15.08	15.21	15.3933	0.43500958
18	Light Cyan	N	0	0	0	0	0

Figura 25. Tiempo Real de AKT1 (Curva de Amplificación y la de Fusión)

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

El corrimiento electroforético se llevó a cabo en cámaras horizontales de 20 x 25 cm, durante 1 hora con 20 minutos aproximadamente, a 80V, se prepararon geles de agarosa a 1.5% utilizando Buffer TBE a 0.5X. Se utilizó marcador de peso molecular de 100 pb para verificar que el fragmento obtenido fuera de 201 pb. Las diferencias que se observan en las posiciones de las bandas sugieren algún defecto en el corrimiento electroforético.

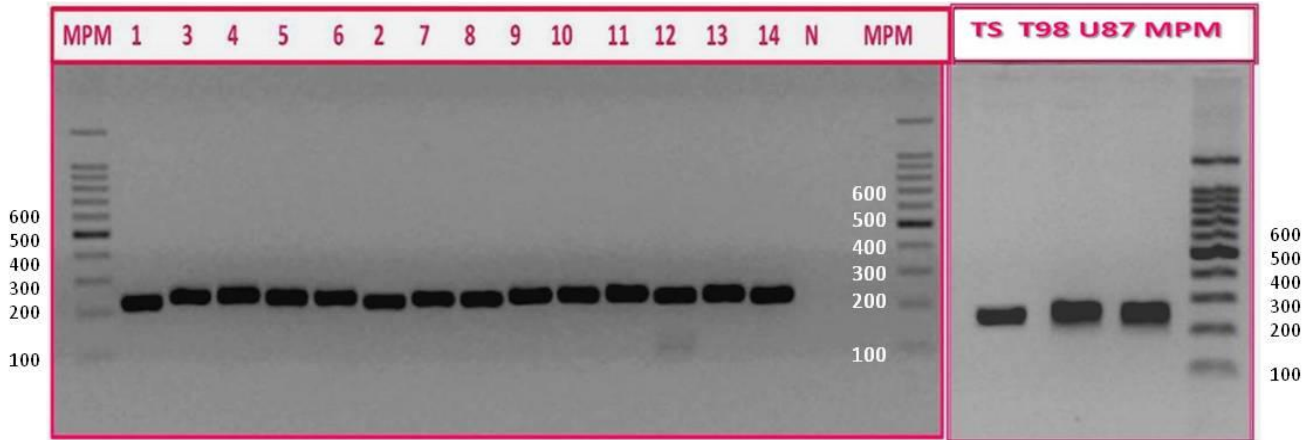
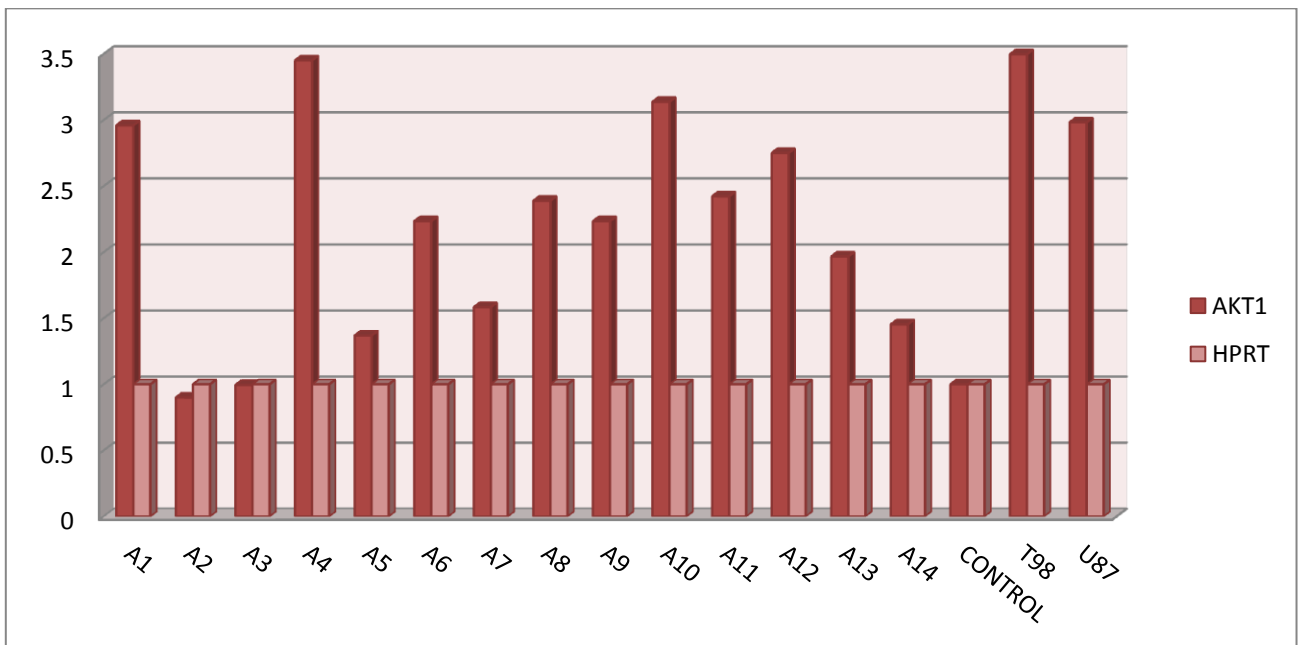


Figura 26. Visualización de productos de AKT1 en geles de agarosa al 1.5%.

Los dígitos en los carriles corresponden a las claves otorgadas a cada muestra, mientras LN18, T98 y U87 corresponden a las líneas celulares.

Para analizar los resultados obtenidos en las reacciones de PCR en tiempo real se calcularon los promedios de las Ct tanto de AKT1 y HPRT para cada muestra, para calcular la ΔCt restando el promedio de Ct de AKT1 menos el promedio de Ct de HPRT. Posteriormente, se realizó la siguiente operación ($2^{-\Delta Ct}$) para conocer la expresión relativa del gen de estudio tomando como referencia el nivel de expresión del “housekeeping” (HPRT). Los datos obtenidos de la normalización se presentan en la gráfica 6.

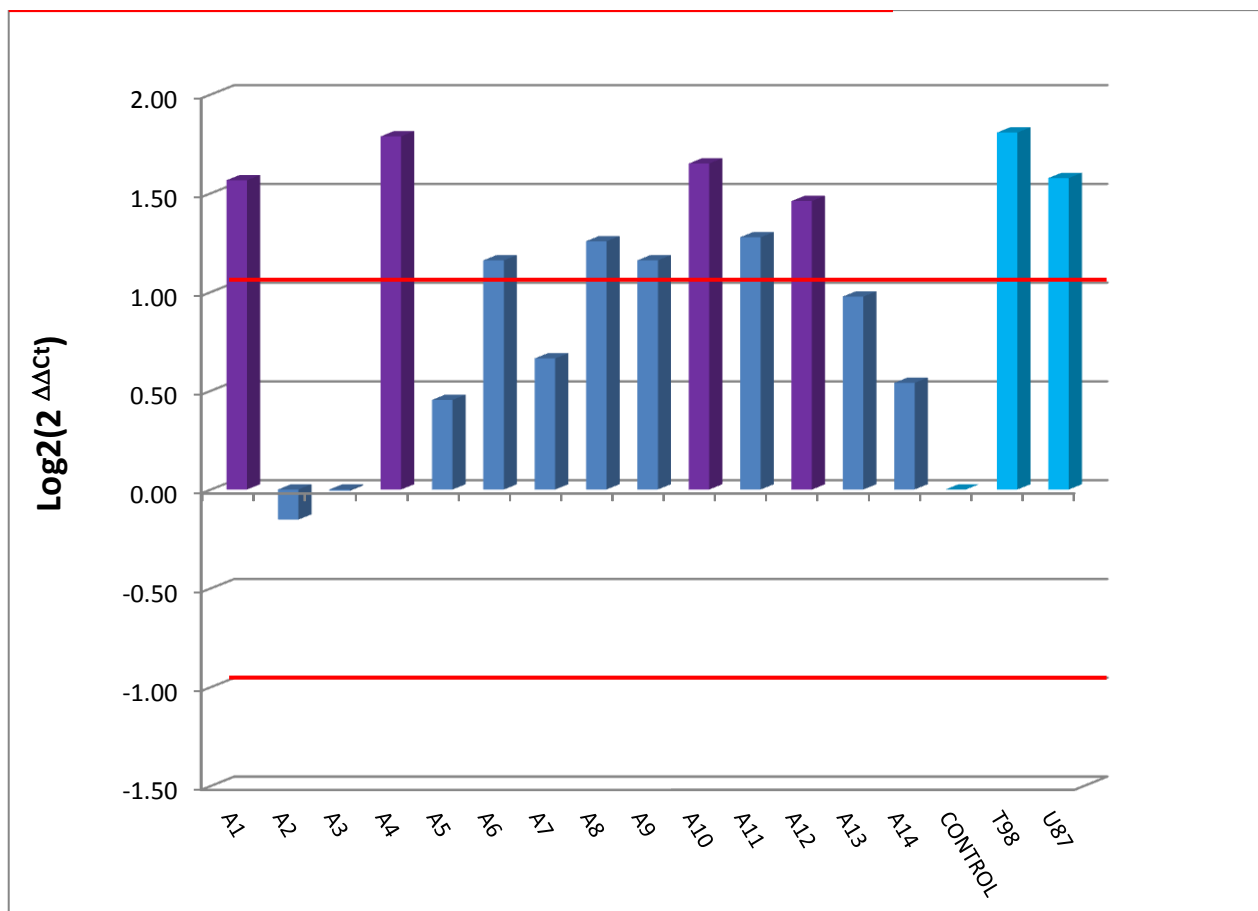


Gráfica 6. Expresión Relativa de AKT1 (comparación con HPRT).

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

Se puede observar que el gen AKT1 en las muestras (1,4, 6, 8, 9, 10, 11, y 12) y en las líneas celulares T98 y U87 se expresa en una proporción mayor a 2 en comparación a HPRT, mientras que en las muestras (2, 3, 5 y 14) y el tejido sano se expresan de forma similar. En cuanto a los pacientes (7, 13) se reporta una expresión relativa de AKT1 mayor a la de HPRT, sin embargo, no sobre pasa al 1.5 veces de expresión.

Para detallar el análisis fue necesario calcular el $\Delta\Delta Ct$, para lo que se considero el valor registrado de AKT1 en la muestra de cerebro sano ya que en la literatura se ha reportado que la expresión de este gen es constante en tejido sano. Se saco la diferencia de la ΔCt del control menos la ΔCt de cada una de las muestras. Posteriormente, se efectuó la siguiente operación, $(2^{\Delta\Delta Ct})$ utilizando el valor de $\Delta\Delta Ct$ previamente calculado. Para reportar si la diferencia de expresión entre las muestras y la línea celular correspondiente a tejido sano realmente era significativa, se transformaron los valores de $(2^{\Delta\Delta Ct})$ a Log base 2, tomando en consideración que el valor de 1 es normal y al ser transformado a Log2 será igual a 0 por lo que las muestras que se encuentren en ese nivel de expresión se consideran normales. La escala menor es 0.5 cuya transformación es igual a -1 y el valor mayor es 2 que sería igual a +1, esto nos permite identificar las muestras cuya sobreexpresión sea realmente significativa porque se encuentran por arriba de 1, mientras que las consideradas sub-expresadas deben pasar el valor de -1. Las transformaciones de los valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ a Log2 se presentan en la gráfica 7.



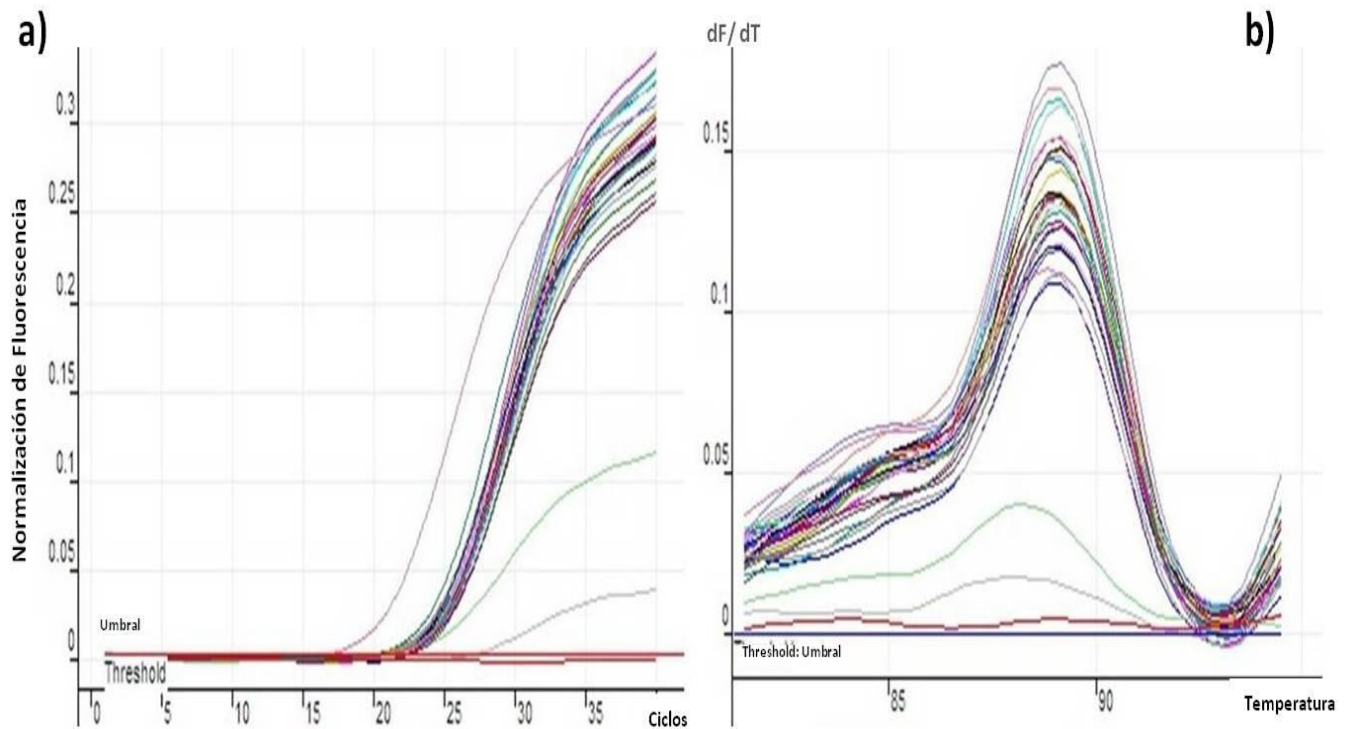
Gráfica 7. Expresión de AKT1 en comparación con el tejido de cerebro sano.

En la gráfica 7, se observa que ocho de las catorce muestras registraron valores que sobrepasan el sitio de corte de +1, lo que indica la sobreexpresión significativa del transcrito AKT1 en (1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12). Por otro lado, se observa que existe mayor expresión de AKT1 en las muestras (5, 7, 13 y 14) en comparación con el tejido sano sin embargo, la diferencia de expresión no es significativa. Considerando la muestra 2, se observa que los datos de fluorescencia registrados para el gen fueron menores a los del control, aunque la disminución no resultó ser significativa.

Las alteraciones genéticas río arriba y río abajo de PI3K y en algunas moléculas involucradas en su vía de señalización tales como: los Receptores tirosina cinasas y AKT, son frecuentes en diferentes tipos de cánceres. PI3K regula el crecimiento tumoral y la angiogénesis mediante la activación de AKT, a través de la inducción de HIF-1 y la expresión de VEGF. Tomando en cuenta que este fenómeno es necesario para el crecimiento tumoral y la metástasis es importante analizar a qué nivel afecta el incremento de la expresión de AKT1 que se reporta en ocho de las muestras procesadas (Bing-Hua y Ling-Zhi, 2009).

CD133

A continuación se muestran las gráficas de amplificación y la Curva de Fusión obtenidas del gen CD133 para cada una de las muestras y de los controles positivo y negativo, así como, la tabla de los valores obtenidos de Ct (ciclo al threshold) para cada repetición, las medias y la desviación estándar.



c)

No.	Color	Nombre	Ct	Ct	Ct	MEDIA	DESVEST
1	Red	CD1	21.42	19.89	19.01	20.106667	1.2195218
2	Yellow	CD2	21.44	22.44	20.11	21.33	1.1688884
3	Blue	CD3	22.39	21.07	20.99	21.483333	0.7862146
4	Purple	CD4	20.52	19.81	19.75	20.026667	0.4282912
5	Pink	CD5	22.99	21.22	20.11	21.44	1.4525495
6	Cyan	CD6	21.58	22.08	20.13	21.263333	1.0128343
7	Teal	CD7	22.29	21.17	20.06	21.173333	1.1150037
8	Light Red	CD8	21.49	22.72	19.11	21.106667	1.8352747
9	Light Green	CD9	22.55	21.4	20.13	21.36	1.2104958
10	Magenta	CD10	17.57	19.64	19.41	18.873333	1.1345631
11	Black	CD11	22.7	21.09	20.15	21.313333	1.2895865
12	Light Blue	CD12	21.91	19.09	19.03	20.01	1.6457217
13	Light Orange	CD13	22.26	21.82	20.21	21.43	1.0792127
14	Light Green	CD14	22.08	19.05	19.03	20.053333	1.7551733
15	Red	CONTROL	20.97	20.42	21.13	20.84	0.3724245
16	Yellow	T98	20.67	19.89	19.1	19.886667	0.7850053
17	Blue	U87	21.78	19.78	19.06	20.206667	1.4093024
18	Light Blue	N	0	0	0	0	0

Figura 27. Curvas del Tiempo Real obtenidas para CD133.

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

Los productos obtenidos en el PCR en tiempo real de las 14 muestras, el control negativo y las líneas celulares T98 y U87 se corrieron en geles de agarosa a 1.5% durante 30 minutos aproximadamente a 80V. En la figura 28 se observan diferencias de pesos en los transcritos obtenidos lo que podría sugerir que se tratan de productos diferentes, sin embargo las curvas de fusión de todas las muestras se encuentran en la misma zona, lo que nos indica que se trata del mismo producto.

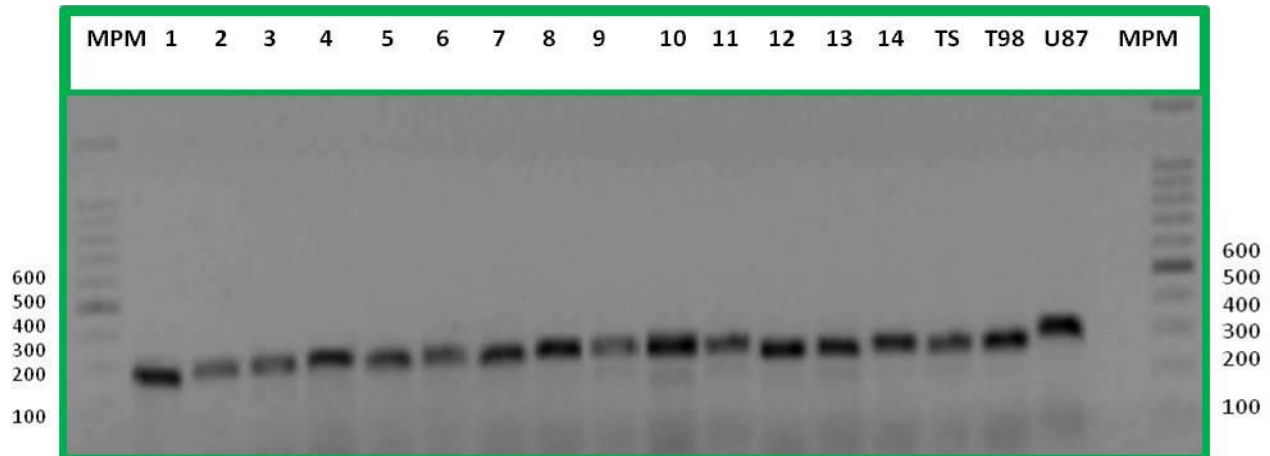
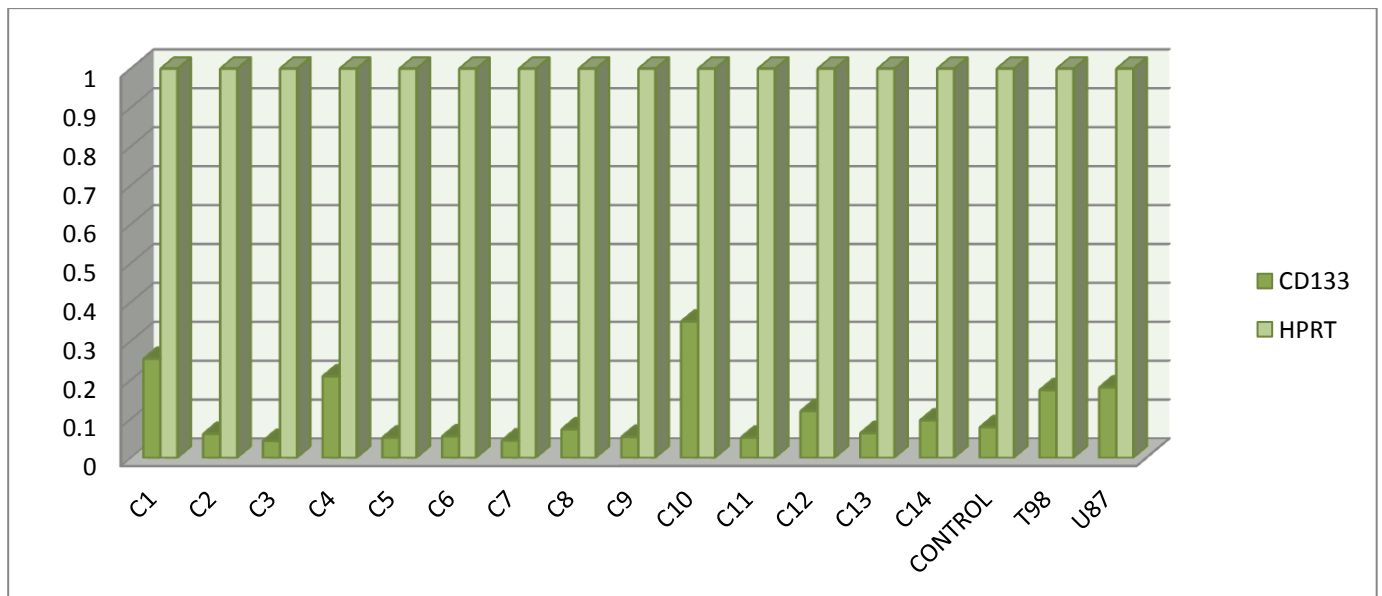


Figura 28. Visualización de productos de CD133
Los dígitos en los carriles corresponden a las claves otorgadas a cada muestra.

Los valores de los promedios de las Ct obtenidos en las reacciones de tiempo real fueron considerados, para calcular la ΔCt restando el promedio de Ct de CD133 menos el promedio de Ct de HPRT. Consecutivamente se calculó $(2^{-\Delta Ct})$ para conocer la expresión relativa del gen de estudio tomando como referencia el nivel de expresión del control endógeno. Los datos obtenidos de la normalización se presentan en la gráfica 8.

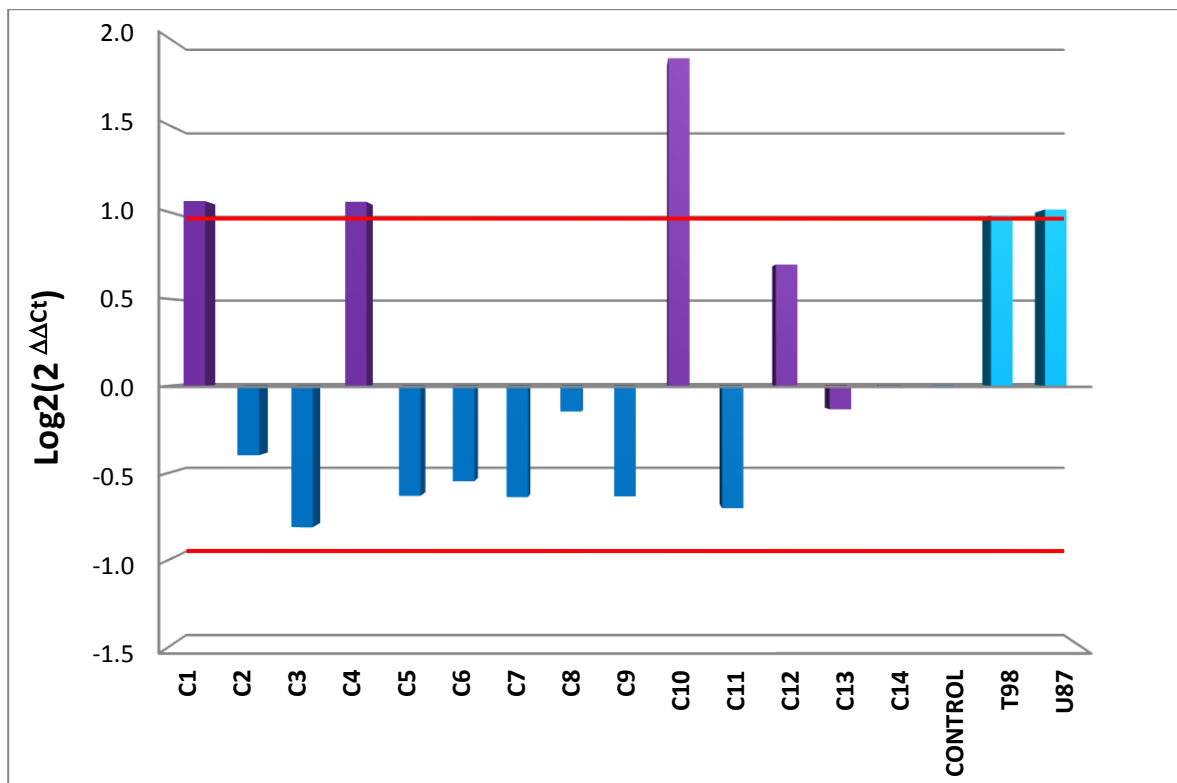


Gráfica 8. Expresión relativa de CD133 en comparación con HPRT.

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

En la gráfica anterior se muestra que el transcrito CD133 en todas las muestras y en las líneas celulares T98 y U87 presenta una baja expresión en una proporción menor a 1 en comparación a HPRT, mientras que en las muestras (2, 3, 5 y 14) y el tejido sano se expresan de forma similar. En cuanto a los pacientes (1, 4 y 10) reporta un ligero incremento en la expresión relativa de CD133 en comparación con las muestras restantes, sin embargo, el nivel de expresión es bajo.

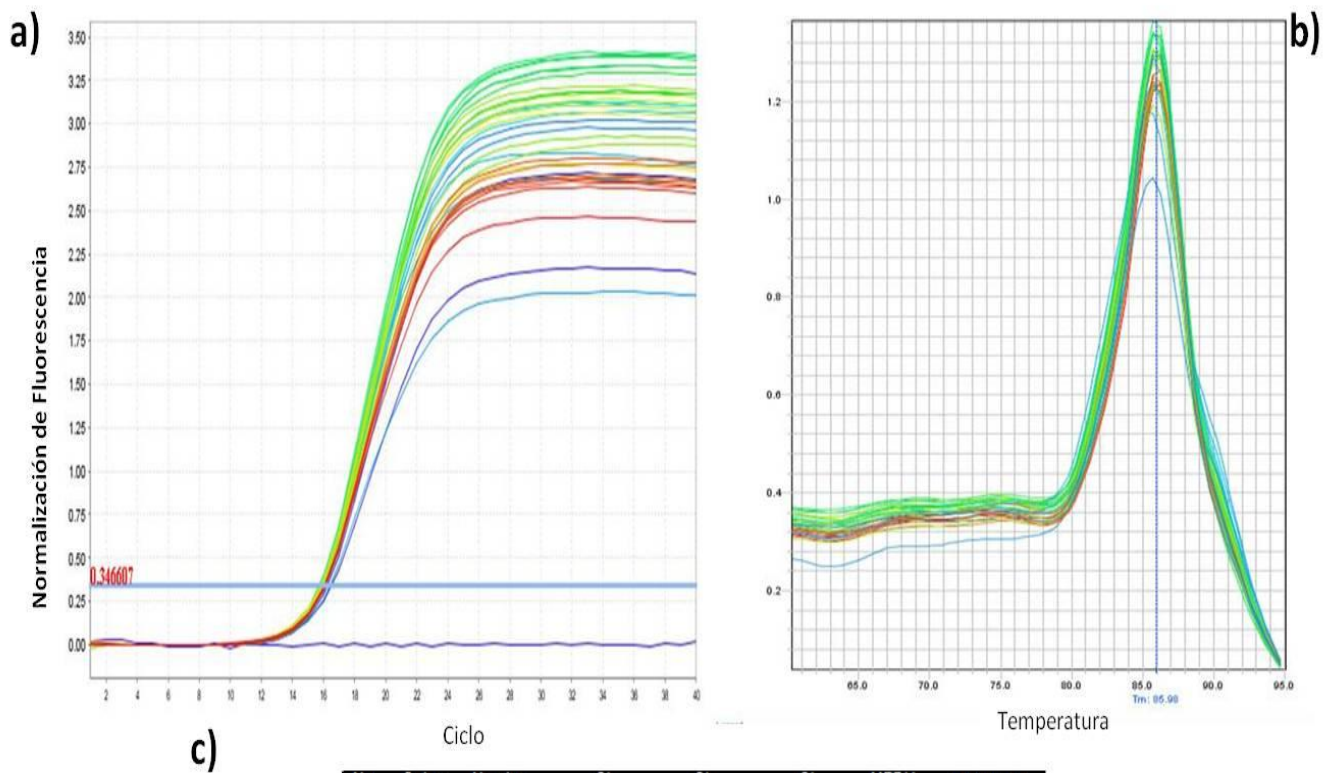
Con la finalidad de profundizar el análisis fue necesario calcular el $\Delta\Delta Ct$, por lo que fue necesario considerar el valor registrado de CD133 en la muestra de cerebro sano. Se obtuvo la diferencia de la ΔCt del control menos la ΔCt de cada una de las muestras. Finalmente, se efectuó la siguiente operación ($2^{\Delta\Delta Ct}$). Para analizar si la diferencia de expresión entre las muestras y el tejido sano realmente era significativa, se transformaron los valores de ($2^{\Delta\Delta Ct}$) a Log base 2. La escala menor es 0.5 cuya transformación es igual a -1 y el valor mayor es 2 que sería igual a +1, para identificar si las diferencias de expresión realmente son significativas. Las transformaciones de los valores de $2^{\Delta\Delta Ct}$ a Log2 se presentan en la gráfica 9.



Gráfica 9. Expresión de CD133 en comparación con el tejido de cerebro sano.

EGFR

Finalmente se analizo la expresión de EGFR con las condiciones previamente descritas, las muestras se metieron por triplicado para obtener datos significativos. Se registraron los valores de Ct para sacar el promedio y poder calcular el ΔCt utilizando como referencia los promedios de Ct registrados para HPRT, para cada muestra y los controles.



No.	Color	Nombre	Ct	Ct	Ct	MEDIA	DESVEST
1	Red	E1	16.09	16.02	15.99	16.0333	0.05131601
2	Yellow	E2	16.11	16.11	16.19	16.1367	0.04618802
3	Blue	E3	16.03	16.07	16.09	16.0633	0.0305505
4	Purple	E4	16.08	16.09	16	16.0567	0.04932883
5	Pink	E5	15.99	15.82	15.95	15.92	0.08888194
6	Red	E6	15.97	15.92	15.89	15.9267	0.04041452
7	Yellow	E7	15.88	15.83	15.95	15.8867	0.06027714
8	Blue	E8	16.08	16.06	16.09	16.0767	0.01527525
9	Purple	E9	16	15.94	16.01	15.9833	0.03785939
10	Pink	E10	15.97	15.89	15.81	15.89	0.08
11	Blue	E11	15.84	16.16	15.95	15.9833	0.16258331
12	Teal	E12	15.75	15.83	15.87	15.8167	0.06110101
13	Red	E13	15.99	15.83	15.93	15.9167	0.08082904
14	Green	E14	15.86	15.94	15.79	15.8633	0.07505553
15	Magenta	CONTROL	15.81	16.42	16.44	16.2233	0.35809682
16	Cyan	T98	16.23	16.32	16.13	16.2267	0.09504385
17	Gold	U87	15.95	15.95	15.92	15.94	0.01732051
18	Black	RNEG	0	0	0	0	0

Figura 29 Curvas registradas en el Tiempo Real de EGFR.

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

Los fragmentos obtenidos en las reacciones de tiempo real para el gen EGFR de las 14 muestras y de los controles se corrieron en geles de agarosa a 1.5% durante 30 minutos, aproximadamente a 80V, utilizando marcador de peso molecular de 100 pb para comprobar que el tamaño de los amplificados corresponden a 193pb.

El corrimiento electroforético no fue el adecuado por lo que se observan alteraciones en las bandas correspondientes a los MPM que se encuentran en los extremos del gel, es preciso señalar que el corrimiento se repitió dando un tratamiento previo a la cámara con NaOH, para eliminar el exceso de sales que pudieran causar problemas en la electroforesis, sin embargo en todos los casos las muestras que se colocaban en los extremos presentaron un comportamiento similar lo cual nos indico una falla en el equipo.

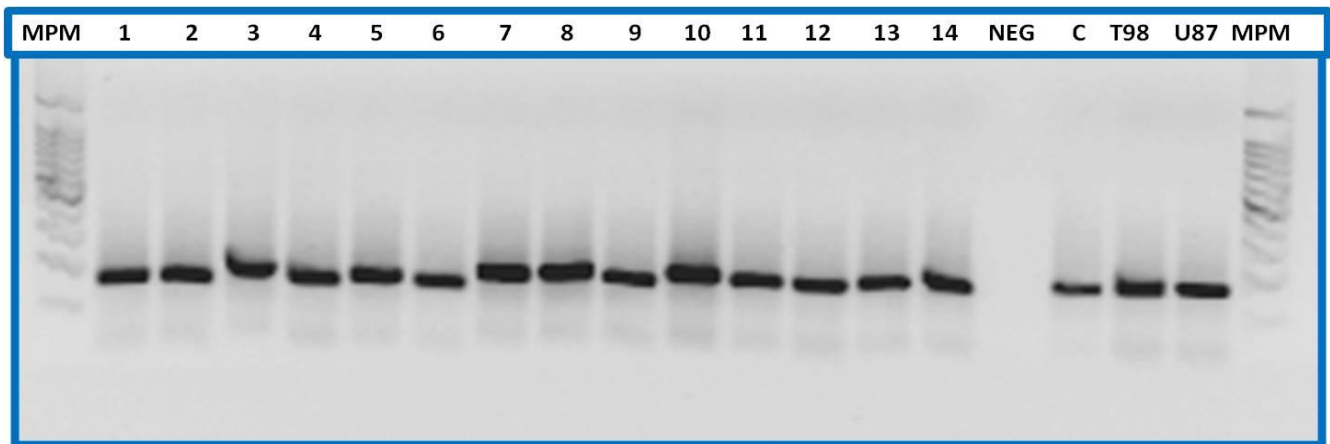
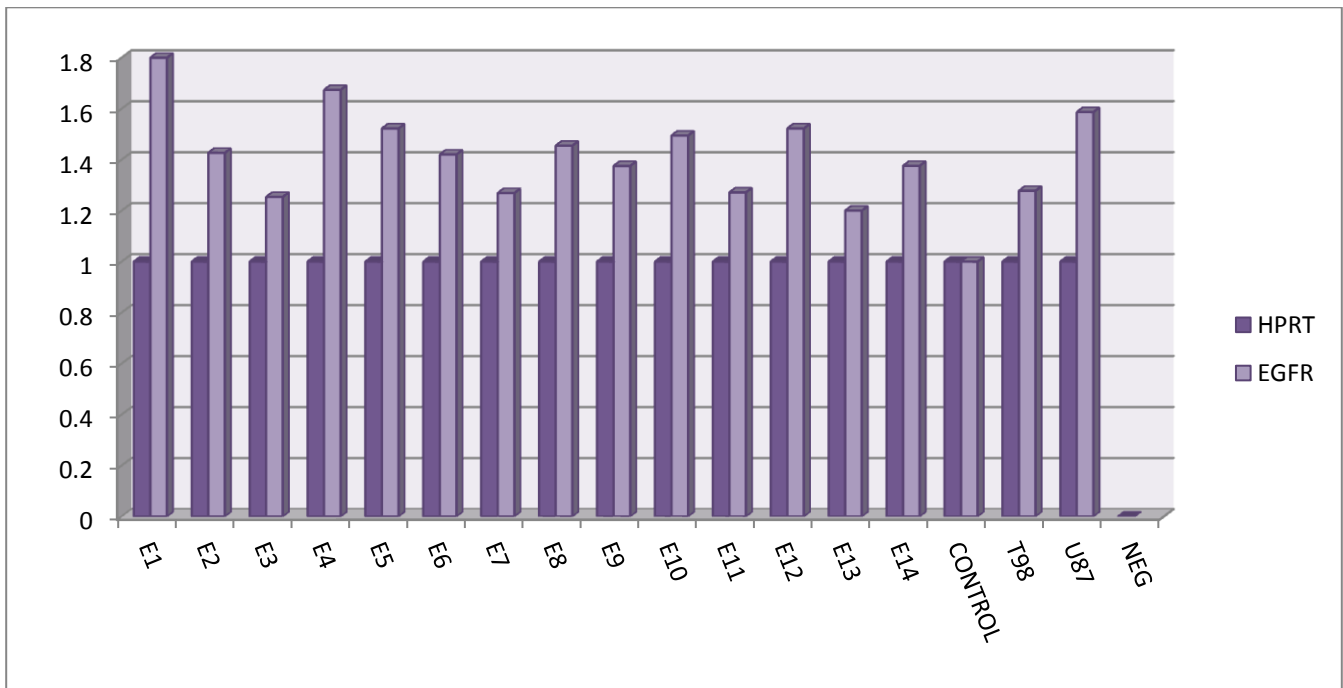


Figura 30. Gel de agarosa al 1.5 de productos de EGFR.
Los dígitos en los carriles corresponden a las claves otorgadas a cada muestra.

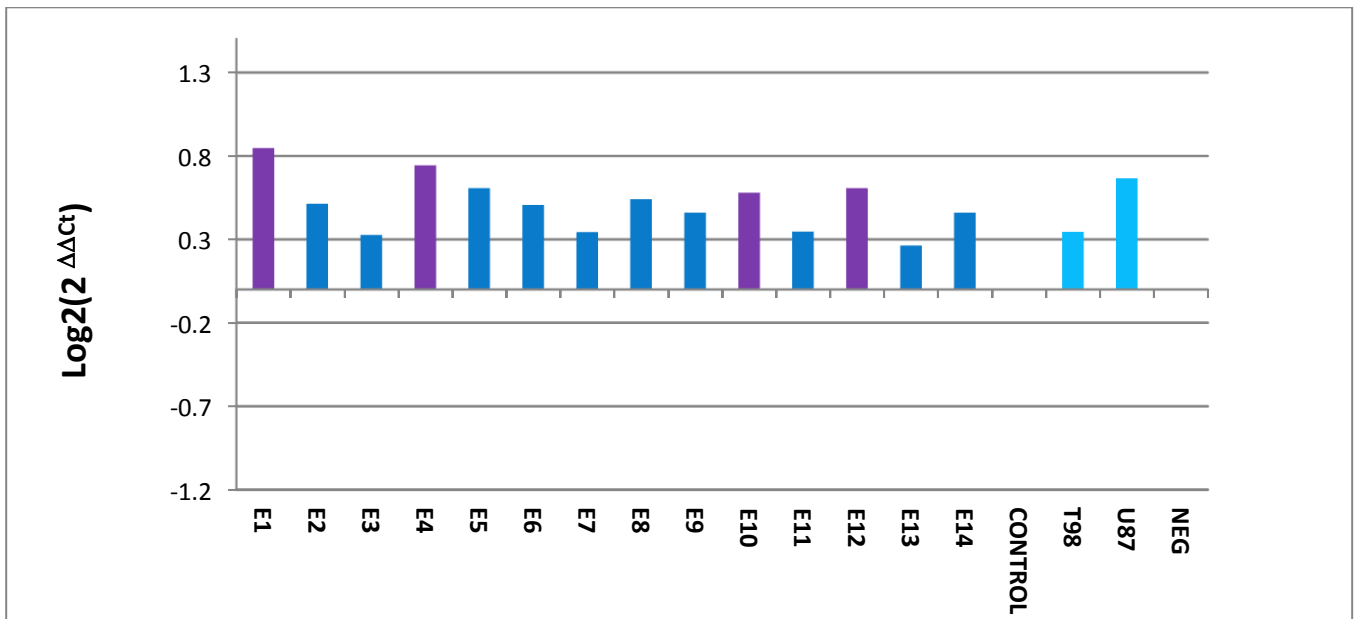
Los promedios de las Ct obtenidos en las reacciones fueron considerados, para calcular la ΔCt restando el promedio de Ct de EGFR menos el promedio de Ct de HPRT. Se procedió a calcular $(2^{-\Delta Ct})$ para conocer la expresión relativa del gen tomando como referencia el nivel de expresión del gen control. Los datos obtenidos de la normalización se presentan en la gráfica 10.

En la gráfica 10, se observa que el gen EGFR se expresa en todas las muestras y en las líneas celulares T98 y U87, no obstante, se aprecia un ligero incremento en la expresión en comparación con HPRT en todas las muestras, exceptuando el valor obtenido en la muestra de tejido sano. Aunque no se duplica el valor de la expresión de HPRT. Las muestras (1, 4, 5, 10 y 12) y la línea celular U87 alcanzan los valores de expresión relativa más altos.



Gráfica 10. Expresión relativa de EGFR en comparación con HPRT.

Para analizar si la diferencia de expresión entre las muestras y el tejido sano realmente era significativa, se transformaron los valores de $(2^{\Delta\Delta Ct})$ a Log base 2.



Gráfica 11 Expresión de EGFR en comparación con el tejido de cerebro sano

En la gráfica11, se observa que las catorce muestras registraron valores superiores al valor correspondiente a la muestra de tejido sano, no obstante ninguno de los valores sobrepasan el sitio de corte de

+1, esto sugiere que la sobre-expresión del gen EGFR no es significativa. Sin embargo, se aprecia que existe mayor expresión de EGFR en las muestras (1, 4 y U87) en comparación con el control.

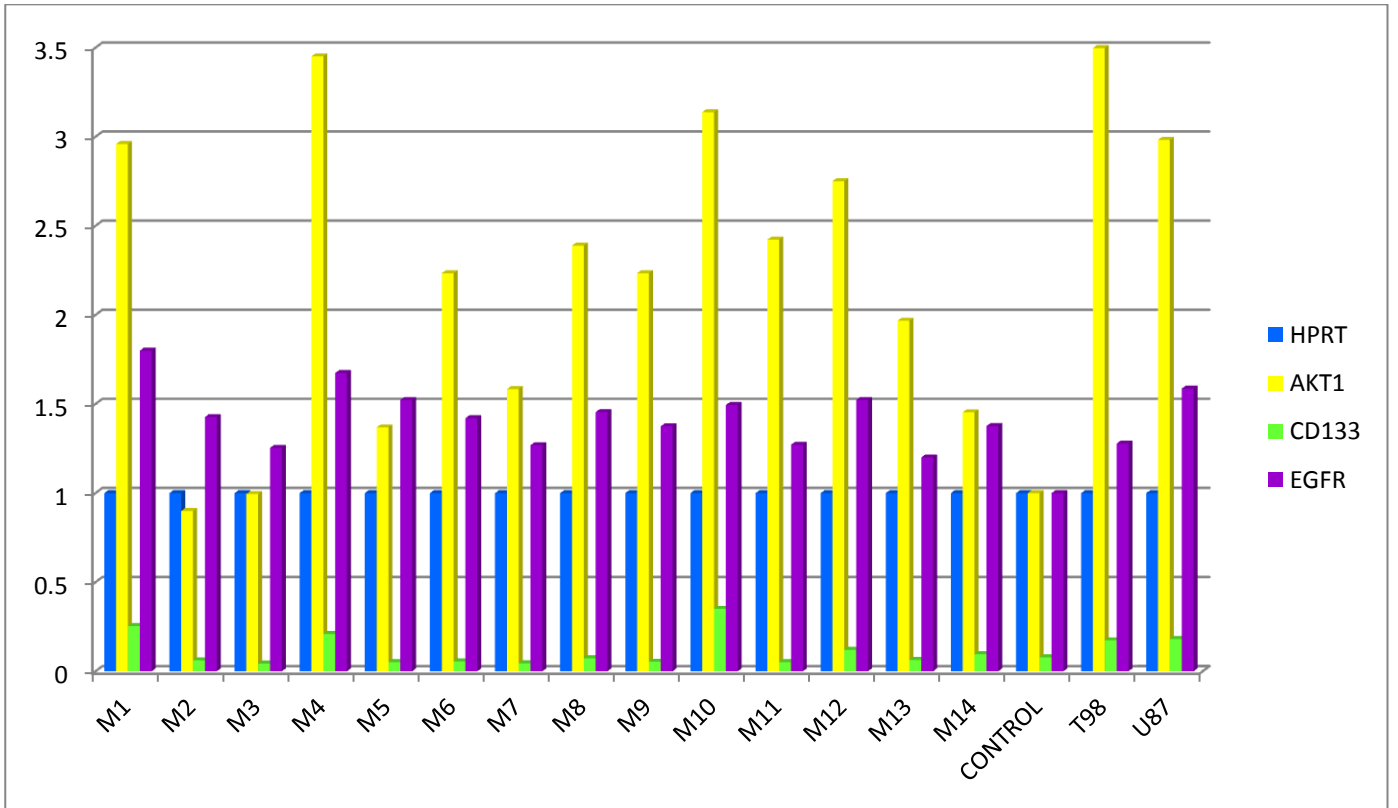
Es importante recalcar que el gen EGFR se encuentra amplificado en aproximadamente el 40% de los glioblastomas. Por otra parte, se han reportado que en la mitad de los casos se dan reordenamientos del gen amplificado, también se han descrito que un gran número de deleciones en EGFR, estos fenómenos dan lugar a un transcrito y proteínas aberrantes. Las deleciones descritas se dan tanto en el dominio extracelular como en el intracelular, sin embargo no se han descrito deleciones en el dominio transmembranal o en el subdominio tirosín cinasa. Los reordenamientos más frecuentes se dan en la región extracelular del receptor y se ha detectado la existencia de tres tipos diferentes de deleciones en este dominio extracelular del EGFR.

Como se mencionó anteriormente la alteración más frecuente en los astrocitomas pediátricos es la sobre-expresión de EGFR que conlleva un crecimiento celular descontrolado y un fenotipo maligno. Aparentemente, este tipo de alteración es un evento tardío en la progresión de los gliomas al igual que la pérdida del cromosoma 10, lo cual explica porqué los valores obtenidos en las 14 muestras a pesar de ser mayores a los obtenidos para HPRT no son significativos.

Se ha usado el EGFR como marcador de pronóstico, ya que en algunos tumores se puede correlacionar su sobre-expresión con el mal pronóstico. Actualmente, se está estudiando el empleo del EGFR como diana en la terapia génica contra el cáncer.

En la siguiente gráfica (Gráfica 12) se muestran los valores obtenidos para AKT1, CD133, EGFR y HPRT en las 14 muestras y en los controles, en la cual se evidencian las diferencias de expresión de los genes analizados en comparación al control endógeno. Los valores de AKT1 son mayores a los valores obtenidos para los tres genes restantes, seguido del transcrito EGFR, mientras que para el gen CD133 se reportan los valores de expresión más bajos.

Se observa una diferencia en el patrón de expresión de las moléculas analizadas entre las muestras correspondientes a tumores de alto grado (1, 4, 10 y 12) y las muestras de tumores de bajo grado (2, 3, 5, 6, 7, 11 y 14), sin embargo las muestras (8, 9 y 13) a pesar de ser consideradas de bajo grado revelan cierta similitud con las de alto grado. Por otra parte, en la gráfica 13 es evidente que existe diferencia de expresión de las 14 muestras y las líneas celulares T98 y U87 en comparación con el control (tejido sano).



Gráfica 12. Expresión de AKT1, CD133, EGFR y como control de expresión HPRT.

Los productos del PCR en punto final de GABA B Receptor de las dos líneas celulares utilizadas y de la muestra de cerebro sano, se corrieron en una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1.5% para verificar que los fragmentos obtenidos fueron de 220 pb.

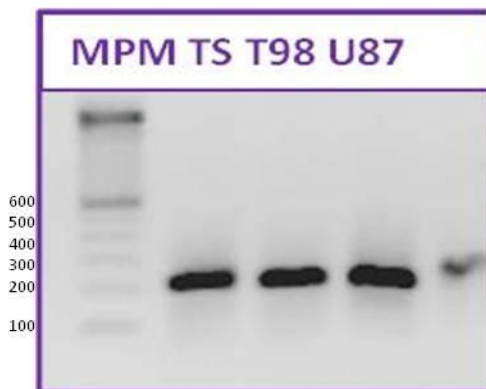


Figura 31 Gel de agarosa al 1.5 de productos de GABA B Receptor.

En la figura 31, se observa que tanto las líneas celulares, como la muestra del cultivo primario de cerebro sano expresan el gen GABA B Receptor, el cual al ser un receptor acoplado a GABA debe de estar presente de forma constitutiva en el cerebro, la presencia de este gen en las muestras indican que las líneas celulares si corresponden a este órgano, por lo que pueden ser utilizadas como controles. La expresión de

GABBR en el cerebro es de vital importancia ya que generalmente se encuentra acoplado a GABA el cual es el principal neurotransmisor inhibitorio en el sistema nervioso central en mamíferos. GABA ejerce sus efectos a través de receptores ionotrópicos, para producir la inhibición sináptica rápida, produce señales lentas y prolongadas.

La expresión de este gen utilizado como marcador en las líneas celulares y el tejido sano corrobora que la elección de estas muestras como control positivo y negativo de este estudio fue correcta, por lo que las comparaciones en los niveles de expresión de los transcritos estudiados son válidas.

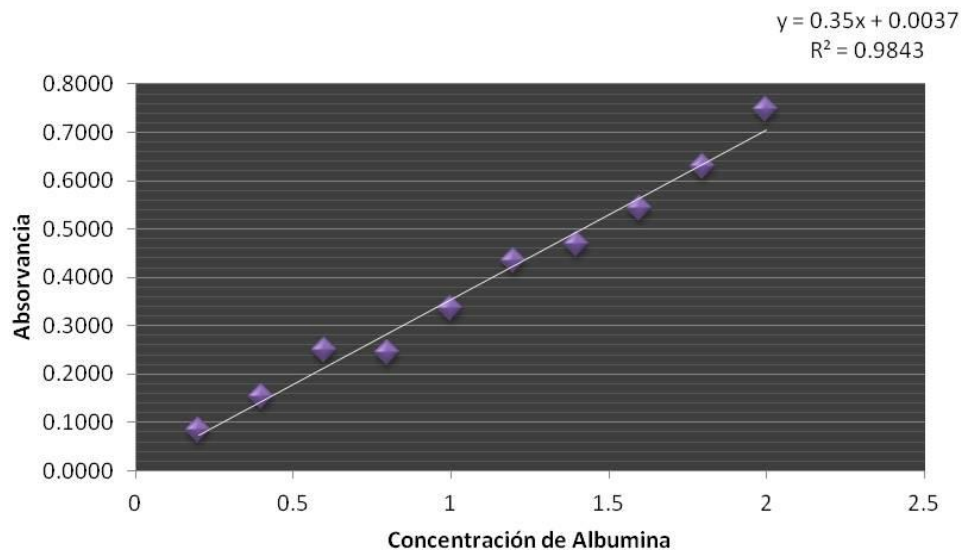
7.3. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

Una vez obtenidas las proteínas por la técnica anteriormente mencionada se procedió a la cuantificación de las mismas con utilizando el método colorimétrico BCA para conocer el volumen que se requería de cada una de ellas para ajustar la concentración a 50µg/ml que es necesaria en los ensayos de Westernblot.

En la Tabla 7, se muestran los datos obtenidos en la curva de referencia donde el valor de R fue de 0.9843, lo que sugiere que los valores reportados son adecuados para poder utilizarlos.

Tabla 7. Absorbancias registradas para las diferentes concentraciones de Albumina

[µg/ml]	ABS	Desv
0.2	0.0847	0.0055
0.4	0.1520	0.0181
0.6	0.2490	0.0528
0.8	0.2443	0.0880
1	0.3353	0.0159
1.2	0.4333	0.0234
1.4	0.4680	0.0471
1.6	0.5433	0.0110
1.8	0.6293	0.0132
2	0.7477	0.0304



Los promedios de los valores de absorbancia registrados en cada lectura espectrofotométrica se registran en la tabla 8, así como la concentración de cada muestra proceda.

Tabla 8. Valores de absorbancia registrados para cada muestra y la concentración a la cual corresponde.

CLAVE	X de Absorbancia	[]	[µg/ml]
1	0.378	100.278	10.0278
2	0.416	110.833	11.0833
3	0.321	84.4444	8.44444
4	0.549	147.778	14.7778
5	0.289	75.5556	7.55556
6	0.278	72.5	7.25
7	0.567	152.778	15.2778
8	0.226	58.0556	5.80556
9	0.492	131.944	13.1944
10	0.376	99.7222	9.97222
11	0.421	112.222	11.2222
12	0.399	106.111	10.6111
13	0.356	94.1667	9.4166
14	0.809	220	22

Biol. Pilar Amellali Badillo Suárez

Con la finalidad de revisar la integridad de las proteínas se realizaron los geles SDS-PAGE, los cuales después del corrimiento fueron teñidos con azul de Coomassie durante toda la noche y desteñidos con Metanol al 40% y ácido acético al 7.5%.

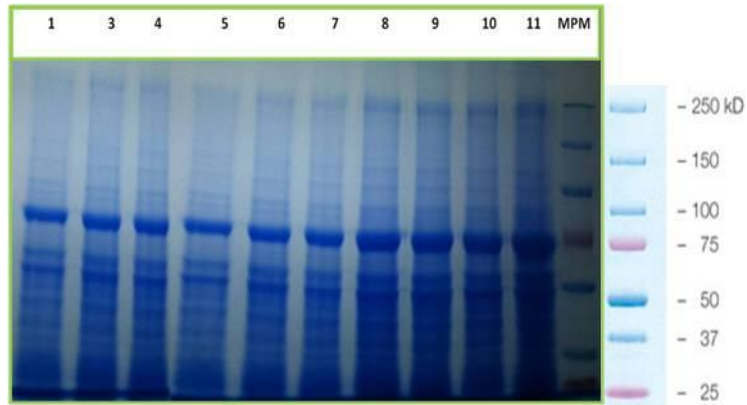


Figura 32 Gel de Poliacrilamida para visualizar proteínas.

7.5. WESTERN BLOT

Los resultados obtenidos en las electroinmunotransferencias de GADPH, AKT1, CD133 y EGFR se presentan las figuras 34, 35 y 36. Cabe destacar que para el análisis de EGFR y CD133 se utilizaron geles de poliacrilamida al 5 y 10% ya que son moléculas de mayor peso (175 kDa y 133 kDa, respectivamente). Mientras que para GADPH y AKT1 se prepararon geles de 6 y 12% debido a que el tamaño de ambas es menor (36 kDa y 60 kDa). Se verificó que las bandas encontradas en cada ensayo correspondieran a los tamaños esperados colocando la placa revelada sobre la membrana para marcar las bandas correspondientes al MPM.

Las tres proteínas analizadas se expresaron en las catorce muestras, sin embargo es evidente que la intensidad de las bandas sí es diferente conforme incrementa el grado tumoral ya que las bandas correspondientes a las líneas celulares de Glioblastomas (T98 y U87), así como, de los tumores de alto grado (1, 4, 10, 12 y 13) son más intensas en comparación con las bandas correspondientes a tumores de bajo grado (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 14) y el cerebro sano. Es necesario resaltar que las bandas correspondientes a los pacientes 10 y 13 para cada una de las proteínas presenta mayor similitud con las muestras de alto grado lo cual sugiere que el cambio de diagnóstico que se les había proporcionado es incorrecto y si corresponden a tumores astrocíticos de alto grado.

Con la finalidad de corroborar que la cantidad de proteína utilizada en cada ensayo fuera la misma también se realizaron los WB utilizando tanto el anticuerpo correspondiente a cada proteína y el de GADPH. Para así proceder al análisis densitométrico y realizar la comparación entre las proteínas analizadas y la constitutiva.

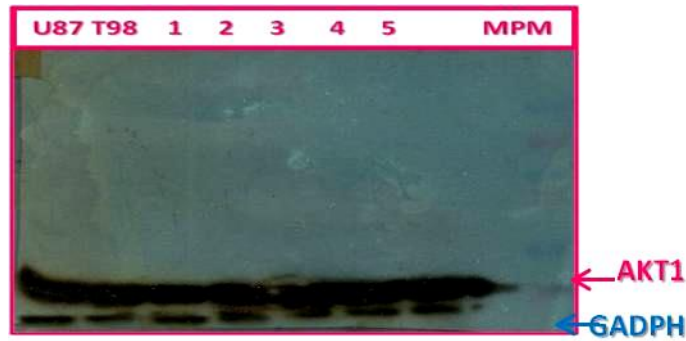


Figura 33. Westernblot de AKT1 y GADPH.

AKT1

Las imágenes obtenidas de los Western blots de AKT1 y GADPH se presentan en la Figura 33, donde los dígitos corresponden a las claves asignadas a cada paciente. Donde se hace evidente la diferencia en la expresión de ambas proteínas.

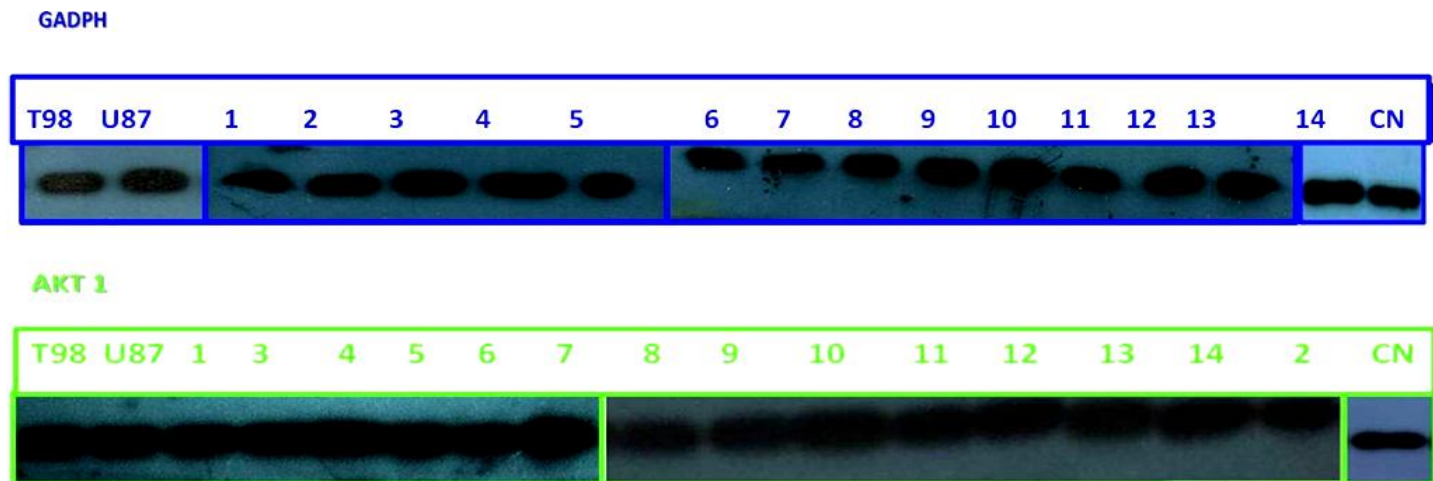
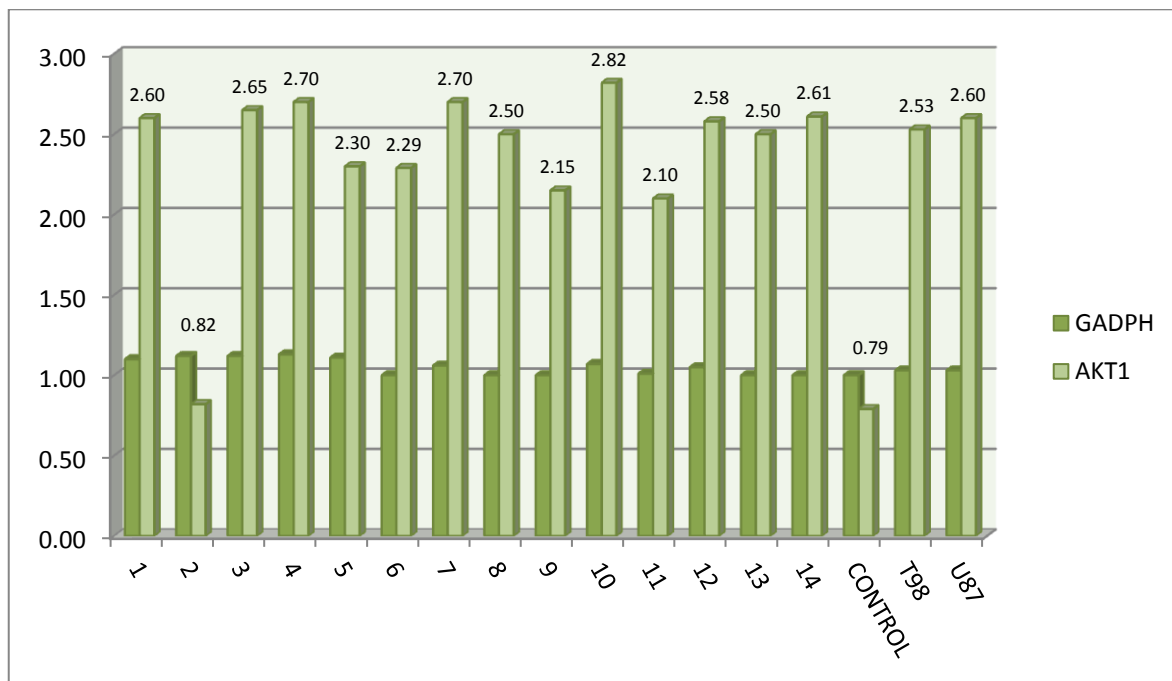


Figura 34. Western blots de AKT1 (verde), contra GADPH (azul).

Para la proteína AKT1 se presentan resultados que indican sobre-expresión o la acumulación de la misma en los diferentes grados tumorales, ya que la intensidad de las bandas en todos los pacientes es superior en comparación con los datos obtenidos para GADPH, la cual se expresa de manera constitutivo en el ser humano. Considerando los diferentes grados tumorales en el caso de esta proteína la diferencia de expresión es mínima ya que los pacientes (1, 4, 10 y 12) únicamente muestran un ligero incremento, en comparación con las otras muestras. Sin embargo, si existe una diferencia significativa si se comparan las bandas de los pacientes (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14) con las bandas obtenidas para el tumor 2 y la muestra de cerebro sano cuya señal fue más débil lo cual se vio reflejado en la intensidad.

Considerando que esta proteína se encuentra involucrada en diferentes vías de señalización tales como: P13K/Akt1, vía de las MAPK, apoptosis y adhesión celular, es necesario analizar las posibles consecuencias que se puedan derivar de la sobreexpresión.

En la gráfica 13, se presentan los valores obtenidos en el análisis densitométrico de la proteína AKT1 en comparación con GADPH, donde se aprecia un ligero cambio de expresión de la proteína constitutiva en algunas muestras.



Gráfica 13. Expresión de las proteínas AKT1 y GADPH.

Retomando los resultados obtenidos en Tiempo Real para el transcrito de esta proteína, en los cuales se reporta el incremento de la expresión en ocho de los catorce pacientes, así como, en las líneas celulares T98 y U87 se propone que este patrón de expresión puede estar involucrado en el proceso la adhesión celular; el cual es un paso crítico en la metástasis del cáncer que se activa por las fuerzas extracelulares. Ya que este tipo de presión extracelular promueve la fosforilación de AKT1 y por tanto la reducción de la forma no activada, lo que suprime la adhesión de las células cancerosas dando lugar a la progresión tumoral (Wang , *et. al.*, 2008). Es preciso recalcar que cuatro de los ocho pacientes en los que se encontró sobreexpresión del transcrito corresponden a tumores de alto grado, lo cual reafirma la idea anteriormente expuesta.

CD133

En la Figura 34, se muestran las bandas obtenidas en los Western blots de CD133 y GADPH, en las cuales se aprecia cierta similitud entre las bandas adquiridas para ambas proteínas, lo que indica que la expresión de ambas proteínas es igual. No obstante se observa un ligero incremento en la expresión de CD133

en las muestras (10 y 12). Tomando en cuenta las bandas correspondientes a CD133 se aprecia la diferencia de expresión entre todas las muestras, las líneas celulares y el tejido sano.

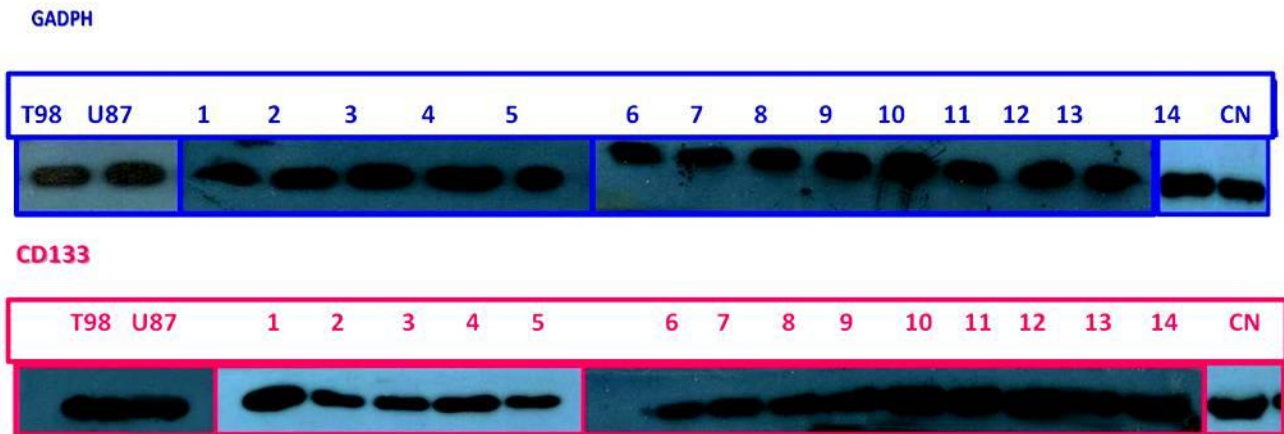
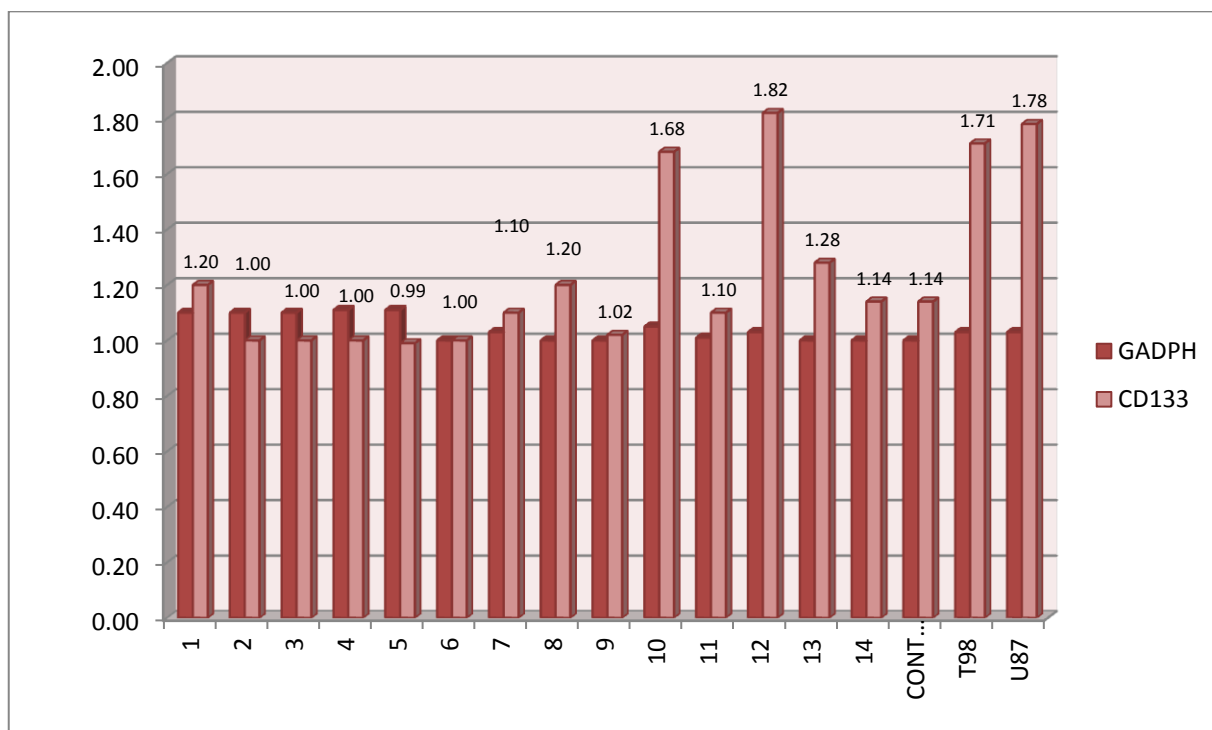


Figura 35. Westernblots de CD133(rosa), contra GADPH (azul).

La proteína CD133 se expresa de manera normal en la mayoría de las muestras, (3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 9 y 11) ya que la señal obtenida de esta proteína en los pacientes es muy parecida a la registrada para GADPH. En el caso de los tumores (1, 10 y 13) en comparación con GADPH se aprecia un ligero incremento, lo que posiblemente se deba a que en estas muestras la expresión de CD133 es mayor, sin embargo no se podría considerar sobreexpresión.

La expresión de la proteína CD133 en comparación con GADPH se observa en la gráfica 14, donde se aprecia que los valores de las D.O. registradas para U87, T98 son similares a los datos reportados para las muestras (10 y 12).



Gráfica 14. Expresión de la proteína CD133 en comparación con GADPH.

Al ser considerada CD133 una molécula que interviene en la proliferación celular y al tener como objeto de estudio los tumores astrocíticos, se esperaba la sobreexpresión de la misma, tal como lo reportan Rebetz, *et. al.*, 2008 para tumores astrocíticos en adultos. No obstante los resultados obtenidos en este estudio no concuerdan con lo reportado previamente por lo que se sugiere que al estar también involucrado CD133 en la diferenciación celular, exista una disminución de esta. Por otro lado, se propone que el ligero incremento que se observa en muestras de tumores de alto grado (1, 10 y 13) se debe a la función que desempeña esta proteína durante el proceso de angiogénesis y al ser el cerebro el órgano afectado en esta patología es probable que el fenómeno ya mencionado se vea potencializado (García, *et. al.*, 2010).

EGFR

En la figura 36, se muestran las imágenes de las placas radiográficas de los western blots de EGFR. La expresión de la proteína EGFR y la de GADPH son similares aparentemente y se observa una diferencia de expresión entre las muestras de tumores de bajo grado con las de alto grado.

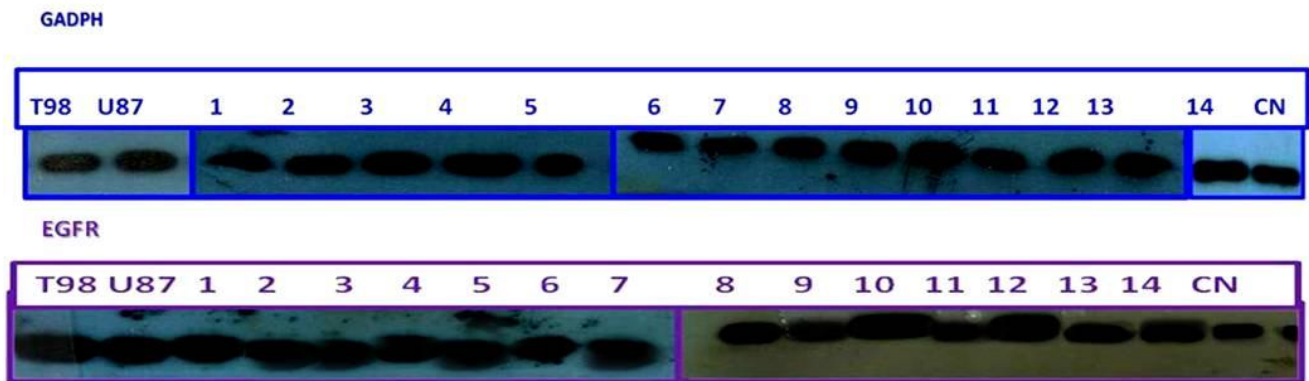
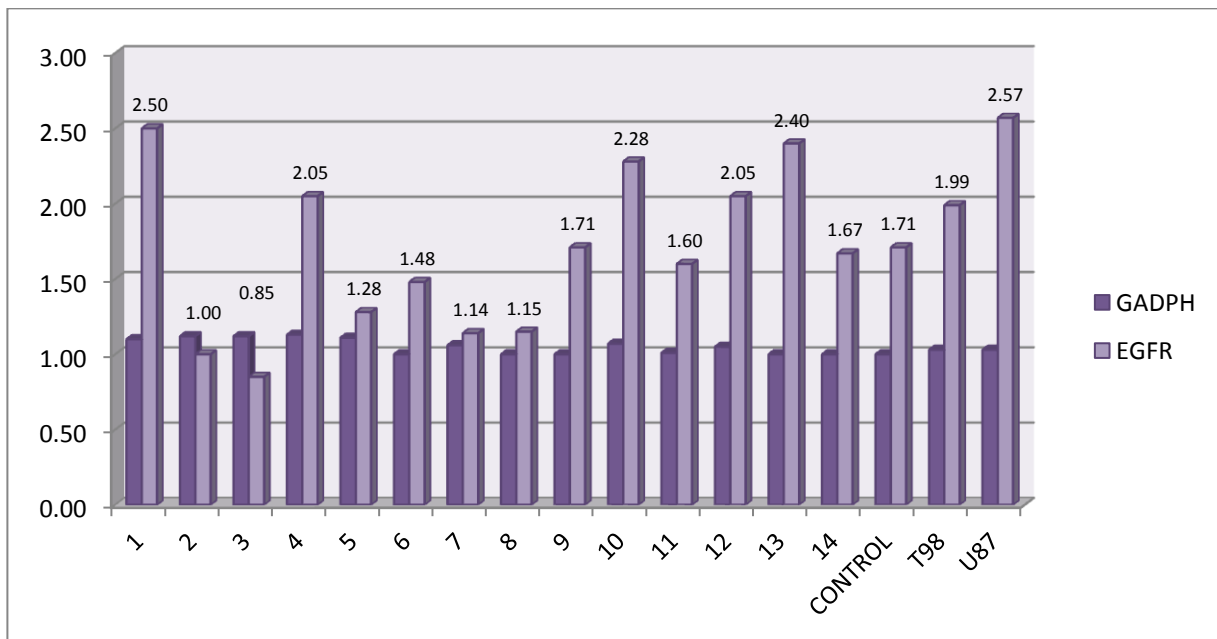


Figura 36. Electroinmunotransferencias de EGFR y GADPH.

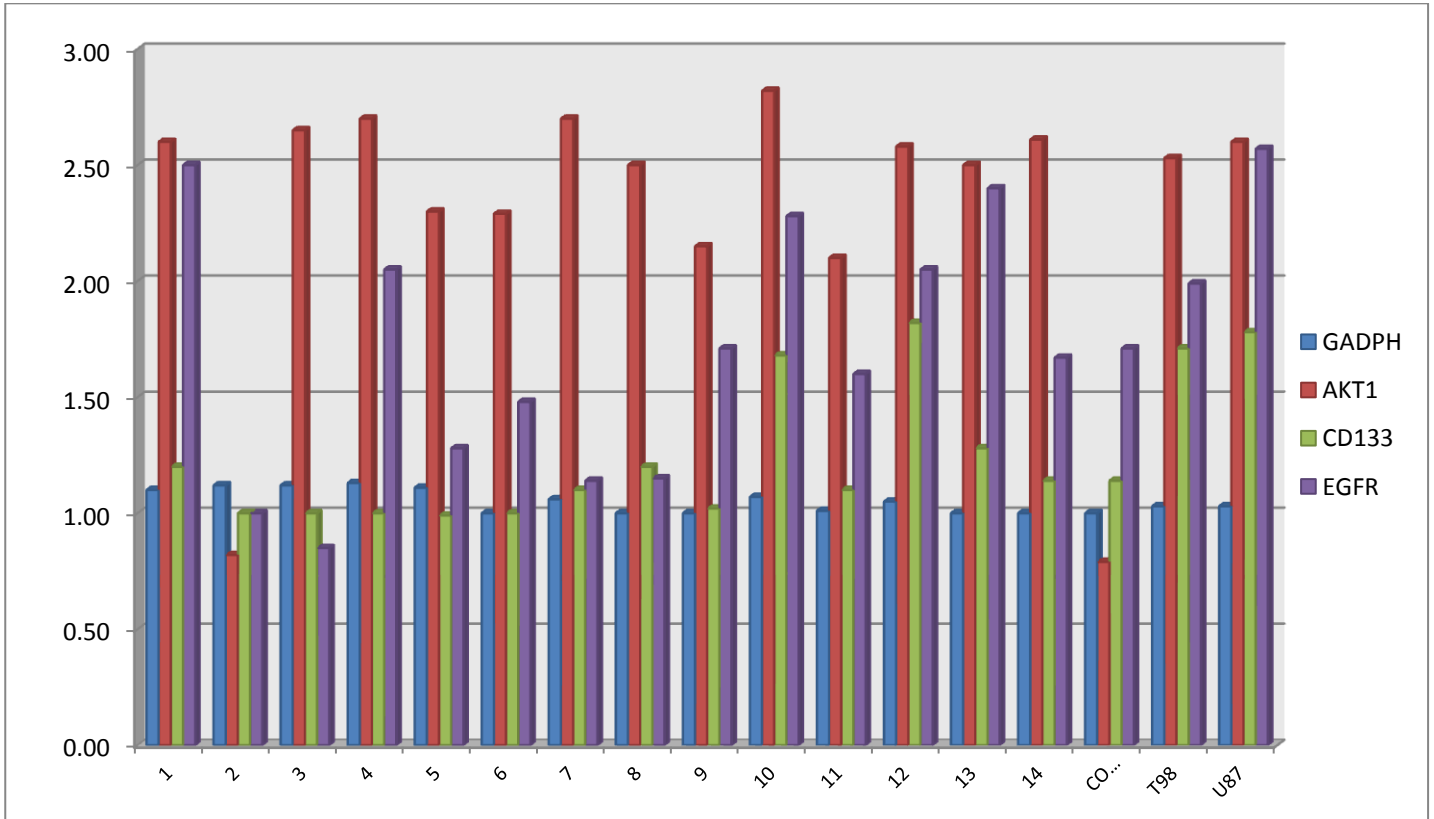
Los resultados de EGFR muestran diferencia de expresión de esta proteína entre los pacientes (1, 4, 10 y 12) y las muestras (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13 y 14) de los cuales las bandas reportadas son más ligeras. Esta diferencia de expresión entre tumores de alto y bajo grado coincide con lo reportado por Villarejo, (2007); ya que una de las alteraciones más frecuentes en este tipo de neoplasias es la sobreexpresión de esta molécula en un 80% de los pacientes pediátricos. Si se asocia a la sobre-expresión de EGFR la expresión de receptores mutantes crónicamente activados EGFRvIII, se promueve la activación persistente de vías de señalización (Ras/ERK y P13K/Akt1). Los glioblastomas también frecuentemente pierden expresión del homólogo de la fosfatasa y tensina PTEN, la cual es considerada una proteína supresora de tumor y regulador negativo de las vías de señalización PI3K/Akt1 (Márquez, *et. al.*, 2007).

En la gráfica 15, se presentan los valores de expresión EGFR y se comparan con los datos obtenidos para GADPH, donde se aprecia que los valores de las D.O. registradas para EGFR si son mayores a los de GADPH.



Gráfica 15. Comparación de la expresión de la proteína EGFR con GADPH.

En la siguiente gráfica se evidencian las diferencias de expresión de las proteínas AKT1, CD133, EGFR y GADPH, los valores de AKT1 son mayores a los valores obtenidos para los tres genes restantes, seguido del transcrito EGFR, mientras que para el gen CD133 se reportan los valores de expresión más bajos.



Gráfica 16. Expresión de las proteínas AKT1, CD133, EGFR y GADPH.

8. ANÁLISIS DE RESULTADOS

Algunas personas tienen mayor probabilidad de padecer ciertos tipos de cáncer por haber sufrido alteraciones en algunos genes específicos. La presencia de alguna de estas alteraciones recibe el nombre de marcador de riesgo. Las pruebas para detectar los marcadores de riesgo ayudan al médico a estimar la probabilidad de que la persona padezca un cierto tipo de cáncer. Los marcadores de riesgo pueden indicar que es más probable que aparezca el cáncer, mientras que los marcadores tumorales pueden indicar la presencia del cáncer. Así que, es importante el análisis de perfiles de expresión del genoma correspondientes a tejido de cerebro sano, astrocitomas de bajo grado y de alto grado para poder identificar las moléculas con expresión diferencial que permitan identificar a los pacientes de peor pronóstico, y que faciliten el diagnóstico y la clasificación. Las moléculas seleccionadas para este estudio habían sido identificadas como posibles marcadores pronósticos en estudios previos de microarreglos realizados en el laboratorio de Biología Molecular del HP de CMN SXXI.

Durante el periodo establecido de colecta se lograron captar cuarenta y dos muestras con posible diagnóstico de astrocitoma, sin embargo, considerando los criterios de exclusión e inclusión anteriormente descritos, únicamente catorce pacientes pudieron ser incluidos en el estudio. Es importante resaltar que varias de las muestras que en un inicio recibieron diagnóstico, de astrocitoma tuvieron que ser eliminadas debido a la discrepancia entre los patólogos con respecto al diagnóstico; este evento nos permitió corroborar la necesidad de buscar herramientas que pudieran auxiliar al servicio médico.

Considerando la frecuencia de los estadios tumorales se reporta un evidente predominio de tumores astrocíticos de bajo grado aportando 71.42% y el 28.57% restante corresponde a los tumores de alto grado. Estos datos coinciden con lo reportado por Villarejo (2007), ya que en la población infantil son más frecuentes los tumores de bajo grado en comparación con los adultos en los que predomina el desarrollo de Glioblastomas multiformes. Tomando en cuenta la edad de los pacientes se reporta un comportamiento similar al mencionado por Perdomo y colaboradores (2001), porque todos los pacientes menores de cinco años recibieron diagnóstico de Astrocitoma de Bajo grado, mientras que los mayores de esa edad fueron diagnosticados en proporciones similares tanto en Bajo como en Alto Grado. Es preciso recalcar que entre un 12-20% de los tumores cerebrales pediátricos ocurren en menores de tres años. La persistencia de suturas abiertas puede retrasar los signos y síntomas de hipertensión intracraneal hasta que el tumor tenga un tamaño considerable. Estos pacientes sufrirán mayor morbimortalidad por la propia enfermedad y por el tratamiento (Casano, *et.al.*, 1998).

Considerando las frecuencias dependiendo al género, los datos sugieren que en la población estudiada no existe predisposición a desarrollar este tipo de neoplasias en alguno de los sexos, pues el porcentaje obtenido para ambos sexos fue muy similar el 42.85% (mujeres) y el 57.14% (hombres), sin embargo hasta el momento no hay datos precisos que indiquen cual es el género más afectado en los infantes.

Dada la complejidad de los pacientes pediátricos es conveniente manejarlos en unidades de oncología pediátrica en las que colaboren neurocirujanos, radioterapeutas, radiólogos y pediatras especializados en oncología, e incluirlos en estudios cooperativos para valorar la eficacia de los protocolos.

EXPRESIÓN DEL mRNA DE AKT1

Considerando los datos obtenidos en la evaluación de la expresión a nivel de mRNA de Akt1 fue posible realizar dos tipos de análisis que permitieron comparar los valores de expresión con el control endógeno de la reacción (HPRT), así como el nivel de expresión del gen problema de cada paciente con el valor obtenido para el mismo gen en el cultivo primario. En la gráfica 6, se muestra que la expresión relativa de Akt1 fue mayor en 12 muestras y en las líneas celulares T98 y U87 mientras que el comportamiento observado en las dos muestras restantes es similar al del tejido de cerebro sano. Sin embargo, únicamente se reportan valores que duplican la expresión del gen HPRT en los pacientes (1,4,6,8,9,10,11 y 12). Es importante mencionar que las muestras (1,4,10 y 12) corresponden a tumores de alto grado, esto nos sugiere que el incremento en la expresión de este transcrito está relacionado con la progresión tumoral lo cual coincide con lo reportado

previamente en la literatura. El incremento de AKT1 o la sobre-expresión del mismo puede activar de forma continua la vía fosfatidilinositol 3-cinasa (PI 3-K)/AKT lo cual trae consecuencias negativas para las células.

Esto se debe a que Akt (serina / treonina proteína cinasa) es el transductor principal de la señal de la (PI 3-K) y desempeña un papel fundamental en todas las células y en los tejidos ya que participa en el mantenimiento de los procesos celulares, incluyendo el crecimiento celular, el metabolismo, pero sobre todo en proliferación y la supervivencia (Yang , *et.al.*, 2009). AKT1 se encarga de fosforilar a diversas moléculas y los procesos de fosforilación de proteínas son fundamentales para la regulación de las funciones celulares. La acción coordinada de las proteínas cinasas y fosfatasa controla los niveles de fosforilación y, por lo tanto, la actividad de proteínas diana específicas. Uno de los papeles predominante de la fosforilación de proteínas es en la transducción de señales, donde las señales extracelulares se amplifican y se propagan por una cascada de fosforilación y desfosforilación de proteínas. Dos de las vías de transducción de señales más importantes implican el cAMP dependiente de la proteína cinasa y de la proteína cinasa C (PKC). Cada ruta utiliza un segundo mensajero diferente para activar la proteína cinasa, que, a su vez, fosforila moléculas diana específicas (Lee, *et.al.*, 2001).

Numerosos estudios han proporcionado una comprensión global de las funciones específicas de señalización Akt en las células cancerosas, así como el microambiente tumoral circundante, lo que ha permitido el desarrollo de fármacos terapéuticos para dirigirse tanto a PI 3-K y Akt. No obstante se le atribuye a Akt la frecuente activación aberrante de esta vía, lo cual es un evento común en diferentes tipos de cáncer convirtiéndose así Akt en atractivo blanco terapéutico. Sin embargo, estudios recientes han proporcionado evidencia de que las tres isoformas de Akt presentes en mamíferos cumplen distintas funciones en particular con respecto a la regulación de la motilidad celular, migración y la metástasis del cáncer, respectivamente (Chin y Toker, 2009).

Es importante recalcar que las tres isoformas: Akt1 (PKB α), Akt2 (PKB β) y Akt1 (PKB γ), se pueden unir a PIP₃ a través del dominio homólogo a la pleckstrina y para después ser translocadas a la membrana plasmática donde son activadas por la fosforilación en Ser473 y Thr308, una vez activadas las moléculas de Akt promueven la proliferación celular e inhiben la apoptosis a través de la fosforilación de múltiples sustratos, incluyendo la caspasa-9, Bad, GSK3 y activa factores de transcripción como FKHR(FOX1), FKHL (FOXO3) y AFX (FOXO4) (Hui-Fang, *et.al.*,2009). Los factores de supervivencia pueden suprimir la apoptosis de una manera independiente a la transcripción mediante la activación AKT1, que fosforila e inactiva a los componentes de la maquinaria apoptótica, incluyendo BAD y la caspasa-9. Brunet et al. (1999) demostraron que AKT1 también regula la actividad de FKHL1 (FOXO3A), un miembro de la familia de factores de transcripción forkhead. En presencia de factores de supervivencia, AKT1 fosforila FKHL1, que conduce a la asociación de FKHL1 con proteínas 14-3-3 y a su retención en el citoplasma. La eliminación del factor de supervivencia conduce a la desfosforilación de FKHL1, la translocación nuclear, y activación del gen diana. Dentro del núcleo, FKHL1 más probable desencadena la apoptosis mediante la inducción de la expresión de genes que son críticos para la muerte celular, como el gen TNFSF6 (Hu, *et.al.*, 2004).

Por otra parte, realizando un análisis más detallado de los resultados obtenidos en la normalización de los valores de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ como se muestra en la gráfica 7, fue posible identificar las muestras cuya diferencia de expresión fueron realmente significativas al ser comparadas con el valor registrado para el cultivo primario de cerebro. En dicha gráfica se hace evidente el incremento de expresión de este transcrito en doce de las muestras analizadas, sin embargo únicamente las muestras (1, 4, 6, 8, 9, 10, 11, 12) presentan valores que sobrepasan el umbral, esto indica que sólo estas muestras sobre-expresan de forma significativa al gen Akt1. Por otra parte cabe destacar que la muestra 3 registro valores similares a los del tejido sano y la muestra 2 registró un ligero decremento en la expresión de Akt1, esto posiblemente se deba a que el RNA total no fue almacenado correctamente o en el momento de ser procesado haya sufrido degradación ocasionando que la concentración real de RNA de la cual se partió para los ensayos fuera menor a la indicada.

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA AKT1

En el análisis de expresión proteica de Akt1 (Ver Figura 34) se observa que la proteína se encuentra presente en todas las muestras analizada incluyendo las líneas celulares y el cultivo primario. Las bandas correspondientes a Akt1 presentan mayor intensidad en todas las muestras de pacientes en comparación con las obtenidas para GADPH. No obstante se aprecia que las bandas de GADPH no son completamente similares entre sí por lo que se consideró la posibilidad de que esta proteína no fuera la adecuada para ser propuesta como control de expresión. Por lo que, fue necesario realizar una búsqueda para poder identificar si la expresión de ésta se encontraba comprometida en dicha patología, sin embargo, reportan que GADPH representa una buena opción como control para determinar la expresión de moléculas involucradas en los glioblastomas, debido a que GADPH no se encuentra involucrada en la regulación de los mecanismos de hipoxia que generalmente se presentan en estas neoplasias (Harun *et.al.*, 2007).

Para poder llevar a cabo un análisis cuantitativo de expresión las placas de los WB fueron documentadas para obtener los datos de las D.O. de cada una de las bandas y proceder a la comparación con la proteína control. En la gráfica 13, se muestra que la expresión de la proteína Akt1 es mayor a la de GADPH en 13 pacientes y en las líneas celulares T98 y U87, únicamente la muestra 2 y el cultivo primario registraron similares a los de GADPH. También se observa una diferencia de expresión entre los tumores de alto grado y los de bajo grado; lo cual sugiere que la sobre-expresión de Akt1 está directamente relacionada con la progresión tumoral esto coincide con reportes previos (Wang *et.al.*, 2010). Por esta razón es necesario identificar todos los eventos en los que se vea implicado Akt1 como es el caso de la adhesión celular.

Los cambios en la adhesión celular son un paso crítico en la metástasis del cáncer; este fenómeno es activado por fuerzas extracelulares. La reducción de Akt1, pero no Akt2, repercute en la pérdida de adhesión celular asociada con cáncer por el aumento de la presión extracelular. El incremento de la presión estimula la translocación de Akt1, pero no Akt2 a la membrana plasmática. Se ha identificado que el dominio PH AKT1 y la región de la bisagra son dominios funcionales que en conjunto permiten la translocación de AKT1 y la fosforilación en respuesta a los estímulos extracelulares y permiten determinar la especificidad de AKT1 en la

mediación de los efectos de la presión extracelular sobre la adhesión de las células cancerosas (Wang y Basson, 2008).

Finalmente, otro evento en el que los cambios de expresión de la proteína Akt1 encontrados en las muestras estudiadas pueden tener repercusión es en la formación de nuevos vasos sanguíneos para que los nutrientes sean accesibles a los tumores. La cascada de señalización PI3K/AKT no sólo se relaciona con las funciones celulares descritas anteriormente, sino también con la angiogenesis, la migración y la degradación de la matriz extracelular; la cual es activada por factores de crecimiento e inductores de la angiogenesis como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF), EGFR, IGF1 y las angiopoyetinas. La amplificación y mutaciones de PI3K y la pérdida de la PTEN supresor tumoral son comunes en diversos tipos de tumores sólidos humanos. Las alteraciones genéticas de las moléculas de señalización de río arriba y río abajo de PI3K, como receptores de tirosina cinasas y AKT1, respectivamente, también están frecuentemente alteradas en el cáncer. PI3K regula el crecimiento tumoral y la angiogenesis mediante la activación de Akt1. mediante la inducción de HIF-1 y la expresión del VEGF (Jiang y Liu., 2009).

EXPRESIÓN DEL mRNA DE CD133

Como se mencionó anteriormente CD133 es una glicoproteína que posee 5 regiones transmembranales y dos dominios extracelulares que sufren glicosilación. Se sabe que la transcripción de este gen puede estar controlada por cinco promotores alternativos (P1-P5) y que el exón 1 puede sufrir procesamiento (splicing) en la región 5'ÚTR las cuales se expresan de forma tejido específico. También se ha reportado que el estado de metilación de las islas CpG en los promotores 1 y 2 se relacionan inversamente con los niveles de expresión del mRNA de CD133 en gliomas humanos. Los niveles de expresión del mRNA de CD133 ha sido relacionado directamente con el estadio tumoral y el mal pronóstico de los pacientes, sin embargo aún existe controversia porque es considerado un marcador del proceso tumorigénico aunque la sobre-expresión de este gen no es un factor suficiente para inducir la transformación celular (Rebetz *et.al.*, 2008).

Los datos obtenidos en los ensayos de PCR en tiempo real para el gen CD133 indican una ligera disminución en la expresión del gen con respecto a HPRT. Los valores de fluorescencia registrados para CD133 fueron menores a los reportados para HPRT lo cual indica que la expresión relativa del gen se encuentra por abajo del valor de 1, sugiriendo la sub-expresión del gen. Las muestras que reportaron valores más altos fueron (1, 4 y 10), por otra parte las líneas celulares T98 y U87 provenientes de glioblastomas reportan incluso valores inferiores a los de los pacientes (1, 4 y 10).

Como se muestra en la gráfica 8, el análisis de $\text{Log}_2(2^{\Delta\Delta\text{Ct}})$ en las muestras (2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 13 y 14) así como la de cerebro sano se encuentra sub-expresado el gen CD133 aunque los valores obtenidos no son significativos porque no sobrepasan la línea de corte pero si sugieren una evidente disminución del transcrito. Mientras que las muestras (1, 4 y 10) y las correspondientes a las líneas celulares se encuentran arriba del valor inicial lo cual puede indicar que conforme incrementa el grado tumoral la expresión de CD133 también comienza a incrementar.

Estos valores fueron corroborados en un corrimiento electroforético (Ver figura 28) para identificar si las bandas obtenidas eran menos intensas que las de HPRT. Este comportamiento indica que la expresión del mRNA de CD133 es baja en las células normales e incluso en la mayoría de las células tumorales lo cual coincide con lo reportado por diversos autores que afirman que las células CD133+ son minoría en los tumores ya que estas células son las que poseen la capacidad de generar un tumor (Yang, *et.al.*, 2008).

Por ejemplo, se han aislado subpoblaciones de células CD133 positivas en los tumores del cerebro humano que mostraron propiedades de células madre *in vitro*. Estas características incluyen la auto-renovación y la formación de tumores (Singh et al. 2003). Por otra parte, mediante ensayos de xenoinjerto se han identificado células formadoras de tumor en cerebro humano "*in vivo*" donde sólo la fracción celular del cerebro que resulto CD133+ contiene células que son capaces de originar tumores. Estos hallazgos proporcionan información sobre esta patogénesis y apoyan la hipótesis de que las células madre del cáncer son la base para diversos tumores sólidos (Singh et al. 2004).

Las células madre del cáncer contribuyen a la radioresistencia que se presenta en glioblastomas multiformes a través de la activación preferencial de la respuesta al daño del DNA y un incremento en la capacidad de reparación del mismo. La fracción de células tumorales que expresan CD133, el cual es considerado un marcador de células madre neurales y de las células madre del cáncer del cerebro, aumenta después de la radiación en los gliomas; por lo que la expresión de esta proteína puede ser la fuente de la recurrencia del tumor después de la radiación. Las células CD133 negativas de los xenoinjertos de glioma humano y de muestras de pacientes de glioblastoma en respuesta a la radiación no activan los procesos de reparación del DNA, no obstante se ha reportado un ligero incremento en la expresión de esta proteína después de la radiación. Se ha sugerido que la radioresistencia de las células CD133+ de los gliomas puede ser revertida con un inhibidor específico de la CHK1 y CHK2 (control-cinasas)(Bao *et. al.* 2006).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA CD133

El análisis de expresión de la proteína CD133 no coincide con los datos obtenidos en el análisis del mensajero pues la expresión del gen de interés y de GADPH es muy similar (Ver figura 35). El anticuerpo se une al epítipo extracelular glicosilado por lo que el reconocimiento puede verse afectada por su patrón de glicosilación y por el fenómeno de hipoxia o por la presencia de proteínas que presentarán mutaciones en este sitio. En la gráfica 14, se aprecia como las muestras (10 y 12) y las líneas celulares casi duplican el valor de GADPH, lo que demuestra un incremento en la expresión de la proteína en todas las muestras analizadas o la posible acumulación de la misma. Este aparente incremento en la expresión de CD133 puede estar vinculado con el proceso de proliferación y el inflamatorio. Es importante resaltar que esta discrepancia posiblemente se deba a que el control utilizado para el análisis del mensajero fue HPRT y no GADPH, sin embargo no hay que descartar la desregulación en la degradación de la proteína ya que posiblemente se estén mandando señales de ubiquitinación y por tanto no está siendo degradada. No obstante es necesario considerar las funciones biológicas de esta molécula dentro de esta patología o de otras por las repercusiones que pueda generar.

La expresión y sobre-expresión de CD133 aunado con el incremento de la expresión de COX-2 son un factor condicionante que ha sido asociado con los gliomas más agresivos y por tanto son considerados predictores de mal pronóstico. COX-2 es una enzima inducible responsable de la producción de prostaglandinas en los sitios de inflamación que generalmente se encuentra sub-expresado en los glioblastomas multiformes. Mientras que se ha demostrado que los inhibidores de la biosíntesis de los eicosanoides suprimen la proliferación celular y promueven la diferenciación de los astrocitos (Annabi *et.al.*, 2009).

Se ha relacionado la expresión de CD133 con el efecto de la privación de oxígeno. La hipoxia aumenta significativamente el porcentaje de células CD133 + de 69% a 92% ya que el fenómeno de hipoxia promueve el estado de glicosilación de CD133, lo que indica la posible participación de la proteína CD133 glicosilada en el proceso de anti-apoptosis mediada por hipoxia (Lehnus, *et.al.*, 2013). Por otra parte se ha definido que el potencial de invasión de las GSCS que se registran CD133 + y sus homólogos diferenciados, se debe al incremento de expresión de los genes que se asocian con la motilidad celular e incluye una serie de genes que han sido previamente asociados con la invasión de células tumorales. La expresión de CD133 + en GSCS se relaciona la regulación del microambiente del cerebro en la biología de los GBM (Rath, *et.al.*, 2013).

También se ha reportado que tanto algunas subpoblaciones celulares circulantes y las células madre hematopoyéticas expresan la proteína CD133; y que el proceso de miogénesis ha sido inducido cuando se inyectan células CD133 (+) a través de la circulación arterial o directamente en los músculos en un modelo de distrofia muscular de Duchenne. Las pruebas funcionales de los músculos inyectados revelaron una recuperación sustancial de la fuerza después del tratamiento (Torrente *et. al.* 2004).

EXPRESIÓN DEL mRNA DE EGFR

Los resultados de la expresión relativa de EGFR se presentan en la gráfica 10, en donde se percibe que todas las muestras, a excepción de la de cerebro sano, presentan un incremento en la expresión del gen en comparación con HPRT, aunque ningún valor duplica el dato registrado por el control endógeno. Se observa cómo los pacientes (1 y 4) presentaron los niveles más altos de expresión al igual que las células T98 y U87. En la figura 29, se aprecia en la curva de amplificación que las muestras comenzaron a emitir fluorescencia a partir del ciclo 16.7 aproximadamente mientras que la amplificación de Akt1 comenzó a detectarse en el ciclo 15.3, lo cual indica que no existe una gran diferencia de expresión entre estos dos genes a pesar de que por cada ciclo que incrementa el número de copias aumenta de forma exponencial. El valor registrado de EGFR en el cultivo primario es muy similar al valor de HPRT lo cual sugiere que en tejidos sanos EGFR se expresa de forma constitutiva en bajas proporciones.

La gráfica 11, muestra la comparación realizada entre el valor de la expresión de EGFR del cerebro sano contra el valor obtenido por cada muestra de EGFR. Queda claro que existe sobre-expresión del gen en todas las muestras, sin embargo, ningún dato sobrepasa la línea de corte por lo que esta diferencia no es considerada significativa. No obstante es evidente que existe una diferencia de entre los tumores de bajo y alto grado. Las bandas observadas en el gel de agarosa muestran una ligera similitud entre ellas (ver figura 30).

Es importante recordar que un gran número de tumores presentan alteración o sobre-expresión de EGFR evento que se presenta de forma tardía en la progresión de los neoplásica. Por lo que, se continúa utilizando como marcador de riesgo, ya que en algunos tumores se puede correlacionar su sobre-expresión con el mal pronóstico. Actualmente, se está estudiando el empleo del EGFR como diana en la terapia génica contra diversos tipos de cáncer, como la introducción de moléculas inhibitoras de EGFR envueltos en lipofectina para inhibir el crecimiento de las células de glioma (Muñoz *et.al.*, 2000).

Los datos obtenidos en este estudio no coinciden con lo descrito previamente ya que no se informa de la sobre-expresión del gen en ninguna muestra, a pesar de ser esta alteración la más frecuente en astrocitomas pediátricos. Con frecuencia se ha reportado en los glioblastomas tanto en adultos como en niños la sobre-expresión de EGFR y/o su variante de EGFRvIII constitutivamente activa y este evento ha sido relacionado con la tumorigénesis y con los fenotipos tumorales más agresivos, por el papel que desempeñan en la invasión y la resistencia a fármacos (Ozer *et.al.* 2010). La variante EGFRvIII, es un producto del reordenamiento del gen EGFR que presenta una delección en el dominio extracelular, el cual es más tumorigénico que el tipo silvestre EGFR (Sugawa *et.al.*, 1990). Es importante destacar que ambas vías EGFR y EGFRvIII son de una alta complejidad biológica, incluyendo la existencia de dos modos principales de señalización, en la superficie celular y el otro en el núcleo (Nishikawa *et.al.*, 1994).

EGFR y EGFRvIII como receptores de tirosina cinasas activan diversas vías de señalización mediadas por PLC- γ , Ras, PI-3K y JAK2, que pueden contribuir a la tumorigénesis y los comportamientos de tumores más agresivos (Yarden, 2001). Por otro lado los ligandos de EGFR, pueden activar señales de estrés oxidativo, reparación del daño en el DNA y estimulan el transporte de EGFR al núcleo (Lo, H y Hung M, 2006). El EGFR

nuclear se localiza en la membrana nuclear interna y en el nucleoplasma. En el modo de señalización nuclear, EGFR tiene tres funciones principales: la de transactivación de genes, la de tirosina cinasa y finalmente interacciones proteína-proteína (Klein, *et.al.*, 2004). Es importante destacar que el incremento del nivel de EGFR nuclear predice mal pronóstico en pacientes con carcinomas de mama, carcinomas escamosos orofaríngeo y en cáncer de ovario, sin embargo, su presencia en los GBM se continúa investigando.

Recientes estudios, han demostrado que EGFRvIII se detecta en el núcleo de las células gliales normales y en los cultivos primarios de GBM. Aunque EGFR carece de un dominio de unión al DNA, se ha confirmado que la interacción con factores de transcripción de unión al DNA, tales como, STAT3, E2F1 y STAT5, para inducir la expresión de genes, incluyendo, óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) y B-Myb.

De acuerdo con la capacidad de EGFR para asociarse con el factor de transcripción STAT3 e iniciar este eje de señalización se ha propuesto la activación transcripcional del gen COX-2 en células de glioblastoma. Lo cual indica una posible relación entre EGFR / EGFRvIII mediada por la vía mitogénica y las vías inflamatorias COX-2-asociados en la MBG. COX-2 desempeña un papel central en muchos procesos celulares importantes, entre ellos, la progresión de la respuesta inflamatoria y la tumorigénesis (Chien *et.al.*, 2006 y Greenhough *et.al.*, 2009).

EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA EGFR

En el análisis de la proteína EGFR (Ver Figura 36) se aprecia una diferencia de expresión entre las muestras (1, 4, 10,12) y los pacientes restantes lo cual destaca que el patrón de expresión de esta proteína es diferente en tumores alto y bajo grado, pues únicamente se observa similitud en la intensidad de las bandas que pertenecen a las líneas celulares y los astrocitomas de alto grado de malignidad. Es preciso decir que el incremento en la expresión de esta proteína juega un papel muy importante en el proceso inflamatorio por su asociación con COX-2 y en la hipoxia que generalmente se presenta en los gliomas (Greenhough, *et.al.*, 2009)

Diversas investigaciones han manifestado que EGF induce la expresión COX-2 a través de PI-3K, p38 y la proteína cinasa C- δ , aunque la vía exacta que media la activación transcripcional de COX-2 no ha sido determinada en estas condiciones. Los estudios indican que el EGFR nuclear y STAT3 activados cooperan de forma sinérgica para activar la actividad del gen COX-2. Por lo que se comprueba que existe un vínculo importante entre la familia ErbB de los receptores de tirosina cinasas, su translocación nuclear y la COX-2- mediada por la vía pro-inflamatoria (Hui-Wen *et.al.*, 2010).

La hipoxia y la necrosis son características fundamentales de los glioblastomas y su aparición es fundamental para la rápida progresión de este tipo de neoplasias, sin embargo, los mecanismos subyacentes son poco conocidos. Se ha sugerido que la oclusión de los vasos secundarios hacia una trombosis intravasculares puede iniciar o propagar la hipoxia y la necrosis en los GBMs (Tehrani *et.al.*, 2008).

El factor tisular (TF), es el principal iniciador de la coagulación, el cual se sobre-expresa en GBMs probablemente a favor de un microambiente trombótico. La amplificación EGFR y la pérdida de PTEN podrían ser responsables de la regulación negativa de TF, estos eventos son dos alteraciones genéticas comunes en los gliomas, pero no en los astrocitomas de bajo grado. La mutación de EGFR más frecuente en tumores de bajo grado implica la eliminación de los exones 2 a 7, lo que ocasiona la expresión constitutivamente activa de EGFRvIII. La sobre-expresión de EGFR o EGFRvIII en células de gliomas humanos causa incremento en la expresión TF basal y que la estimulación de EGFR por su ligando, EGF, conduce a una dosis dependiente, sobre regulación de la TF. En todos los casos, el aumento de la expresión de TF conduce a la coagulación acelerada del plasma "in vitro". La expresión de TF mediada por EGFR depende de la transcripción (AP-1) y se ha asociado con c-Jun NH2-terminal cinasa (JNK) y la activación de Jund (Vivanco *et.al.*, 2007).

La restauración de la expresión de PTEN en las células de GBM deficientes presentan un decremento de EGFR inducida por la expresión del TF mediante la inhibición de la actividad transcripcional JunD/AP-1. PTEN contrarresta este efecto a través de la fosfatidilinositol 3-cinasa, que a su vez inhiben tanto las actividades de Akt y JNK. La expresión de EGFR se correlaciona altamente con la expresión de TF en muestras humanas de astrocitoma de grado alto (Rong *et.al.*, 2009).

En la gráfica 15, se observa que la proteína EGFR sí se encuentra incrementada en todas las muestras aunque estas no dupliquen el valor registrado para GADPH, sin embargo estas diferencias de expresión nos permiten analizar las posibles consecuencias que puedan tener al tratarse de una molécula implicada en diversos procesos que se encuentran involucrados tanto en el metabolismo normal de una célula como en diferentes patologías como el cáncer para poder determinar el papel que juega en ambos casos.

La amplificación de EGFR lleva a la activación de las cinasas río abajo, incluyendo (PI3K), Akt y rapamicina (mTOR). La fosforilación de la proteína mTOR y su sustrato rpS6 río abajo son marcadores biológicos para el efecto antiproliferativo de los inhibidores de EGFR. La inhibición de la señalización de EGFR está correlacionado con disminución de la expresión de la proteína mTOR fosforilada (p-mTOR) y rpS6 (p-rpS6) en las células que expresan PTEN silvestre, el cual es un regulador negativo de PI3K. En contraste, la inhibición de la señalización de EGFR no afecta p-mTOR o p-rpS6 en las células mutantes de PTEN, que son resistentes a los inhibidores de EGFR (Rong Y, *et.al.*, 2005). Existe una vía de Akt-independiente que une a EGFR y mTOR, que dependía principalmente de la proteína cinasa C (PKC). De acuerdo con estas observaciones, el incremento de EGFR, se encuentra relacionado con la fosforilación de rpS6 y PKC en los tumores primarios de glioblastoma, y mientras que la correlación con la fosforilación de Akt es baja. La inhibición de PKC lleva a la disminución de la viabilidad de las células de glioma, independientemente de PTEN o el estado del EGFR (Fan *et.al.*, 2009).

La mTOR cinasa es un blanco de la señalización de EGFR, que se relaciona con el aumento del EGF y la proliferación celular. Los resultados iniciales con los inhibidores de EGFR en glioblastoma no han sido totalmente satisfactorios, debido a que la mayoría de los pacientes no responden. Sólo los pacientes con amplificación EGFR activado y PTEN de tipo silvestre muestran las respuestas de corta duración a los

inhibidores de EGFR. La actividad de Akt muestra una baja correlación con los efectos antiproliferativos de los inhibidores de EGFR, por lo que sugieren a PKC que es un intermedio importante en la señalización entre el EGFR y mTOR como una diana terapéutica en los glioblastomas multiformes (Fa, 2006).

Se ha visto que la amplificación del EGFR es menos frecuente en glioblastomas pediátricos (10%) que en adultos (35%) (Sure, *et.al.*, 1997). Esto evidencia que existen diferencias en el patrón de alteraciones genéticas entre adultos y niños. En adultos rara vez se encuentran p53 alterado y sobre-expresión de EGFR, mientras que en niños es más frecuente lo cual sugiere distintas vías de génesis para este tipo de tumores en niños y adultos (Goike *et.al.*, 1999). Se han analizado los reordenamientos en la región 3' del gen del EGFR encontrando un fragmento aberrante de 4 kb que indicaba un reordenamiento del gen amplificado en la región que codifica para las bases 2801-3832. La secuenciación de este producto mostró una pérdida de 325 bases debida a la introducción de un codón de paro entre las bases 3464-3466. Este receptor carece de las cinco tirosinas que se autofosforilan y que son necesarias para finalizar la señalización proteica. Hunter y col (1995) estudiaron 43 gliomas reportando que la amplificación del gen EGFR y MDM2 se limitaba a las muestras de alto grado dándose con una frecuencia del 40% y 10%, respectivamente. A pesar de los datos presentados aún se sigue considerando esta alteración como la más frecuente en astrocitomas, hallándola con una frecuencia del 45% de los casos (Sugawa *et.al.*, 1998), por lo que se ha sugerido que el EGFR aberrante afecta a la malignidad del glioma debido a su capacidad de estimular la proliferación celular y de inhibir la apoptosis (Biernat *et.al.*, 1998).

En las gráficas 12 y 16 resulta más fácil identificar los cambios en los patrones de expresión del mRNA y de las proteínas, respectivamente, de cada una de las moléculas estudiadas y nos permite correlacionar algunas diferencias de expresión con los grados tumorales, ya que a pesar de que la expresión de Akt1, CD133 y EGFR fue muy diversa, es fácil identificar que las muestras (1, 4, 10 y 12) cuyo diagnóstico es de astrocitomas de alto grado presentan similitudes entre ellas y diferencias en comparación con las muestras restantes (bajo grado) y el cultivo primario de cerebro sano.

Los resultados anteriormente expuestos demuestran la importancia de las moléculas elegidas en este estudio en los tumores astrocíticos pediátricos por lo que se requiere profundizar más el estudio analizando moléculas que se encuentren directamente ligadas en las diferentes vías de señalización. No obstante es imperativo continuar con el análisis de posibles marcadores que permitan identificar a los pacientes que presenten mayor riesgo, incrementando el número de muestras y los centros de colecta.

9. CONCLUSIONES

- El género más afectado fue el masculino con un 57.14%, mientras que el género femenino aportó el 42.85%.
- Se reporta una frecuencia mayor para los tumores astrocíticos pediátricos de bajo grado (71.42%), el (28.57%) restante corresponde a los tumores de alto grado.
- En niños menores a 5 años predominan los tumores de bajo grado, mientras que en los mayores a esta edad la proporción de tumores de alto y bajo grado es igual.
- Se reporta incremento en la expresión del transcrito Akt1 en 12 muestras y en las líneas celulares T98 y U87, con respecto al tejido sano.
- Se observó sobre-expresión de Akt1 en una proporción mayor a 2 en comparación con HPRT en 8 muestra y en las líneas celulares U87 y T98.
- Los datos de la electroinmunotransferencia indican la sobre-expresión o la acumulación de la proteína Akt1 en 13 muestras y en las líneas celulares T98 y U87.
- La expresión relativa de CD133 fue menor en todos los tumores, la muestra de cerebro sano y en las líneas celulares T98, U87 con respecto a HPRT.
- Los tumores 1, 4, 10, 12 que corresponden a alto grado y las líneas T98 y U87 muestran un ligero incremento de la expresión relativa de CD133 en comparación con las otras muestras.
- Se reporta disminución de la expresión del gen CD133 en 9 muestras considerando como valor normal la expresión del mismo gen en el tejido sano.
- Los resultados de los WB indican la expresión normal de la proteína CD133 en las muestras 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 9 y 11. Mientras que las muestras 1, 10, 13 presentan un ligero incremento de expresión.
- Se reporta incremento en la expresión de EGFR a nivel de mRNA, sin embargo, ésta no fue significativa.
- La expresión de la proteína EGFR de los pacientes 1, 4, 10 y 12 es mayor en comparación con las muestras restantes.
- No se observan diferencias significativas entre la expresión de EGFR y GADPH.
- Los resultados obtenidos tanto a nivel de proteínas como de mRNA permiten observar diferencias entre los tumores de alto grado y bajo grado.
- Existe correlación entre el grado tumoral y la expresión de AKT1, CD133 y EGFR, la expresión de estas moléculas incrementa conforme al grado tumoral.

10. GLOSARIO

Hipertensión intracraneal: Incremento en la presión hidrostática del interior de la cavidad craneal, en particular en el líquido cefalorraquídeo, debido a la suma de presiones que ejercen los elementos intracraneales.

Satelitosis: Condición que se caracteriza por la acumulación de células de la microglia alrededor de las neuronas del sistema nervioso central dañadas, a menudo seguida por neuronofagia.

Neuronofagia: Fenómeno observado en la mayoría de las lesiones agudas del sistema nervioso; consiste en la penetración de las células nerviosas por células neuróglícas jóvenes. Se tiende a considerar a este proceso como una manifestación de la fagocitosis.

Pleomorfo: variación en cuanto a forma durante el ciclo celular y, por tanto, no se adquiere una única forma característica.

Cefalea ipsilateral: Afección que puede ser constante o pulsátil, hemicránea, en general severo y fluctuante, se percibe en el mismo lado del cuerpo donde se encuentra el sitio afectado.

Alteraciones hemianestésicas: Transformaciones o pérdida de la sensibilidad únicamente de una porción del cuerpo.

Hemiparesia: Es un grado menor que la hemiplejía o hemiparálisis. Consiste en disminución de la fuerza muscular con debilidad de las extremidades. Parálisis ligera o incompleta de la mitad del cuerpo.

Monoparesia: Parálisis ligera, pérdida parcial de la función motora de una extremidad.

Isquemia cerebral: Alteración celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno, de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo del cerebro. Este evento puede ser suficientemente intenso como para causar la muerte celular.

Hipercelularidad: Aumento patológico o anormal del número de células en un tejido. El incremento de las células maduras puede ser de una o más líneas celulares.

Citoplasma eosinófilico: organelo celular que se tiñe con eosina, al ser este un colorante ácido de color rosado oscuro con polaridad negativa le permite enlazarse con constituyentes celulares de carga positiva.

Xantomización citoplásmica: Infiltración colesterólica en el citoplasma de una afección cutánea tumoral, degenerativa o infecciosa.

Hipercromasia: estado de hipercromasia del núcleo, donde hay una abundancia de DNA que se tiñe de oscuro. El estado hipercromático del núcleo sugiere malignidad.

Fibrillas gliales Rosenthal: Densa trama de fibras gliales que asemejan proyecciones celulares o vellosidades.

Pérdida de heterocigocidad: Pérdida de un alelo en un locus específico, ocasionada por una mutación por delección, o pérdida de un cromosoma de un par, produciendo hemicigocidad anormal.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alessi D.R., Andjelkovic M., Caudwell F.B., Cron P., Morrice N., Cohen P., Hemmings B.A. Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J.* 15:6541-6551(1996).
- Annabi B, Laflamme C, Sina A, Lachambre MP, Béliveau R. A MT1-MMP/NF-kappaB signaling axis as a checkpoint controller of COX-2 expression in CD133+ U87 glioblastoma cells. *J Neuroinflammation.* Mar 9;6:8(2009).
- Ardebili SY, Zajc I, Gole B, Campos B, Herold-Mende C, Drmota S, Lah TT. CD133/prominin1 is prognostic for GBM patient's survival, but inversely correlated with cysteine cathepsins' expression in glioblastoma derived spheroids. *Radiology and Oncology.* 45(2):102-15. DOI: 10.2478/v10019-011-0015-6. (2011).
- Arcaro A., Zvebil M.J., Wallasch C., Ullrich A., Waterfield M.D., Domin J. Class II phosphoinositide 3-kinases are downstream targets of activated polypeptide growth factor receptors. *Mol. Cell. Biol.* 20:3817-3830(2000).
- 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).
- Bao S, Wu Q, McLendon RE, Hao Y, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature.* 7;444(7120):756-60 (2006).
- Beroukhi R, Getz G, Nghiemphu L, Barretina J, Hsueh T, Linhart D, Vivanco I, Lee JC, Huang JH, Alexander S, Du J, Kau T, Thomas RK, Shah K, Soto H, Perner S, Prensner J, DeBiasi RM, Demichelis F, Hatton C, Rubin MA, Garraway LA, Nelson SF, Liao L, Mischel PS, Cloughesy TF, Meyerson M, Golub TA, Lander ES, Mellinghoff IK, Sellers WR. Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:20007–20012 (2007).
- Biernat W, Debiec-Rychter M, Liberski P. Mutations of TP53, amplification of EGFR, MDM2 and CDK4, and deletions of CDKN2A in malignant astrocytomas. *Pol J Pathol;* 49: 267-271(1998).
- Bing-Hua Jiang and Ling-Zhi Liu. PI3K/PTEN Signaling in Angiogenesis and Tumorigenesis. *Adv Cancer Reserch.*; 102: 19–65. DOI:10.1016/S0065-230X(09)02002-8. (2009).
- Brunet, A., Bonni, A., Zigmond, M. J., Lin, M. Z., Juo, P., Hu, L. S., Anderson, M. J., Arden, K. C., Blenis, J., Greenberg, M. E. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell* 96: 857-868 (1999).
- Carpten J.D., Faber A.L., Horn C., Donoho G.P., Briggs S.L., Robbins C.M., Hostetter G., Boguslawski S., Moses T.Y., Savage S., Uhlik M., Lin A., Du J., Qian Y.-W., Zeckner D.J., Tucker-Kellogg G., Touchman J., Patel K. Thomas J.E. A transforming mutation in the pleckstrin homology domain of AKT1 in cancer. *Nature* 448:439-444 (2007).
- Casano Jovaní, C, Cañete Nieto A., Bermúdez Cortés M., Verdaguer Miralles A., Fernández Navarro J.M., Ferris Tortajada, Castel V. Tumores de sistema nervioso central en niños menores de 3 años. *Anales Españoles de Pediatría.* Vol. 49 N° 2 (1998).

- Chien PS, Mak OT, Huang HJ. Induction of COX-2 protein expression by vanadate in A549 human lung carcinoma cell line through EGF receptor and p38 MAPK-mediated pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 339:562–8(2006).
- Chin YR, Toker A. Function of Akt/PKB signaling to cell motility, invasion and the tumor stroma in cancer. *Cell Signal.*;21(4):470-6. 7(2009).
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* Apr;162(1):156-9(1987).
- 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* 73:404-415(1994).
- Esteller M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature Reviews Genet.* Apr;8(4):286-98 (2007).
- Dong SM, Pang JC, Poon WS, Hu J, To KF, Chang AR, Ng HK. Concurrent hypermethylation of multiple genes is associated with grade of oligodendroglial tumors. *J Neuropathol Exp Neurol.*60(8):808-16(2001).
- Du K., Montminy M. CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J. Biol. Chem.* 273:32377-32379 (1998).
- Faily, M; Korur, S; Egler, V, Boulay, J-L; Lino, M. Roland Imber, and Adrian Merlo. Combination of sublethal concentrations of epidermal growth factor receptor inhibitor and microtubule stabilizer induces apoptosis of glioblastoma cells. *Mol Cancer Ther* Vol: 6(2). (2007).
- Fajardo-Gutiérrez, Arturo, Juárez-Ocaña Servando, González-Miranda Guadalupe, Palma-Padilla Virginia, Carreón-Cruz Rogelio, Mejía-Aranguré Juan Manuel Incidencia general y específica de cáncer en niños derechohabientes del IMSS. *Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social*; 45 (6): 579-592 (2007).
- Fan QW, Cheng C, Knight ZA, Haas-Kogan D, Stokoe D, James CD, McCormick F, Shokat KM, Weiss WA. EGFR signals to mTOR through PKC and independently of Akt in glioma. *Sci Signal.* Jan 27;2(55):ra4(2009).
- Fan QW, Knight ZA, Goldenberg DD, Yu W, Mostov KE, Stokoe D, Shokat KM, Weiss WA. A dual PI3 kinase/mTOR inhibitor reveals emergent efficacy in glioma. *Cancer Cell.* 9:341–349(2006).
- Fangusaro J. Pediatric high-grade gliomas and diffuse intrinsic pontine gliomas. *Journal Child Neurology.* Nov;24(11):1409-17. DOI: 10.1177/0883073809338960. Epub Jul 28. (2009).
- Fargeas C.A., Huttner W.B., Corbeil D. Nomenclature of prominin-1 (CD133) splice variants - an update. *Tissue Antigens* 69:602-606 (2007).
- Ferbeyre, B. L., Salinas, G. *J Bases genéticas y moleculares del cáncer / 1a. parte.* Gamo Vol. 4 Núm. 2, (2005).
- Fisher PG, Tihan T, Goldthwaite PT, et al. Outcome analysis of childhood low-grade astrocytomas. *Pediatric Blood Cancer*;51(2):245–250 (2008).

- Fonnet E, Bleeker, Remco J. Molenaar, Sieger Leenstra: Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma *Journal of Neuro-oncology*. PMID: PMC3337398. 108(1): 11–27 January 20. doi: 10.1007/s11060-011-0793-0 (2012).
- Fonnet E., Lamba, S; Zanon, C; Tilborg, A, Leenstra, S; Troost, D; Hulsebos, T, W. Vandertop, P; Bardelli, A Absence of AKT1 Mutations in Glioblastoma. *PlosoneVol4* (2009)
- Franco H C., Martínez V., Rey J.A. Biología molecular de los glioblastomas. *Neurocirugía (Astur)* ;18 (5):373-82 (2007).
- Franke, T. F., Yang, S.-I., Chan, T. O., Datta, K., Kaziauskas, A., Morrison, D. K., Kaplan, D. R., Tschlis, P. N. The protein kinase encoded by the Akt proto-oncogene is a target of the PDGF-activated phosphatidylinositol 3-kinase. *Cell* 81: 727-736 (1995).
- Franke TF, Hornik CP, Segev L, Shostak GA, Sugimoto C. PI3K/Akt and apoptosis: size matters. *Oncogene*. 8;22(56):8983-98 (2003).
- Furnari FB, Huang HJ, Cavenee WK. Molecular biology of malignant degeneration of astrocytoma. *Cancer Research* . *Pediatr Neurosurg*. 24(1):41-9 (1996).
- Garcia J, Caro, M P- Gomez-Moreta J , Gonzalez, F, Ortiz, J, Blanco, O, Sancho, M, Hernandez-Rivas J, Gonzalez-Sarmiento, R, Sanchez, M. Molecular analysis of ex-vivo CD133+ GBM cells revealed a common invasive and angiogenic profile but different proliferative signatures among high grade gliomas. *Biomedcentral*. *Cancer* 1471-2407/10/454 (2010).
- Gilles FH, Sobel EL, Tavaré CJ, Leviton A, Hedley-White ET. Age-related changes in diagnosis, histological features, and survival in children with brain tumors. *Neurosurgery*. 37(6):1056-68. (1995).
- Giunti L, Cetica V, Ricci U, Giglio S, Sardi I, Paglierani M, Andreucci E, Sanzo M, Forni M, Buccoliero AM, Genitori L, Genuardi M. Type A microsatellite instability in pediatric gliomas as an indicator of Turcot syndrome. *European Journal of Human Genetics*. 17(7):919-27. DOI: 10.1038/ejhg.2008.271 (2009).
- Goike Hm, Asplund Ac, Pettersson Eh, Sanoudou D, Collinsvp. Acquired rearrangement of an amplified epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in a human glioblastoma xenograft. *J Neuropathol Exp Neurol*; 58: 697-701 (1999).
- Greenhough A, Smartt HJ, Moore AE, et al. The COX-2/PGE2 pathway: key roles in the hallmarks of cancer and adaptation to the tumour microenvironment. *Carcinogenesis*.;30:377–86(2009).
- Grovas A, Fremgem A, Rauck A. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. *Cancer* 80:2321-2332. (1997).
- Gur G., Rubin C., Katz M., Amit I., Citri A., Nilsson J., Amariglio N., Henriksson R., Rechavi G., Hedman H., Wides R., Yarden Y. LRIG1 restricts growth factor signaling by enhancing receptor ubiquitylation and degradation. *EMBO J*. 23:3270-3281(2004)
- Gurney JG, Wall DA, Jukich PJ, Davis FG. The contribution of nonmalignant tumors to CNS tumor incidence rates among children in USA. *Cancer Causes Control*. 10(2):101-5 (1999).
- Habib A.A., Chatterjee S., Park S.-K., Ratan R.R., Lefebvre S., Vartanian T. The epidermal growth factor receptor engages receptor interacting protein and nuclear factor-kappa B (NF-kappa B)-inducing kinase to activate NF-kappa B. Identification of a novel receptor-tyrosine kinase signalosome. *J. Biol. Chem*. 276:8865-8874_(2001).

- Harun M, Hagemann C, Stojic J, Roosen K, Vordermark D. GADPH is not regulated in human glioblastoma under hypoxic conditions. *BMC Molecular Biology*8:55(2007).
- Heron-Milhavet L., Khouya N., Fernandez A., Lamb N.J. Akt1 and Akt2: differentiating the aktion. *Histol. Histopathol.* 26:651-662 (2011).
- Heuch JM, Akslen LA, Kvåle G. Risk of primary childhood brain tumors related to birth characteristics: A Norwegian prospective study. *Cancer* 77:498-503(1998).
- Huang Fangtian, Goh Lai Kuan, and Sorkin Alexander. EGF receptor ubiquitination is not necessary for its internalization 16904–16909 _ *PNAS* Vol. 104 _ no. 43 (2007).
- Hu Zhu, Xinyu Cao, Francis Ali-Osman, Stephen Keir, Hui-Wen Lo. EGFR and EGFRvIII interact with PUMA to inhibit mitochondrial translocation of PUMA and PUMA-mediated apoptosis independent of EGFR kinase activity. *Cancer Letters* Vol 294, Issue 1:101-110, 1 (2010).
- Hu, M. C.-T., Lee, D.-F., Xia, W., Golfman, L. S., Ou-Yang, F., Yang, J.-Y., Zou, Y., Bao, S., Hanada, N., Saso, H., Kobayashi, R., Hung, M.-C. I-kappa-B kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell* 117: 225-237 (2004).
- Hui-Wen Lo, Xinyu Cao, Hu Zhu, Francis Ali-Osman COX-2 is a Novel Transcriptional Target of the Nuclear EGFR-STAT3 and EGFRvIII-STAT3 Signaling Axes. *Molecular Cancer Research* 8(2): 232–245. NIHMSID: NIHMS165056 doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0391(2010).
- Hunter Sb, Abbott K, Varma Va, Olson Jj, Barnett Dw, James Cd. J. Reliability of differential PCR for the detection of EGFR and MDM2 gene amplification in DNA extracted from FFPE glioma tissue. *J Neuropathol Exp Neurol*; 54: 57-64 (1995).
- Jang S.W., Yang S.J., Srinivasan S., Ye K. Akt phosphorylates Mstl and prevents its proteolytic activation, blocking FOXO3 phosphorylation and nuclear translocation. *J. Biol. Chem.* 282:30836-30844 (2007).
- Jiang BH, Liu LZ. PI3K/PTEN signaling in angiogenesis and tumorigenesis. *Adv Cancer Res.* 102:19-65(2009).
- Johrmann GJ, Farewell JR, Flannery JT: Astrocytomas in childhood: A potential-based study. *Surg Neurol*;23:64-68. (1985).
- Jones, P. F., Jakubowicz, T., Pitossi, F. J., Maurer, F., Hemmings, B. A. Molecular cloning and identification of a serine/threonine protein kinase of the second-messenger subfamily. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 88: 4171-4175 (1991).
- Jura N., Endres N.F., Engel K., Deindl S., Das R., Lamers M.H., Wemmer D.E., Zhang X., Kuriyan J. Mechanism for activation of the EGF receptor catalytic domain by the juxtamembrane segment. *Cell* 137:1293-1307(2009).
- Jura Natalia, Zhang Xuewu, Endres Nicholas F., Seeliger, Schindler Thomas , Kuriyan John Markus A. Catalytic Control in the EGF Receptor and Its Connection to General Kinase Regulatory Mechanisms *Molecular Cell*, Volume 42, Issue 1, 9-22, 8 .10.1016/j.molcel.2011.03.004 (2011).
- Kane LP, Mollenauer MN, Xu Z, Turck CW, Weiss A. Akt-dependent phosphorylation specifically regulates Cot induction of NF-kappa B-dependent transcription. *Molecular and Cellular Biology.* 22(16):5962-74 (2002).

- Kario E, Marmor MD, Adamsky K, Citri A, Amit I, Amariglio N, Rechavi G, Yarden Y Suppressors of cytokine signaling 4 and 5 regulate epidermal growth factor receptor signaling. *Journal Biological Chemistry*. 25;280(8):7038-48 (2005).
- Kim A.H., Khursigara G., Sun X., Franke T.F., Chao M.V. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol. Cell. Biol.* 21:893-901_(2001).
- Kleihues P, Burger PC and Scheithauer BW. The new WHO classification of brain tumors. *Brain Pathol*; 3:255-268.(1993).
- Klein C, Gensburger C, Freyermuth S, Nair BC, Labourdette G, Malviya AN. A 120 kDa nuclear phospholipase Cgamma1 protein fragment is stimulated in vivo by EGF signal phosphorylating nuclear membrane EGFR. *Biochemistry*. 43:15873–83(2004).
- Koschny R, Koschny T, Froster UG, Krupp W, Zuber MA. Comparative genomic hybridization in glioma: a meta-analysis of 509 cases. *Cancer Genetic Cytogenetic*; 135(2):147-59 (2002).
- Laack NM, Brown PD, Ivnik RJ, Furth AF, Ballman KV, Hammack JE, Arusell RM. Buckner JC. Cognitive function after radiotherapy for supratentorial low-grade glioma. *Int J Radial. Oncol Biol Phys*. 15:63(4): 1175-83. (2005).
- Lara Jiménez P C; Navarro Bosch Dy Sáez Bravo M. *Genética de Cáncer*. Biocáncer 1, Centro de Ciencias de la Salud, Instituto Canario de Investigación del Cáncer. (2004).
- Lee, M.-J., Thangada, S., Paik, J.-H., Sapkota, G. P., Ancellin, N., Chae, S.-S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W. C., Alessi, D. R., Hla, T. Akt-mediated phosphorylation of the G protein-coupled receptor EDG-1 is required for endothelial cell chemotaxis. *Molec. Cell* 8: 693-704 (2001).
- Lehnus KS, Donovan LK, Huang X, Zhao N, Warr TJ, Pilkington GJ, An Q. CD133 glycosylation is enhanced by hypoxia in cultured glioma stem cells. *International Journal of Oncology*. DOI: 10.3892/ijo.2013.1787 (2013).
- Li Hui-Fang, Kim Jung, Waldman T. Radiation-induced Akt activation modulates radioresistance in human glioblastoma cells. *Radiation Oncology* 4:43 DOI:10.1186/1748-717X-4-43 (2009).
- Li Y., Ren J., Yu W., Li Q., Kuwahara H., Yin L., Carraway K.L. III, Kufe D. The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *J. Biol. Chem.* 276:35239-35242 (2001).
- Liao HJ, Carpenter G. Role of the Sec61 translocon in EGF receptor trafficking to the nucleus and gene expression. *Mol Biol Cell*. 18:1064–72(2007).
- Lin SY, Makino K, Xia W, et al. Nuclear localization of EGF receptor and its potential new role as a transcription factor. *Nat Cell Biol*. 3:802–8(2001).
- Lo HW, Ali-Seyed M, Wu Y, Bartholomeusz G, Hsu SC, Hung MC. Nuclear-cytoplasmic transport of EGFR involves receptor endocytosis, importin beta1 and CRM1. *J Cell Biochem*. 98:1570–83(2006)
- Lo HW, Hung MC. Nuclear EGFR signalling network in cancers: linking EGFR pathway to cell cycle progression, nitric oxide pathway and patient survival. *Br J Cancer*; 94:184–8(2006).
- Lu C., Mi L.Z., Grey M.J., Zhu J., Graef E., Yokoyama S., Springer T.A. Structural evidence for loose linkage between ligand binding and kinase activation in the epidermal growth factor receptor. *Mol. Cell. Biol.* 30:5432-5443 (2010).

- Luque, Jorge, Herráez, Angel. *Biología Molecular e Ingeniería Genética (Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud)*. ELSEVIER. ISBN:978-84-8174-505-4. Barcelona 2008.p 412-420.
- Maher Elizabeth A., Furnari Frank B. , Bachoo Robert M. , Rowitch David H. , Louis David N. , Cavenee Webster K. , DePinho Ronald A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. DOI: 10.1101/gad.891601 *Genes & Development*. 15: 1311-1333 (2001).
- Maw M.A., Corbeil D., Koch J., Hellwig A., Wilson-Wheeler J.C., Bridges R.J., Kumaramanickavel G., John S., Nancarrow D., Roeper K., Weigmann A., Huttner W.B., Denton M.J. A frameshift mutation in prominin (mouse)-like 1 causes human retinal degeneration. *Hum. Mol. Genet*. 9:27-34(2000).
- Márquez-Rivas, Javier, Gema Ramirez, Angela Ollero-Ortiz, Jorge Giménez-Pando, Juan Emmerich, Eduardo Quiroga-Cantero, Eloy Rivas, y Emilio Gómez-González. Initial Experience Involving Treatment and Retreatment With Carmustine Wafers in Combination With Oral Temozolomide: Long-term Survival in a Child With Relapsed Glioblastoma Multiforme. *Journal of the American Society of Pediatric Hematology/Oncology* DOI:10.1097/MPH.0b013e3181e0d16b (2010).
- Mizrak D, Brittan M, Alison M. CD133: molecule of the moment. *The Journal of Pathology*;214(1):3-9 (2008).
- Monsalve J, Kapur J, Malkin D, Babyn PS. Imaging of cancer predisposition syndromes in children. *Radiographics*.31 (1):263-80. DOI: 10.1148/rg.311105099 (2011).
- Muñoz J, Fan X, Inda MM. Genética molecular de los astrocitomas. *ANALES Sis San Navarra* 23:265-278 (2000).
- Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7727–31(1994).
- Ogiso H., Ishitani R., Nureki O., Fukai S., Yamanaka M., Kim J.H., Saito K., Sakamoto A., Inoue M., Shirouzu M., Yokoyama S.. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. *Cell* 110:775-787(2002).
- Ohgaki H, Dessen P, Jourde B, Horstmann S, Nishikawa T, Di Patre PL, Burkhard C, Schuler D, Probst-Hensch NM, Maiorka PC, Baeza N, Pisani P, Yonekawa Y, Yasargil MG, Lutoff UM, Kleihues P Genetic pathways to glioblastoma: a population- based study. *Cancer Research* 64:6892–6899 (2004).
- Ozer BH, Wiepz GJ, Bertics PJ. Activity and cellular localization of an oncogenic glioblastoma multiforme-associated EGF receptor mutant possessing a duplicated kinase domain. *Oncogene*. 11;29(6):855-64(2010).
- Perdomo S, Moreta J, Rodríguez CA, González R. Reyes OF. Bases genéticas del desarrollo y progresión tumoral de los gliomas.Gliomas del encéfalo. Universidad de Santiago de Compostela. Fundación Pedro Barrie de la Maza. Gliomas del Encéfalo, Cap II: 37-68 (2007).
- Perez, .L, Galarraga, I.J; Gómez, S.H. Tumores Astrocíticos Malignos Apuentes Histopatológicos. Instituto de Neurología y Neurocirugía. *Rev. Cubana Oncología*; 17(3):180-7(2001).
- Pollack IF, Cluassen D, Shboul Q, Janosky JE. Low grade gliomas of cerebral hemispheres in children. *Neurosurgery*. 82(4):536-47. (1995).

- Rath BH, Fair JM, Jamal M, Camphausen K, Tofilon PJ. Astrocytes enhance the invasion potential of glioblastoma stem-like cells. *PLoS One.*;8(1):e54752. doi: 10.1371/journal.pone.0054752 (2013).
- Rebetz J, Tian D, Persson A, Widegren B, Salford LG, Englund E, Gisselsson D, Fan X. Glial progenitor-like phenotype in low-grade glioma and enhanced CD133-expression and neuronal lineage differentiation potential in high-grade glioma. *PLoS One.* Apr 9;3(4):e1936(2008).
- Renan MJ: How many mutations are required for Tumorigenesis. Implications for human cancer data. *Mol Carcinog* 7:139-146 (1993).
- Rong Y, Post DE, Pieper RO, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. PTEN and hypoxia regulate tissue factor expression and plasma coagulation by glioblastoma. *Cancer Res* 65:1406–13(2005).
- Rong, V Belozzerov, C Tucker-Burden, Gang Chen, L. Durden, J. Olson, G. Van Meir , D J. Brat Epidermal Growth Factor Receptor and PTEN Modulate Tissue Factor Expression in Glioblastoma through JunD/Activator Protein-1 Transcriptional Activity *Cancer Res* 69; 2540 (2009).
- Rosemberg S, Fujiwara D. Epidemiology of pediatric tumors of the nervous system according to the WHO 2000 classification: a report of 1,195 cases from a single institution. *Childs Nerv Syst.* 21(11):940-4. (2005).
- Sarasin A. An overview of the mechanisms of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res.* 544(2-3):99-106 (2003).
- Sarbassov D.D., Guertin D.A., Ali S.M., Sabatini D.M .Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science* 307:1098-1101 (2005).
- Schwartzbaum, Xiao, Yanhong Liu⁵, Tsavachidis S, S.BergerM, Bondy M L., Jeffrey S.Chang, Susan M.Chang⁶, Decker P, Bo Ding, Hepworth S.J, Houlston R, J.Hosking, B.Jenkins, L.Kosel⁸, S.McCoy, A.McKinney, K Muir, Prados M, B.Robertson, J.Schoemaker, Shete S, J.Swerdlow, Wiemels J. L, Wiencke, Ping Yang, Wrensch M. Inherited variation in immune genes and pathways and glioblastoma risk. *Carcinogenesis* vol.31 no.10 pp.1770–1777. (2010).
- Sehgal A. Molecular changes during the genesis of human gliomas. *Semin. Surg. Oncol.* 14:3-12, Wiley-Liss, Inc (1998).
- Serra A, Torres Gómez de Cádiz Silva A, Alonso L. Gliomas en pediatría. Análisis anatomopatológico de 233 casos. *Revista Ecuatoriana Neurología.* Vol18, 1-2 (2009).
- Shono T, Tofilon PJ, Bruner JM, Owolabi O, Lang FF. Cyclooxygenase-2 expression in human gliomas: prognostic significance and molecular correlations. *Cancer Research*; 61(11):4375-81. PubMed; PMID: 11389063 (2001).
- Sievert Angela J, MPH Fisher Michael J .Pediatric low-grade gliomas. *Journal Child Neurology* Nov;24(11):1397-408. DOI: 10.1177/0883073809342005 (2009).
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., Dirks, P. B. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 63: 5821-5828 (2003).
- Singh, S. K., Hawkins, C., Clarke, I. D., Squire, J. A., Bayani, J., Hide, T., Henkelman, R. M., Cusimano, M. D., Dirks, P. B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 432: 396-401 (2004).

- Stratton M. Mechanisms of activation and inactivation of dominant oncogenes and tumour suppressor genes, capítulo 2, pp16-26. Molecular Biology for Oncologists. 2ª edición. Editado por Yarnold JR, Stratton M y McMillan TJ. Chapman and Hall, (1996).
- Sugawa N, Ekstrand AJ, James CD, Collins VP. Identical splicing of aberrant epidermal growth factor receptor transcripts from amplified rearranged genes in human glioblastomas. Proc Natl Acad Sci U S A.;87:8602–6(1990).
- Sugawa N, Yamamoto k, Ueda S, Morita N, Kita M, Nishino H, Fushiki S, Oakabe T. Function of aberrant EGFR in malignant gliomas. Brain Tumor Pathol; 15: 53-57 (1998).
- Surawicz TS, McCarthy BJ, Kupelian V, Jukich PJ, Bruner JM. Descriptive epidemiology of primary brain and CNS tumors. Neuro-oncology: 14-25. DOI: 10.1093/neuonc/1.1.14 (1999).
- Sure U, Ruedi D, Tachibana O, Yonekawa Y, Ohgaki H, Kleihues P, Hegi Me. Determination of p53 mutations, EGFR overexpression, and loss of p16 expression in pediatric glioblastomas. J Neuropathol Exp Neurol; 56: 782-789 (1997).
- Takenobu H., Shimozato O., Nakamura T., Ochiai H., Yamaguchi Y., Ohira M., Nakagawara A., Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. Oncogene 30:97-105 (2011).
- Tan, P-H; Bay, B-H; Yip, G; Selvarajan, S; Tan P; Wu, W; Lee, C-H; Li, K-B. Immunohistochemical detection of Ki-67 in breast cancer correlates with transcriptional of genes related to apoptosis and cell death. Modern Pathology 18,374-381(2005).
- Taquechel, C.O; Corral, P.N, Verdecia, J.M; Legra, R.R; Perez, A.P; Tumores del sistema nervioso central en la infancia. MEDISAN 2003; 7(4) (2009).
- Tarcic G., Boguslavsky S.K., Wakim J., Kiuchi T., Liu A., Reinitz F., Nathanson D., Takahashi T., Mischel P.S., Ng T., Yarden Y. An unbiased screen identifies DEP-1 tumor suppressor as a phosphatase controlling EGFR endocytosis." Curr. Biol. 19:1788-1798 (2009).
- Tehrani M, Friedman TM, Olson JJ, Brat DJ. Intravascular thrombosis in central nervous system malignancies: a potential role in astrocytoma progression to glioblastoma. Brain Pathol. 18:164–71(2008).
- Torrente, Y., Belicchi, M., Sampaolesi, M., Pisati, F., Meregalli, M., D'Antona, G., Tonlorenzi, R., Porretti, L., Gavina, M., Mamchaoui, K., Pellegrino, M. A., Furling, D., Mouly, V., Butler-Browne, G. S., Bottinelli, R., Cossu, G., Bresolin, N. Human circulating AC133(+) stem cells restore dystrophin expression and ameliorate function in dystrophic skeletal muscle. J. Clin. Invest. 114: 182-195 (2004).
- Tsukamoto H, Boado, R., Pardrige, M.W. Differential Expression in Glioblastoma Multiforme and Cerebral Hemangioblastoma of Cytoplasmatic Proteins that bind two different domains within the 3`-Untranslated Region of the Human glucose transporter 1(GLUT1).The American Society for Clinical Investigation. Vol 97.12:2827-2832(1996).
- Ueki K. CDKN2/p16 or Rb alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. Cancer Res. 56:150-153 (1996).

- Van der Valk P, Lindeman J, Kamphorst W. Growth factors profiles of human gliomas. Do non-tumor cells contribute to tumor growth in glioma? *Ann Oncology* 8(10):1023-9. PubMed; PMID: 9402177 (1997).
- Varlet P, Soni D, Miquel C, Roux FX, Meder JF, Chneiweiss H, Daumas-Duport C. New variants of malignant glioneuronal tumors. *Neurosurgery*:55(6): 1377-91. (2004).
- Vega Rodríguez AM, Rodríguez Vázquez MI, Wilkinson Brito B, Fernández Lorente A. Tumores astrocíticos: un acercamiento a una patología. *Revista Médica Electrónica* (2012).
- Villarejo, F. Tumores del Sistema Nervioso Central en Niños. Editorial Ergon (2007).
- Vivanco I, Palaskas N, Tran C. Identification of the JNK signaling pathway as a functional target of the tumor suppressor PTEN. *Cancer Cell*. 11:555–69(2007).
- Wang, S., Basson, M D. Identification of functional domains in AKT responsible for distinct roles of AKT isoforms in pressure-stimulated cancer cell adhesion. *Exp Cell Res*. 15; 314(2): 286–296 (2008).
- Wang Y.N., Wang H., Yamaguchi H., Lee H.J., Lee H.H., Hung M.C. COPI-mediated retrograde trafficking from the Golgi to the ER regulates EGFR nuclear transport. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 399:498-504(2010)
- Weksberg R; Nishikawa J; Caluseriu; Yan-Ling Fei; Shuman C; Wei C; Cameron J; Smith A.C; Ambus I; Madeline L; N. Ray P; Sadowski P; Squire. Tumor development in the Beckwith-Wiedemann syndrome is associated with a variety of constitutional molecular 11p15 alterations including imprinting defects of KCNQ1OT1. *J. Human Molecular Genetics* Vol 10 No. 26 2989-3000 (2001).
- Yachnis AT, Neuropathology of pediatric brain tumors. *Semin Pediatric Neurology* 4(4):282-91 (1997).
- Yang C, Sudderth J, Dang T, Bachoo RM, McDonald JG, DeBerardinis RJ. Glioblastoma cells require glutamate dehydrogenase to survive impairments of glucose metabolism or Akt signaling. *Cancer Res*. 15;69(20):7986-93(2009).
- Yang, Z., Chen, Y., Lillo, C., Chien, J., Yu, Z., Michaelides, M., Klein, M., Howes, K. A., Li, Y., Kaminoh, Y., Chen, H. Zhao, C., and 21 others. Mutant prominin 1 found in patients with macular degeneration disrupts photoreceptor disk morphogenesis in mice. *J. Clin. Invest*. 118: 2908-2916 (2008).
- Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer*. 37 4:S3–8(2001).
- Yong HJ, Bressler J, Beaudet A. Epigenetics and Human Disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 5:479-510. (2004).
- Zhang X., Pickin K.A., Bose R., Jura N., Cole P.A., Kuriyan J. Inhibition of the EGF receptor by binding of MIG6 to an activating kinase domain interface. *Nature* 450:741-744 (2007).
- Zhang, Q., Zulfikar, F., Xiao, X., Riazuddin, S. A., Ahmad, Z., Caruso, R., MacDonald, I., Sieving, P., Riazuddin, S., Hejtmancik, J. F. Severe retinitis pigmentosa mapped to 4p15 and associated with a novel mutation in the PROM1 gene. *Hum. Genet*. 122: 293-299 (2007).
- Zheng H, Ying H, Yan H, Kimmelman AC, Hiller DJ, Chen AJ, Perry SR, Tonon G, Chu GC, Ding Z, Stommel JM, Dunn KL, Wiedemeyer R, You MJ, Brennan C, Wang YA, Ligon KL, Wong WH, Chin L, DePinho RA p53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor renewal and differentiation. *Nature* 455:1129–1133 (2008).

11.1. REFERENCIAS DE INTERNET

Internet 1: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>

Internet 2: <http://www.incan.edu.mx/>

Internet 3: <http://www.cancer.gov/espanol>

Internet 4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>

Internet 5: <http://spdbv.vital-it.ch/>

Internet 6: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>