



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
CARRERA DE BIÓLOGO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ
UNIDAD DE INVESTIGACIÓN EN ENFERMEDADES ONCOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA MAPK P38 ACTIVO EN
MUESTRAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS CON LINFOMAS NO-
HODGKIN

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO
P R E S E N T A

ESTEBAN CARLOS RODRÍGUEZ CONTRERAS

DIRECTOR DE TESIS: DRA. SARA HUERTA YEPEZ
ASESOR INTERNO: M EN C. EDGAR LEDESMA MARTÍNEZ



MÉXICO D.F. 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El Presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas del Hospital Infantil de México, Federico Gómez, bajo la dirección de la Dra. Sara Huerta Yopez y el Dr. Mario I. Vega Paredes del Hospital de Oncología del CMN sXXI. IMSS

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación local del Hospital Infantil de México Federico Gómez con el número de proyecto (HIM/2010/040). Este proyecto recibió financiamiento por parte de la fundación TERRY FOX.

AGRADECIMIENTOS

La presente Tesis es un esfuerzo en el cual, directa o indirectamente, participaron varias personas leyendo, opinando, corrigiendo, teniéndome paciencia, dando ánimo, acompañando en los momentos de crisis y en los momentos de felicidad.

Agradezco a la Dra. Sara Huerta Yopez por brindarme la valiosa oportunidad de formar parte de su grupo de trabajo, por haber confiado en mi persona, por su paciencia y por la dirección de este trabajo.

A mi valiosa amiga y tutora Karla Méndez Maldonado por los consejos, el apoyo, tiempo y dedicación que me brindó. A mi maestro y gran amigo Marco Antonio Hernández Luna, cuya tutela, lecciones y apoyo fueron de suma importancia para mí.

Gracias también a mis queridos amigos, que me apoyaron y me permitieron entrar en su vida durante este tiempo, Belén, Erandi, Gabriela, Norma, Daniel, Efrén, Enrique, Ignacio, Jesús y Ricardo.

A mi madre y a mi hermano que me acompañaron en esta aventura y que, de forma incondicional me apoyaron, entendieron mis ausencias y mis malos momentos en todo momento. A mi padre, que a pesar de la distancia siempre estuvo atento para saber cómo iba mi proceso. A ti Rocio, que desde un principio hasta el día hoy sigues dándome ánimo para terminar este proceso, por haber estado en los momentos difíciles y apoyarme cuando más lo necesitaba al darme palabras de aliento.

Gracias a todos.

ÍNDICE

1.	Resumen.....	1
2.	Introducción.....	3
2.1.1	Panorama epidemiológico.....	3
2.2	Clasificación.....	5
2.2.1	Linfoma linfoblástico.....	6
2.2.2	Linfoma de Burkitt.....	7
2.2.3	Linfomas de células grandes.....	8
2.3	Fisiopatología del Linfoma no Hodgkin.....	9
2.3.1	Proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPK).....	11
2.3.2	Estructura y función de MAPK p38.....	12
2.3.3	MAPK p38 y su relación con cáncer.....	13
3.	Planteamiento del problema.....	16
3.1.	Pregunta de investigación.....	16
4.	Hipótesis.....	17
5.	Objetivo general.....	17
5.1	Objetivo específico.....	17
6.	Materiales y métodos.....	18
7.	Resultados.....	24
8.	Discusión.....	37
9.	Conclusión.....	41
10.	Perspectivas.....	42
11.	Referencias.....	43

Abreviaturas.

ATF-2.	Factor de transcripción activador 2
BMP2.	Proteína morfogenética de hueso 2
BSA.	Albúmina sérica bovina
CeNSIA.	Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia
CMN.	Centro Médico Nacional
DAB.	Diaminobenzidina
EBV.	Virus de Epstein Barr
ERK.	Cinasa reguladora de señales extracelulares
H/E.	Hematoxilina eosina
IL-1.	Interleucina 1
IL-4.	Interleucina 4
IMSS.	Instituto Mexicano del Seguro Social
INF- α .	Interferón alfa
JNK.	Cinasa c-Jun N-terminal
LA.	Linfoma anaplásico
LACG.	Linfoma anaplásico de células grandes
LB.	Linfoma de Burkit
LCBD.	Linfoma de células B difuso
LCG.	Linfoma de células grandes
LG.	Leucemia granulocítica
LH.	Linfoma de Hodgkin
LL.	Linfoma linfoblástico

LLA.	Leucemia linfoblástica aguda
LMA.	Leucemia mieloide aguda
LNH.	Linfoma no Hodgkin
MAPK.	Proteínas cinasas activadas por mitógenos
OMS.	Organización Mundial de la Salud
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SNC.	Sistema Nervioso Central
TNF- α .	Factor de Necrosis Tumoral alfa
UMA.	Unidades Médicas Acreditadas
VIH	Virus de Inmunodeficiencia Humana

1. RESUMEN

Introducción: La primera causa de cáncer infantil a nivel mundial son las leucemias, seguidas de los tumores del sistema nervioso central y en tercer lugar se encuentran los linfomas. De estos últimos, el 60% corresponde a los linfomas no Hodgkin (LNH). Más del 95% de los LNH en pediatría son neoplasias de alto grado e incluyen principalmente cuatro variedades histológicas: el linfoma de Burkitt, el linfoma de células grandes, el linfoma linfoblástico y el linfoma anaplásico, esto acuerdo a la clasificación utilizada en el Hospital Infantil de México, Federico Gómez. La supervivencia de los pacientes con LNH es variable y depende del subtipo histológico y de la respuesta a la quimioterapia. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado que la activación de MAPK p38 juega un papel importante en el desarrollo de diversos tipos de cáncer, esto de acuerdo con el tipo de neoplasia y el estímulo que actúa sobre ésta. En el caso de los linfomas (tanto Hodgkin como no Hodgkin en adultos) se ha reportado que existe una sobreexpresión de la forma activa de la proteína MAPK p38 (p-p38) en líneas celulares, lo cual se relaciona con una disminución en la apoptosis y la sobrevida de los pacientes con esta enfermedad. En el caso del LNH en niños no existen reportes acerca de la expresión de MAPK p38.

Objetivo: Evaluar los niveles de expresión de MAPK p38 y su forma activa p-p38 en biopsias de pacientes pediátricos con LNH y correlacionarlos con los subtipos histológicos de LNH.

Materiales y Métodos. Se construyó un microarreglo de tejidos a partir biopsias de pacientes pediátricos con LNH, el cual se utilizó para determinar la expresión de MAPK p38 y p-p38 mediante ensayos de inmunohistoquímica y análisis morfométrico. Posteriormente se realizó la correlación de la expresión de las proteínas antes mencionadas con los subtipos de LNH mediante el empleo de patología digital y análisis estadísticos.

Resultados. Se observó una expresión diferencial de MAPK p38 y p38 fosforilado en los diferentes tejidos incluidos en el microarreglo, viéndose favorecida esta expresión para MAPK p38 comparada con su forma activa. La variedad histológica de LNH considerada de mejor pronóstico presentó la menor expresión de p38 y p38 fosforilada. A diferencia con el linfoma anaplásico que es considerado de peor pronóstico el cuál presentó una mayor expresión de ambas proteínas.

Conclusión. Se sugiere que MAPK p38 y p-p38 puede jugar un papel importante en la fisiopatogénesis del LNH pediátrico.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Panorama epidemiológico

Los linfomas de Hodgkin y no Hodgkin se encuentran dentro de las tres primeras neoplasias malignas infantiles más comunes a nivel mundial. El linfoma no Hodgkin (LNH) representa aproximadamente 7% de los cánceres en niños y jóvenes menores de 20 años [1]. En los Estados Unidos, se diagnostican unos 800 casos nuevos de LNH cada año. La incidencia es de aproximadamente diez casos por cada millón de habitantes. A pesar de que no hay una edad específica de mayor ocurrencia, el LNH se presenta con mayor frecuencia en la segunda década de vida y no es muy común en niños menores de 3 años [2]. La Organización Mundial de la Salud (OMS) en 2008, indicó que para la población infantil en las regiones de Europa, Norte América, y otras regiones desarrolladas, las tasas de incidencia están alrededor de 140 por millón de habitantes. En países en vías de desarrollo la población infantil comprende entre el 40 y 50% de la población total, de estos la proporción de niños con cáncer sería del 3 al 10%, mientras que en países desarrollados sería menos del 1 % de la población total [3].

A nivel mundial, se estiman aproximadamente unos 160,000 casos nuevos, y 90,000 muertes en menores de 15 años de edad cada año. En los niños, los tumores más frecuentes son las leucemias, los linfomas y los tumores del sistema nervioso central (SNC), la frecuencia varía según el país, y el grupo de edad [4].

En México en las Unidades Médicas Acreditadas (UMA), del 2007 al 2008, se observó que los cánceres más frecuentes en la población infantil fueron las leucemias, seguidas por los linfomas, tumores SNC y los sarcomas de partes blandas. Dentro de las leucemias el diagnóstico más frecuente es la leucemia linfoblástica aguda (LLA), le sigue la leucemia mieloide aguda (LMA) y la leucemia granulocítica (LG); de los linfomas, el más frecuente es el linfoma de Hodgkin, en segundo lugar el linfoma no Hodgkin; respecto a los tumores de SNC el más frecuente es el astrocitoma, el meduloblastoma, el glioma, el ependimoma y el tumor neuroectodérmico primitivo; de los sarcomas de partes blandas el más frecuente es el rabdomiosarcoma (Tabla I).

Tabla I. Principales tipos de cáncer diagnosticados en la Unidades Médicas Acreditadas (UMA) Secretaría de Salud, para la atención de niños y adolescentes con cáncer en 2007 y 2008.

Diagnóstico		2007		2008	
		Casos	Porcentaje	Casos	Porcentaje
Leucemias	<i>Linfoblástica aguda</i>	921	45.66	962	43.16
	<i>Mieloide aguda</i>	128	6.35	156	7
	<i>Granulocítica crónica</i>	7	0.35	4	0.18
Linfomas	<i>Hodgkin</i>	104	5.16	106	4.76
	<i>No Hodgkin</i>	103	5.11	100	4.49
Tumores del Sistema Nervioso Central	<i>Astrocitoma</i>	100	4.96	71	3.19
	<i>Meduloblastoma</i>	46	2.28	65	2.92
	<i>Glioma</i>	13	0.64	30	1.35
	<i>Tumor neuroectodérmico primitivo</i>	12	0.59	6	0.27
	<i>Ependimoma</i>	10	0.50	15	0.67
	<i>Meningioma</i>	2	0.10	0	0.0
	<i>Schwannoma</i>	2	0.10	0	0.0
	<i>Craneofaringioma</i>	1	0.05	4	0.18
	<i>Otros</i>	2	0.10	7	0.31
	Sarcomas de Tejidos Blandos	<i>Rabdomiosarcoma</i>	73	3.62	80
<i>No Rabdomiosarcoma</i>		35	1.74	30	1.35

Fuente: Base de datos de cáncer 2007-2008. Dirección de Prevención y Tratamiento del Cáncer en la Infancia y la Adolescencia-CeNSIA. Información brindada por los Hematólogos y Oncólogos pediatras de las UMA pertenecientes a la Secretaría de Salud de 31 entidades federativas. Clasificación de casos basada en la Internacional Classification of Childhood Cancer (ICCC).

*Histiocitosis: Se incluye debido a que fueron reportadas por los hospitales (no específica entre benignas y malignas)

2.2 Clasificación

El linfoma no Hodgkin está categorizado como de bajo, intermedio, o alto grado con base en su agresividad clínica. El tumor de bajo e intermedio grado predomina en adultos, sin embargo más de 90% de los niños con linfoma no Hodgkin tienen un tumor de alto grado [2].

A lo largo del tiempo ha habido al menos 7 clasificaciones patológicas para el LNH. En 1994 se publicó la clasificación Europeo-Americana de neoplasias linfoides, que fue adoptada por la OMS para neoplasias de tejidos hematopoyético y linfoide. Esta clasificación incluye a todos los linfomas y leucemias hasta ahora reconocidos y distingue tres categorías principales: células B, células T/NK y enfermedad de Hodgkin. Los LNH están incluidos dentro de las dos primeras categorías [4]. A pesar de que esta clasificación aportó nuevas entidades, no hubo modificaciones importantes para la mayor parte de los LNH que se presentan en niños y que incluyen tres tipos histológicos: linfoma linfoblástico (de precursores de células T y precursores de células B), linfoma de Burkitt (de células B periféricas y tipo Burkitt, linfoma de células B de alto grado), y linfomas de células grandes, incluyendo en este último los linfomas de células B difusos (LACG) (de células B periféricas), los linfomas anaplásicos de células grandes (ALCL) (de células T periféricas/nulos), los linfomas anaplásicos de células grandes y los tipo Hodgkin (de células T periféricas) [5]. Existen diferencias en epidemiología, histopatología, tratamiento y pronóstico entre los distintos subtipos [6]. En el Hospital Infantil de México, Federico Gómez, los oncólogos pediatras clasifican a los pacientes con LNH con base a los criterios de la OMS, considerando cuatro

diferentes subtipos histológicos: Linfoma de Burkitt, linfoma linfoblástico, linfoma de células grandes y el linfoma anaplásico.

2.2.1 Linfoma linfoblástico

Antes denominado linfosarcoma de la infancia, sarcoma de Sternberg o linfoma de linfocitos T hendidos, es uno de los linfomas no Hodgkin más frecuentes en los niños. El linfoma linfoblástico es el responsable de aproximadamente 30% de los linfomas en niños. Este linfoma es más común en los adolescentes y la frecuencia en los niños es el doble que en las niñas [7]. Las células cancerosas de este linfoma son linfoblastos. Si más del 25% de la médula ósea está afectada, la enfermedad se clasifica y trata como ALL. La mayoría de los linfomas linfoblásticos son de células T y se denomina linfoma linfoblástico de células T precursoras [8]. La mayoría de las veces se localiza en la parte anterior del mediastino y en menor frecuencia en los ganglios linfáticos periféricos, la piel, el anillo linfático de Waldeyer, las gónadas, la glándula mamaria, el sistema nervioso central y el hígado. Algunas veces este tipo de cáncer se origina en las amígdalas y en los ganglios linfáticos del cuello. Tiende a propagarse muy rápidamente a la médula ósea, otros ganglios linfáticos, la superficie del cerebro y/o las membranas que rodean a los pulmones y al corazón [6].

En mucho menor proporción se presentan los linfomas linfoblásticos de células B, los cuales inician con mayor frecuencia en los ganglios linfáticos fuera del tórax, particularmente en el cuello, también pueden afectar la piel y los huesos. Debido a que el linfoma linfoblástico puede ser una enfermedad de crecimiento muy rápido

frecuentemente obstaculiza el sistema respiratorio. Por lo que se requiere un rápido diagnóstico y tratamiento [7].

2.2.2 Linfoma de Burkitt

El linfoma de Burkitt es el responsable de aproximadamente 40% al 50% de los casos de linfoma no Hodgkin infantil en los Estados Unidos. Existen dos tipos de linfoma de Burkitt: a) tipo Burkitt (en honor al médico que primero describió este linfoma en los niños de África). b) tipo no Burkitt. Sin embargo, los niños con reciben el mismo tratamiento independiente mente del tipo. Es más común en hombres, con una proporción de 3:1 en las edades de 8 a 10 años [7]. Sus manifestaciones clínicas varían según el sitio anatómico de presentación y su distribución geográfica. Al momento del diagnóstico la mayoría de los pacientes se encuentran en estadios clínicos avanzados (III y IV), en los cuales si el tratamiento no ha sido oportuno los tumores son más agresivos y mortales [6]. En algunas partes de África, el linfoma de Burkitt es el responsable de casi todos los casos de linfoma no Hodgkin infantil y de más de la mitad de todos los cánceres infantiles. Por razones desconocidas, los niños africanos generalmente desarrollan este linfoma en la mandíbula o en otros huesos faciales. En otras partes del mundo, incluyendo a los Estados Unidos, el linfoma no Hodgkin tipo Burkitt se origina casi siempre en el abdomen, esto puede causar dolor, náusea y vómito. Algunas veces, este linfoma también puede originarse en el cuello o en las amígdalas y pocas veces en otras partes del cuerpo. Este linfoma se origina de los linfocitos B y es uno de los cánceres que crece con mayor rapidez. Se puede

propagar a otros órganos, incluyendo la superficie del cerebro o dentro de este, debido a esto tiene que ser diagnosticado y tratado rápidamente [7].

2.2.3 Linfomas de células grandes

Estos linfomas se originan de formas más maduras de células T o B casi en cualquier parte del cuerpo. No es común que se propague a la médula ósea ni al cerebro, no es de crecimiento rápido como otros linfomas en niños. Hay dos subtipos principales de linfoma de células grandes: a) Linfoma anaplásico de células grandes. Este tipo de linfoma representa alrededor del 10% de todos los linfomas no Hodgkin en niños. Por lo general, se origina de células T maduras, puede iniciar en los ganglios linfáticos del cuello o en otras áreas, y se puede encontrar en la piel, los pulmones, los huesos u otros órganos. b) Linfoma difuso de células B grandes. Este linfoma representa alrededor del 15% de los linfomas en niños. Se origina en las células B, como lo implica el nombre [7]. Los linfomas no Hodgkin de células grandes difusos, ocupan el tercer lugar en frecuencia en los pacientes pediátricos, no tienen preferencia por edad o sexo, pueden ser inicialmente ganglionares o extra ganglionares y su localización es variada [6]. Estos linfomas frecuentemente crecen como masas grandes en el mediastino (el espacio entre los pulmones) y en estos casos se les llama linfomas primarios mediastínicos de células B. Algunas veces también se encuentran en el tejido linfático del cuello, del abdomen o en los huesos.

El tratamiento es el mismo para los diferentes tipos de linfomas de células grandes, aunque la tasa de curación tiende a ser un poco más baja para el tipo anaplásico [7].

2.3 Fisiopatología del Linfoma no Hodgkin

Los LNH se originan en el sistema linfático y habitualmente se diseminan por todo el organismo. Se caracteriza por la proliferación clonal de precursores linfoides inmaduros que pierden la capacidad de diferenciarse y presentan al igual que las leucemias, alteraciones cromosómicas características que sirven como apoyo diagnóstico. En un sentido literal, todas las neoplasias linforreticulares sólidas, diferentes de los LH se consideran LNH y morfológicamente estos tumores están formados total o casi totalmente por células neoplásicas. Los LNH representan un grupo muy heterogéneo de proliferaciones malignas que responden a diferentes mecanismos fisiopatológicos y en gran parte a esto se deben las numerosas clasificaciones que existen [9]. Algunos de estos linfomas son de desarrollo lento, mientras que otros se diseminan rápidamente. Las causas por las que los niños desarrollan cáncer no está claramente definida, salvo para algunas condiciones como la exposición a niveles altos de radiación. Las infecciones en algunos casos son la única explicación probable para el desarrollo de cáncer, como el virus de Epstein Barr (EB) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) ambos implicados en el desarrollo de varios tipos de cáncer, dentro de ellos el LNH [2].

En algunos casos de los diferentes subtipos de LNH, presentan alteraciones histológicas, inmunológicas y genéticas que los caracterizan en la Tabla II se resumen algunas de estas características [7].

Tabla II. Características de las tres categorías mayores de LNH en la infancia

<i>Histología</i>	<i>Genética</i>	<i>Biología molecular</i>
Linfoma de célula B (Burkitt, no-Burkitt y LCG-B)	t (8-14) (q24; q32)	IgH/c-myc
	t (2; 8) (p11; q24)	Ig kappa/c-myc
	t (8; 22) (q24; q11)	Ig lambda/c-myc
Linfoma linfoblástico	t (1; 14) t (7; 10)	TCR/Tal-1
	t (8; 14) t (7; 11)	TCR/RHOMB2
	t (10; 14) t (7; 19)	TCR/LCK
	t (11; 14)	
	t (12; 14)	
Linfoma de células grandes anaplásicas (Ki-1+)	t (2; 5) (p12; q35)	NPM/ALK

**LCG-B: linfoma de células grandes B*

Tomado de Pineda [7]

2.3.1. Proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK)

Algunas de las moléculas más importantes implicadas en el desarrollo del cáncer son las MAPK (ERK, JNK y MAPK p38), por lo que se han convertido en blanco de investigación relacionándolas con esta y otras enfermedades humanas [10].

Las proteínas cinasas activadas por mitógeno (MAPK) son una familia de serina-treonina cinasas que deciden el destino de procesos celulares tan importantes como el crecimiento celular, proliferación, diferenciación y muerte en respuesta a diversos estímulos [8]. Los miembros de la familia MAPK, los mitógenos y factores de crecimiento frecuentemente activan la ruta ERK1/2, mientras que el estrés y los procesos inflamatorios constituyen los principales desencadenantes de la cascada de JNK y p38, algunas veces referidas como “proteínas cinasas activadas por estrés”. Por tanto, median respuestas a choques osmóticos, citocinas inflamatorias y otras agresiones frecuentemente asociadas con decisiones de supervivencia y apoptosis [11].

Las cascadas de señalización de las MAPK se organizan en módulos individuales, que se inician por estímulos extracelulares a través de distintos receptores. La activación de una MAPK se consigue a través de una cascada de señalización la cual inicia en la membrana celular, que posteriormente activan a la MAP3K y posteriormente a la MAPK2. Esto se traduce en una fosforilación dual de las MAPK en un dominio de tres aminoácidos conservado, Thr-X-Tyr, y en un incremento en la actividad catalítica de la MAPK. Las MAPK fosforilan residuos de Ser/Thr seguidos por una prolina de sustratos nucleares y citosólicos que incluyen importantes factores de transcripción y diferentes proteínas efectoras. Esta activación impacta directamente en el programa genético celular o el control de

decisiones de proliferación como es el caso del módulo ERK, sobre la apoptosis o la diferenciación, así como en las rutas de JNK y p38 y sobre otras funciones citosólicas que incluyen migración celular, hipertrofia, transducción sensorial, respuestas metabólicas entre otras [12].

2.3.2. Estructura y función de p38 MAPK

La familia p38 (también conocida como SAPK2) está compuesta por 4 isoformas, que son similares en tamaño (262-364 aminoácidos) poseen entre un 60-75% de homología entre ellos [13]. Las isoformas MAPK p38- α (SAPK2A) y MAPK p38- β (SAPK2B) son los componentes mayoritarios y se expresan en todos los tejidos de una forma ubicua en el caso de los modelos murinos [14], [15]. La isoforma MAPK p38- γ (SAPK3/ERK6) de expresión preferente en músculo y por último, la isoforma MAPK p38- δ (SAPK4) se expresa mayoritariamente en pulmón y riñón [16], [17]. En el caso de la especie humana, aunque el patrón de expresión de las diferentes isoformas varía dependiendo del tejido en el que se encuentren, la expresión de las isoformas α , β son ubicuas mientras que la expresión de la isoforma γ se presenta en músculo esquelético, corazón, pulmón, timo y testículo. Por último la expresión de la isoforma δ se expresa en pulmón, páncreas, intestino delgado, riñón, testículo y epidermis [18], [19].

Todas las isoformas son activadas en respuesta a estímulos de estrés extracelulares, como son el factor de necrosis tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), radiación UV y choque osmótico. La proteína p38 es activada por MAPKK, que incluyen MKK3, MKK6 y JNKK1 que fosforilan con especificidad dual los motivos TGY (residuos de treonina 180 y tirosina 182). Las moléculas efectoras de

la familia p38 incluyen factores de transcripción (ATF-2, Elk-1, CHOP/Gadd15), Max, MEF2C) y enzimas (MAPKAP cinasa). La ruta MAP3K de p38 puede incluir Tak1, Ask1, y MLK. La ruta p38 juega un papel importante en apoptosis. Se ha demostrado que muchas señales apoptóticas estimulan la actividad de p38 y que esta activación se correlaciona con la inducción de apoptosis en varios tipos celulares [11], [20].

La isoforma p38 α es la más caracterizada y se expresa en la mayoría de los tipos celulares. MAPK p38 regula la expresión de muchas citocinas y tiene un papel importante en la activación de la respuesta inmune. MAPK p38 se activa por muchos otros estímulos, incluidas citocinas, hormonas, ligandos para receptores acoplados a proteínas G y participa en procesos de choque osmótico y choque térmico. La MAPK p38 es clave en la regulación de la expresión de citocinas inflamatorias y parece estar involucrado en enfermedades humanas como el asma y autoinmunidad [21].

2.3.3. MAPK p38 y su relación con cáncer

Estudios recientes muestran que la activación de MAPK p38 es necesaria para la muerte de las células cancerosas iniciada por diversos agentes anti-tumorales. Por ejemplo, los retinoides como el ácido 13-cisretinoico o los transretinicos, inician la apoptosis en líneas celulares de meduloblastoma mediante la fosforilación de MAPK p38 a través de la inducción de la proteína morfogenética de hueso 2 (BMP2). La activación de MAPK p38 en diversas líneas celulares tumorales se presenta después del tratamiento con cisplatino y la doxorubicina (un agente intercalante del ADN), ambos fármacos quimioterapéuticos [22], [23].

Por otro lado, el incremento de MAPK p38 es responsable de la quimioresistencia en células de cáncer gástrico [24]. Se sabe que MAPK p38 juega un papel importante en la resistencia a 5-fluorouracilo en células de cáncer de colon [25]. El anticuerpo monoclonal humanizado llamado Rituximab, el cual es empleado como tratamiento de linfoma en adultos con muy buenos resultados, inhibe la actividad de MAPK p38 en la línea celular de LNH 2F7, lo cual induce una disminución de la transcripción de IL-10 [26]. También se sabe que la inhibición de la vía MAPK p38 induce la apoptosis e impide la reactivación del virus de Epstein Barr en la línea celular de LNH Raji tratada con compuestos inductores del ciclo lítico [27]. Por otro lado se ha reportado que p38 y MAPK p-p38 se encuentran sobreexpresadas en líneas celulares de linfoma comparadas con linfocitos de sangre periférica. Además, se sabe que IL-4 aumenta los niveles de expresión de diferentes isoformas de p38 en líneas celulares derivadas de linfoma difuso de células B. En el mismo estudio demostraron la sobreexpresión de p-p38 en biopsias de pacientes adultos con LNH de células B, analizadas mediante inmunohistoquímica [28]. Así mismo, se ha demostrado que MAPK p38 induce una gran variedad de efectos biológicos en cultivo de células en respuesta a una amplia gama de estímulos. Estos efectos dependen no sólo de los estímulos, sino también del contexto celular, resultando en una desconcertante variedad de posibilidades, tal como se ha reportado, MAPK p38 induce apoptosis en algunas células, pero evita la apoptosis en otras [29].

Dado que la mayoría de los estudios acerca de la participación de p38 y p38 fosforilado (p-p38) se basan sólo en estudios en modelos *in vitro* es importante evaluar estos resultados en muestras de pacientes (*in situ*). Además, los hallazgos

de expresión de estas proteínas se ha evaluado sólo en LNH en adultos y considerando que la fisiopatogénesis del LNH es diferente en adulto que en niños, consideramos muy importante evaluar la expresión de p38 y su forma activa p-p38 en tejido obtenido de biopsias de pacientes pediátricos con LNH.

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El LNH se encuentra dentro de las primeras tres neoplasias malignas pediátricas en México y en el mundo. Se sabe que la desregulación de la vía MAPK se encuentra involucrada en numerosos tipos cáncer humano. Además, se ha demostrado que MAPK p38 juega un papel importante en el desarrollo de diversos tipos de cáncer así como en la sobrevivencia de las líneas celulares de LNH. Por lo anterior es razonable pensar que la vía de señalización MAPK p38 puede tener una expresión diferencial en los diferentes subtipos histológicos de pacientes pediátricos con LNH, lo cual sugeriría que participa en la fisiopatogénesis de esta enfermedad.

3.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cómo se encuentra la expresión de la proteína MAPK p38 y p-p38 en los diferentes subtipos histológicos de LNH?

4. HIPÓTESIS

La presencia elevada de la proteína MAPK p38 y su forma activa fosforilada se asociaría de manera directa con los tipos histológicos de peor pronóstico de LNH en pacientes pediátricos.

5. OBJETIVO GENERAL

Evaluar los niveles de expresión de MAPK p38 y p38 fosforilado en un microarreglo de tejido de pacientes pediátricos con LNH y su asociación con los diferentes subtipos histológicos.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la expresión de MAPK p38 y p-p38 en líneas celulares de LNH
- Analizar la expresión de MAPK p38 y p-p38 en tejidos de biopsias de pacientes pediátricos con LNH
- Construir un microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes pediátricos con LNH
- Analizar la expresión de MAPK p38 y p-p38 en el microarreglo de tejidos de biopsias de pacientes pediátricos con LNH
- Evaluar los niveles de expresión de MAPK p38 y p-p38 en el microarreglo de tejidos mediante el empleo de patología digital. Así como su asociación con los diferentes subtipos histológicos de LNH

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Lugar donde se desarrolló el proyecto. El estudio se realizó en el Hospital Infantil de México, Federico Gómez, en la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

6.2 Criterios de inclusión. Se incluyó toda aquella biopsia incluida en parafina que para el diagnóstico haya sido enviada al Departamento de Anatomía Patológica y provenga de pacientes pediátricos con LNH que se sometieron a un tratamiento estándar en el periodo del 2000 al 2008, que acudieron al Servicio de Oncología, menores de 18 años y de ambos sexos. Todas aquellas biopsias de pacientes con diagnóstico conocido de LNH de cualquier tipo histológico no clasificado con inmunohistoquímica y que se encuentre sin respuesta al manejo establecido, con progresión de la enfermedad o en recaída de la misma. Que no tengan enfermedad terminal (insuficiencia renal crónica, etc.) ni infección severa (sepsis, encefalitis, etc.).

6.2.1 Criterios de exclusión. Se excluyeron todas aquellas biopsias de pacientes pediátricos con LNH que hayan presentado complicaciones renales independientes de la enfermedad linfomatosa. Que no hallan tolerado el tratamiento de acuerdo a la toxicidad grado IV y V, o que presentaron reacciones alérgicas a cualquiera de los medicamentos incluidos en el esquema de

tratamiento. Así como biopsias de pacientes con infecciones severas o cardiopatía isquémica.

6.2.2 Cultivo celular. 2F7 es una línea celular de linfoma CD20 positivo. Fue aislada a partir de una biopsia del ganglio linfático de un paciente con SIDA (actualmente no disponible en el ATCC). La línea celular Raji fue establecida por R.J.V Pulvertaft en 1963 de un linfoma de Burkitt del maxilar superior izquierdo de un niño de raza negra de 11 años de edad. Es EBV positiva (actualmente disponible en el ATCC). Estas líneas fueron proporcionadas por el Dr. Mario I Vega (Unidad de Investigación Médica en Oncología, CMN SXXI, IMSS México). Las células fueron cultivadas en RPMI 1640 Advanced (Gibco®) suplementado con un 10% de suero fetal bovino, inactivado por calor (Mediatech, Cellgro. Va, Ak.). Todas las células fueron cultivadas en 5% de CO₂ a 37°C.

6.3 Anticuerpos. Los anticuerpos utilizados fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA. USA) para p38 se usó el anticuerpo policlonal p38 α/β (sc-7149) a una concentración 0.4 $\mu\text{g/ml}$. Mientras que para p-p38 se utilizó el anticuerpo monoclonal p-p38 (D-8): sc-7973 a una concentración 0.26 $\mu\text{g/ml}$ ambos anticuerpos se diluyeron en suero fetal bovino al 2%

6.4 Tinción de hematoxilina-eosina (H/E). En los portaobjetos con grenetina bacteriológica se montaron los cortes del tejido para la tinción de rutina H/E. Las laminillas se desparafinaron en un horno a 60° C e hidrataron sumergiéndolas en xilol 3 veces por 8 min, etanol absoluto 2 veces, etanol 90%, etanol 70% y agua

destilada por 5 min. Posteriormente, el tejido se tiñó con Hematoxilina de Harris, se retiró el exceso con Alcohol-HCl al 0.5%, se enjuagó con agua corriente y el color viró con agua amoniacal al 0.5%. Se enjuagó con agua corriente y posteriormente se retiró el exceso de agua con etanol 50%. Después el tejido fue contrateñido con eosina, finalmente deshidratado en alcohol a concentraciones crecientes y xileno e inmediatamente cubiertos con resina sintética. Las muestras se analizaron mediante microscopia de luz convencional.

6.5 Microarreglo de tejidos. Una de las herramientas de análisis global recientemente utilizada para la validación de la expresión, tanto de ácidos nucleicos como de proteínas, de manera *in situ*, son los arreglos de tejido. Éstos, permiten validar posibles marcadores tumorales en forma masiva, debido a que se puede analizar un gran número de muestras clínicas bajo las mismas condiciones experimentales de manera paralela, lo que representa un gran ahorro de tiempo y recursos.

Para la construcción del arreglo de tejidos se procedió de la siguiente manera. De cada bloque de parafina con tejidos diferentes se hicieron cortes de 5 μm para la tinción de hematoxilina y eosina con el fin de identificar la región de interés. Es decir, una región que contuviera exactamente la lesión que se pretendía analizar. Posteriormente, se procedió a la construcción del arreglo utilizando el CHEMICON's Advanced Tissue Arrayer (ATA 100 Chemicon). Brevemente: Mediante una aguja calibre 0.5 mm se extrajeron cilindros de parafina de 3 mm de altura de un bloque de parafina de 2.5 X 2.5 cm “en blanco”, delimitándose una

matriz de 5 x 5 elementos. Una vez elaborada la matriz, se utilizó una aguja de calibre 0.4 mm para obtener cilindros de tejido de cada una de las muestras de tejido montadas en parafina (bloque donador), se tomó como guía el corte teñido con hematoxilina y eosina. Cada uno de estos cilindros que contenía el tejido, se implantaron en el bloque en blanco que ya había sido previamente perforado (bloque receptor) y una vez completada la matriz de 360 tejidos (cada tejido por triplicado), se impregnó una pequeña cantidad de parafina líquida sobre el arreglo para igualar la altura de los cilindros. Posteriormente, el arreglo se calentó en un horno a 60° C por 15 minutos para homogeneizar la parafina de los cilindros inyectados con la del bloque en blanco y evitar que quedasen huecos entre los cilindros de las muestras y el bloque receptor, los cuales pudieran causar problemas al momento de cortarlos. Finalmente el arreglo se enfrió durante 5 minutos en hielo y se obtuvieron cortes de 5 µm con un microtomo rotatorio.

6.6 Inmunohistoquímica. Se realizaron cortes del bloque del microarreglo en un micrótopo entre 3-5 µ de grosor. Se realizaron en secciones seriadas del microarreglo de tejido, embebido en parafina, se montaron en laminillas especiales con pegamento (Instrumedics, Inc). Las secciones del tejido fueron desparafinadas en un horno de calentamiento a 62°C por 35 min, posteriormente el tejido se hidrato sumergiéndolo en xilol 3 veces por 8 min, etanol absoluto 2 veces, etanol 90%, etanol 70% y agua destilada por 5 min para posteriormente realizar la recuperación de antígeno utilizando citrato de sodio (0.01 M pH 6.0) en baño maría a ebullición por 25 min, se eliminó la actividad de la peroxidasa endógena

con metanol y peróxido de hidrógeno (3% por 25 min). Se bloqueó con Albúmina Sérica Bovina (BSA) al 1% en PBS por 60-180 min y las secciones se incubaron toda la noche a temperatura ambiente con los anticuerpos a una dilución de 1:1000 en PBS-BSA. Después se lavaron las secciones de tejido. Se incubaron con el segundo anticuerpo y después la Streptavidina-peroxidasa, luego se revelaron con Diaminobenzidina (DAB) (2-7 min) se detuvo la reacción con agua de la llave y se contratiñó con hematoxilina, posteriormente se deshidrató con agua destilada, etanol 70%, etanol 90%, etanol absoluto (2 veces) y xilol 5 minutos (3 veces) en cada uno el tejido se preservó con un medio de montaje. Se secó a temperatura ambiente.

6.7 Análisis de las muestras. Las laminillas fueron analizadas en un equipo de Patología Digital Aperio (Vista, C.A USA). Modelo ScanScope CS con capacidad de análisis de 5 laminillas cada 30 minutos y con objetivo de inmersión.

6.8 Procesamiento de los datos. Se elaboró una base de datos y la información se procesó utilizando el programa Prisma para Windows versión. 5.03. Se llevó a cabo la estadística descriptiva de los datos generales de los pacientes. Los datos se presentan mediante medias aritméticas y desviación estándar. Cuando los coeficientes de variación fueron mayores al 20% se presentaron las medianas y los cuartiles. Se utilizaron pruebas paramétricas para establecer si existían diferencias de la proporción de células. Una p menor o igual a 0.05 fue considerada como significativa.

6.9 Aspectos éticos y de bioseguridad. El proyecto implica la manipulación de tejido humano. Se siguieron normas de buenas prácticas de laboratorio para evitar riesgos ocupacionales. Los desechos fueron depositados en contenedores rojos. El estudio está apegado a las normas del reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación de México, así como a las normas de investigación del Hospital Infantil de México, Federico Gómez y se mantuvo la confidencialidad de los datos aportados por el expediente clínico del paciente y de acuerdo a la norma de Helsinsky en el ámbito internacional para materia de investigación.

7. RESULTADOS

7.1 Expresión de p38 y p-p38 en líneas celulares

Con el propósito de estandarizar los anticuerpos utilizados para las inmunotinciones, se procedió a realizar laminillas de las diferentes líneas celulares (2F7 y Raji) posteriormente mediante la técnica de inmunocitoquímica se evaluó la expresión de p38 y p-p38 empleando anticuerpos específicos para ambas proteínas a una concentración de 0.4 µg/ml (dilución 1:750) y se reveló con DAB. En la figura 1 se muestra una expresión clara de la proteína p38 (b) a nivel citoplásmico y p-p38 (d) tanto en citoplasma como en núcleo en la línea celular 2F7, la cual se observa en coloración café. El control de isotipo no mostró tinción (a y c) lo cual denota especificidad de la tinción. De la misma manera en la figura 2, se muestra una expresión clara de p38 (b) a nivel citoplásmico y p-p38 (d) tanto en citoplasma como en núcleo, en la línea celular Raji, aunque en menor cantidad si se compara con las líneas celulares 2F7. El control de isotipo no mostró tinción (a y c) lo cual denota especificidad de la tinción.

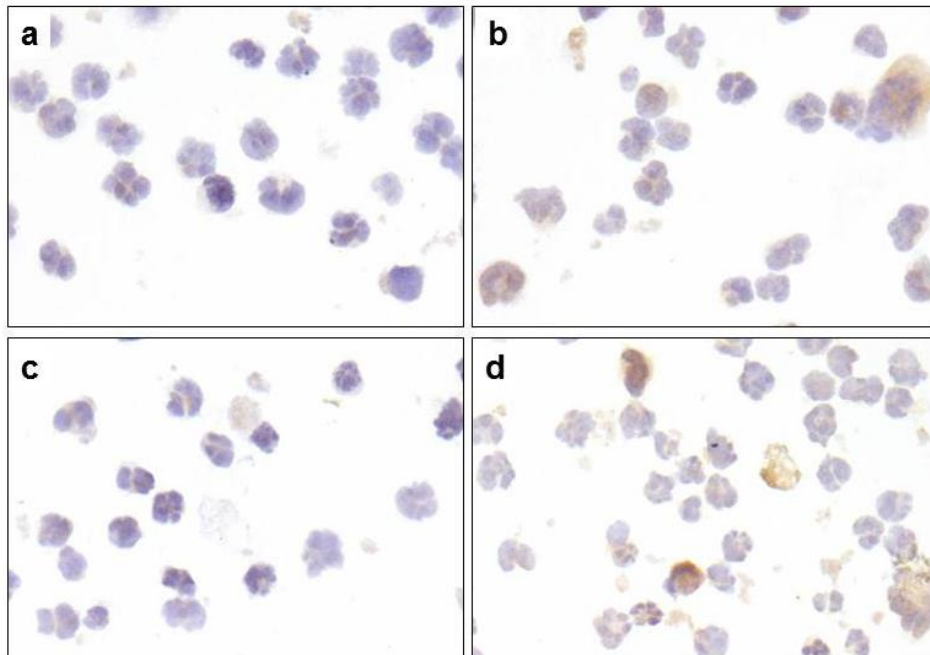


Figura 1. Microfotografía representativa de la expresión de p38 y p-p38 en la línea celular 2F7 mediante inmunocitoquímica. Se observa una clara expresión de p38 (b) a nivel citoplásmico y de p-p38 (d) predominantemente a nivel nuclear y baja expresión a nivel citoplásmico. El control de isotipo para ambas proteínas (a y c). Magnificación 40X

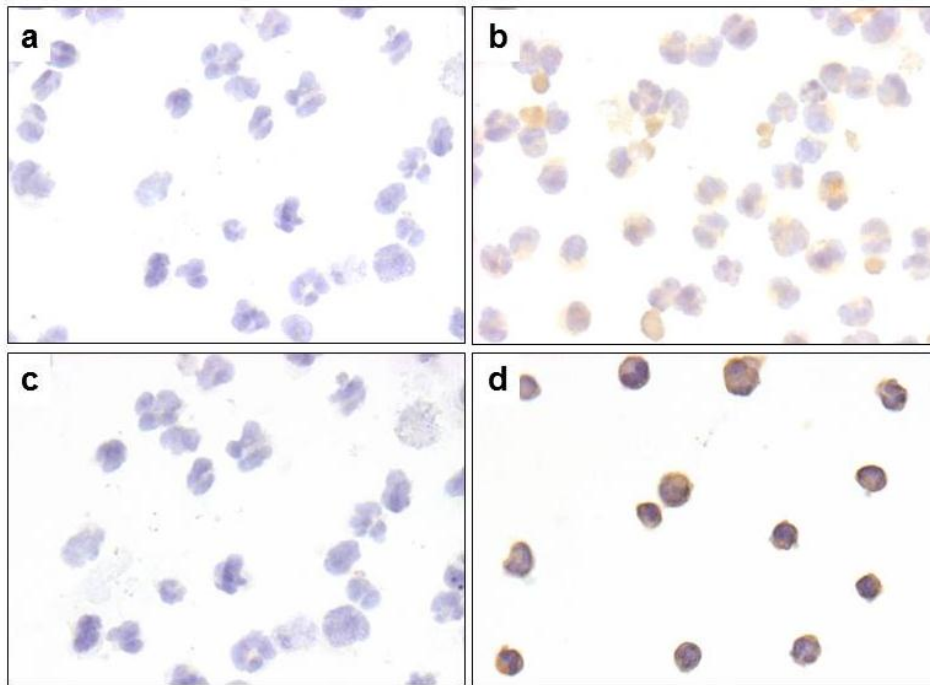


Figura 2. Microfotografía representativa de la expresión de p38 y p-p38 en la línea celular Raji mediante inmunocitoquímica. Se observa una clara expresión de p38 (b) a nivel citoplásmico y de p-p38 (d) predominantemente a nivel nuclear y baja expresión a nivel citoplásmico. El control de isotipo para ambas proteínas (a y c). Magnificación 40X

7.2 Expresión de p38 y p-p38 en biopsias de tejido con LNH de pacientes pediátricos

Con el propósito de evaluar si los anticuerpos utilizados para las inmunotinciones, podían ser empleados también para muestras parafinadas. Empleando la técnica de inmunohistoquímica se llevó a cabo la evaluación de la expresión de las proteínas p38 y p-p38 en biopsias de pacientes diagnosticados con LNH, a una concentración de 0.26 µg/ml (dilución 1:600) y se procedió a revelar con DAB. Como se muestra en la figura 3, la expresión de p38 (b) se observó a nivel citoplásmico, mientras que p-p38 (c), se encontró principalmente a nivel nuclear. Como se esperaba la tinción para p38 se presentó en un número mayor de células, a diferencia de su forma activa p-p38 que se encontró en un número mucho menor de células, pero con mayor intensidad. El control de isotipo no mostró tinción (a y c) lo cual denota especificidad de la tinción.

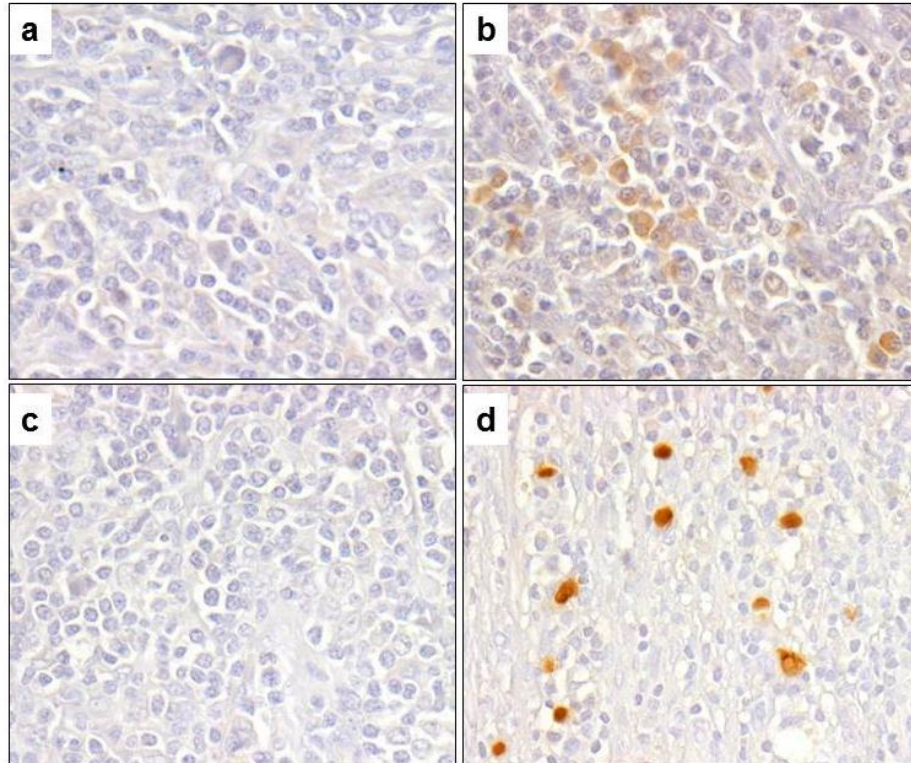


Figura 3. Microfotografía representativa de la expresión de p38 y p-p38 en biopsias de tejido con LNH de pacientes pediátricos mediante inmunohistoquímica. Se observa una clara expresión de p38 (b) a nivel citoplásmico y de p-p38 (d) predominantemente a nivel nuclear y baja expresión a nivel citoplásmico. El control de isotipo para ambas proteínas (a y c). Magnificación 40X

7.3 Construcción del microarreglo de tejidos

Después de haber evaluado la correcta funcionalidad de los anticuerpos para identificar las proteínas de interés. Se llevó a cabo la construcción del microarreglo de tejidos, a partir de biopsias parafinadas de pacientes pediátricos con LNH, esto con ayuda de un patólogo experto el cual decidió las zonas en el bloque de parafina de cada paciente, las cuales eran representativas para cada subtipo de LNH a partir de una tinción de H/E (proceso conocido como punteado). Después de que las zonas fueron seleccionadas, con ayuda de un histotecnólogo experto en el área, se procedió a la construcción del microarreglo de tejidos. En la Tabla III se presentan el número de biopsias y los diferentes subtipos de LNH que se incluyeron en el microarreglo de tejidos. En la figura 4, se muestra el mapa a partir del cual se construyó dicho microarreglo.

Subtipo de linfoma	Número de Pacientes
Linfoma Linfoblástico	11
Linfoma de Células Grandes	8
Linfoma Anaplásico	4
Linfoma de Burkitt	12
Número total de biopsias	35

Tabla III. Biopsias y subtipos de LNH utilizados en la construcción del microarreglo

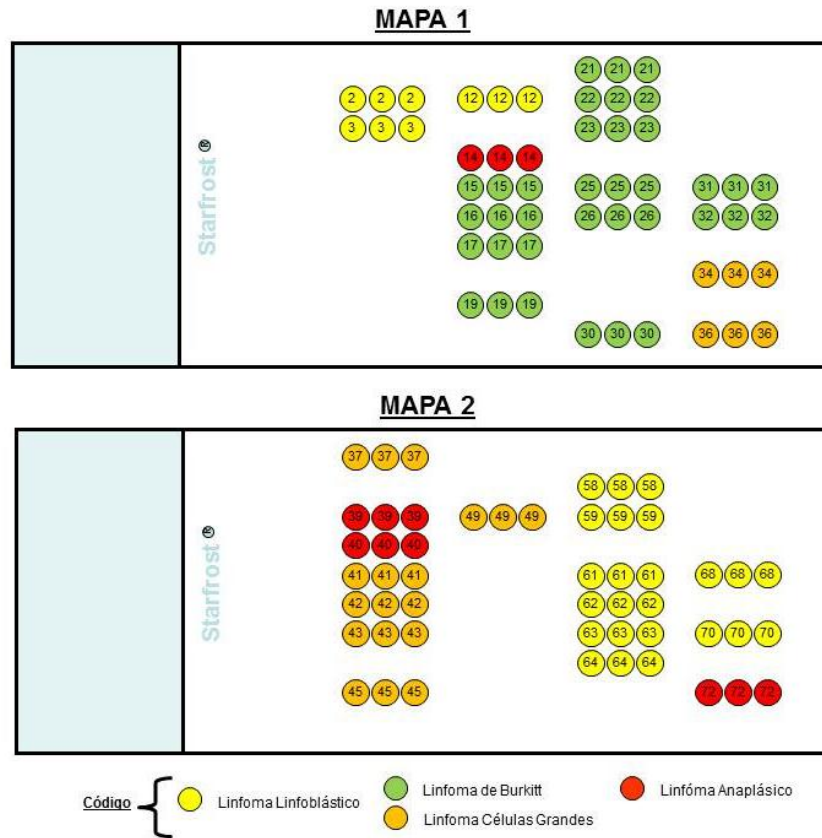


Figura 4. Mapa empleado en la construcción del microarreglo de tejidos de pacientes pediátricos con LNH.

7.4 Evaluación de la expresión de p38 y p-p38 en el microarreglo de tejidos de pacientes pediátricos con LNH

Una vez confirmada la funcionalidad de nuestros anticuerpos en muestras parafinadas de pacientes pediátricos, se llevó a cabo la evaluación de la expresión de las proteínas p38 y p-p38 mediante la técnica de inmunohistoquímica en el microarreglo de tejidos, dichos anticuerpos se usaron a una concentración de 0.26 µg/ml (dilución 1:600) y del mismo modo se procedió a revelar con DAB. En la figura 5, se muestra el microarreglo de tejidos que fue utilizado para evaluar la expresión de la proteína MAPK p38 (a y b). Como ejemplo en la figura se muestran áreas representativas de linfoma de Burkitt (c) y linfoblástico (d). La proteína antes mencionada se encontró a nivel citoplásmico de manera diferencial en ambos subtipos de linfoma, con una expresión mayor en el linfoma linfoblástico (f) comparado con el de Burkitt (e). Mientras que en la figura 6, se muestra la evaluación de la expresión la proteína MAPK p-p38 y el microarreglo empleado para esta evaluación (a y b) del mismo modo como ejemplo, se seleccionaron áreas representativas de linfoma de Burkitt (c) y linfoblástico (d) y al igual que para p38, la proteína p-p38 se observó a nivel citoplásmico y siguiendo este comportamiento se encontró de manera diferencial en ambos subtipos de linfoma, con una expresión mayor en el linfoma linfoblástico (f) comparado con el de Burkitt (e).

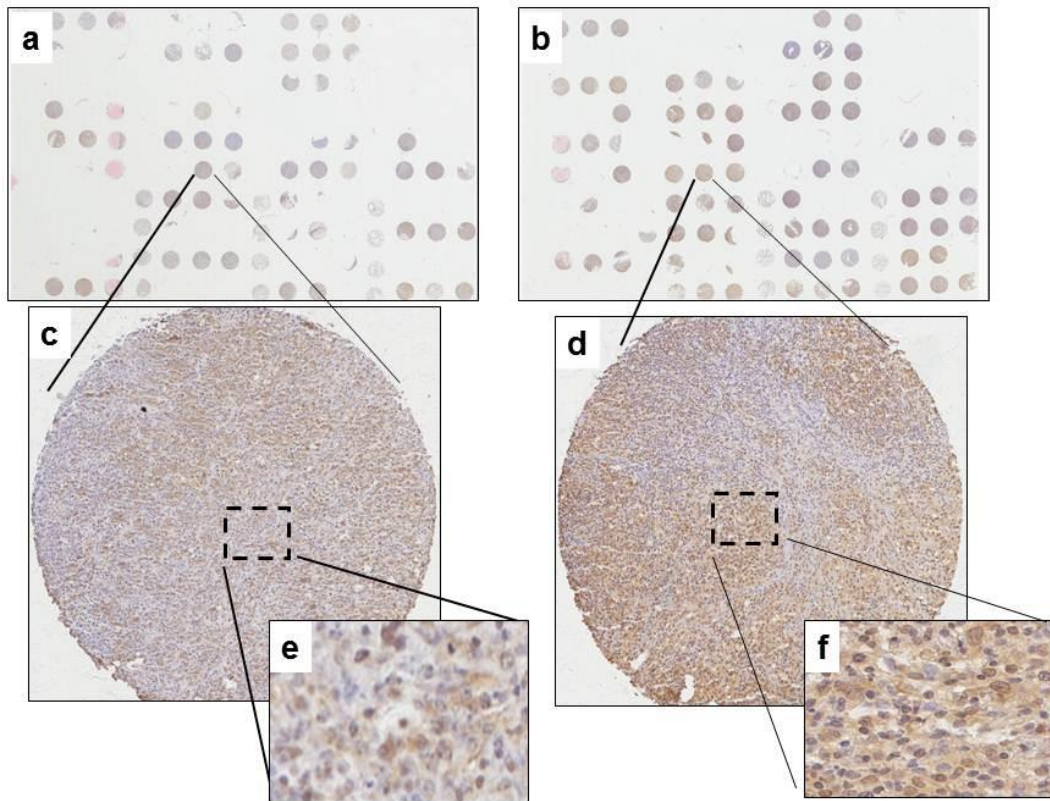


Figura 5. Microfotografía representativa de la expresión de p38 en el microarreglo de tejidos de LNH. Se muestra el microarreglo empleado para evaluar la expresión de la proteína p38 (a y b), así como dos áreas representativas que corresponden al linfoma de Burkitt (c) y al linfoma linfoblástico (d), en la parte inferior se encuentra la magnificación de estas áreas Burkitt (e), linfoblástico (f). El control de isotipo para ambas proteínas (dato no mostrado). Magnificación 40X.

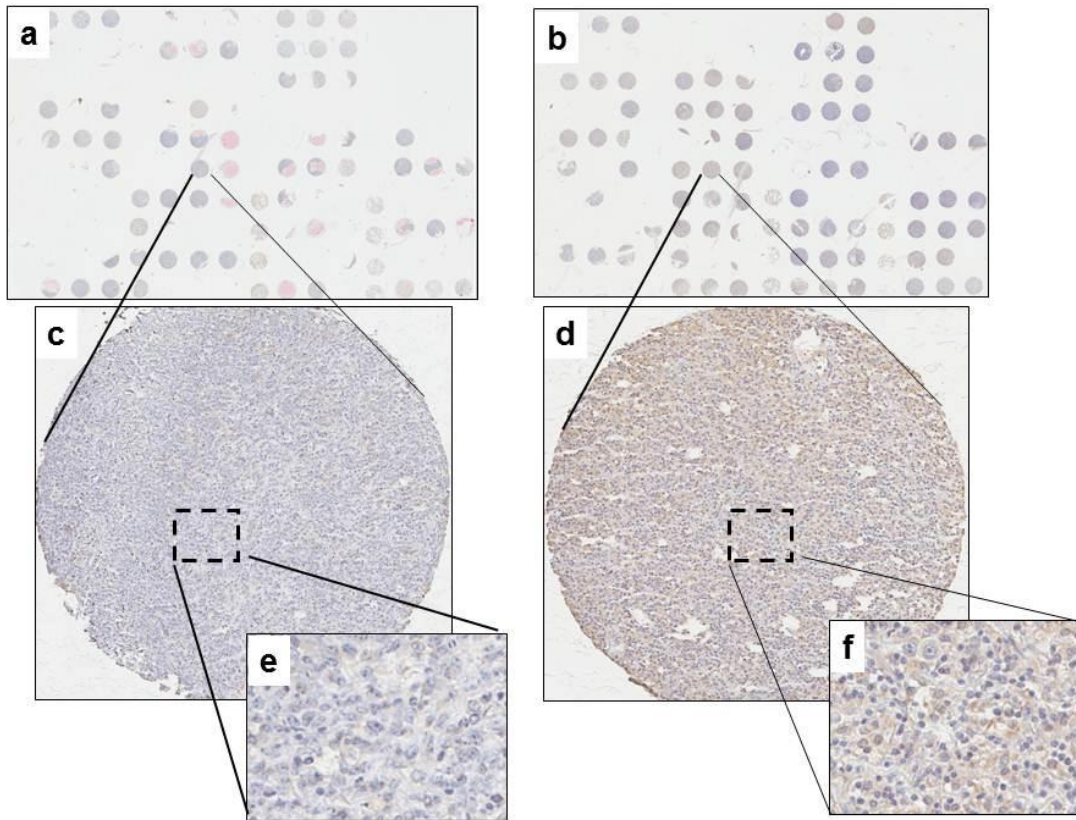


Figura 6. Microfotografía representativa de la expresión de p-p38 en el microarreglo de tejidos de LNH. Se muestra el microarreglo empleado para evaluar la expresión de la proteína p-p38 (a y b), así como dos áreas representativas que corresponden al linfoma de Burkitt (c) y al linfoma linfoblástico (d), en la parte inferior se encuentra la magnificación de estas áreas Burkitt (e), linfoblástico (f). Esta proteína se encuentra expresada primordialmente a nivel nuclear, y en mucho menor cantidad a nivel citoplásmico. El control de isotipo para ambas proteínas (dato no mostrado). Magnificación 40X.

7.5 Análisis de la expresión de p38 y MAPK p-p38

Mediante el uso de un equipo automático Aperio ScanScope CS (San Diego California, USA), se digitalizó la laminilla del microarreglo de tejidos que previamente fue inmunoteñida para p-38 y p-p38. En la imagen digitalizada se llevó a cabo el análisis cuantitativo mediante patología digital de la expresión para cada una de las proteínas, utilizando el programa ImagenScope de Aperio. En donde se evalúa la cantidad de pixeles de la coloración café en el tejido inmunoteñido que denota expresión de las proteínas, pues utilizamos el sistema HPR-DAB como revelador de la tinción. Utilizando la media de los valores en pixeles se elaboró una base de datos, la cual fue procesada utilizando el programa Prisma para Windows ver. 5.03. Con estos datos se elaboraron las gráficas para la expresión de p38 (figura 7) y p-p38 (figura 8). Se observó una expresión diferencial de MAPK p38 y p-p38 en los diferentes tejidos analizados, observándose una mayor cantidad de MAPK p38 comparada con su forma activa p-p38. Se muestra que existen diferencias estadísticamente significativa entre el subtipo histológico de LNH de Burkitt (LB) en comparación con el linfoma anaplásico (LA) y entre el linfoblástico con el anaplásico (LA) ($p= 0.0024$, ANOVA, índice de confianza del 95%). Para el caso de p-p38, solo se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el linfoma linfoblástico (LL) y el linfoma anaplásico (LA) ($p= 0.05$, ANOVA, índice de confianza del 95%)

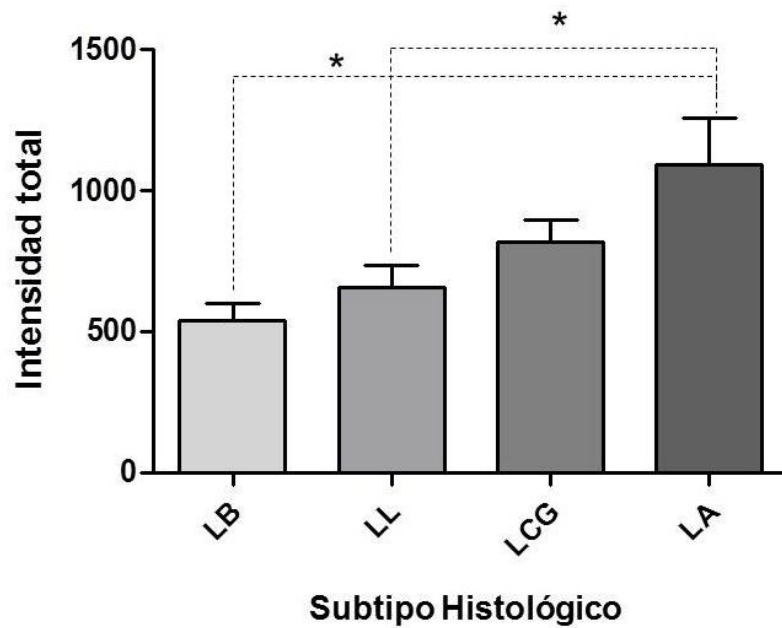


Figura 7. Análisis de la expresión de MAPK p38. Se muestra los diferentes subtipos histológico de LNH, linfoma de Burkitt (LB), linfoma linfoblástico (LL), linfoma de células grandes (LCG) y linfoma anaplásico (LA). Donde se puede observar una diferencia significativa de la expresión de esta proteína entre los subtipos LB y LL en comparación con el subtipo LA ($p= 0.0024$, ANOVA, índice de confianza del 95%).

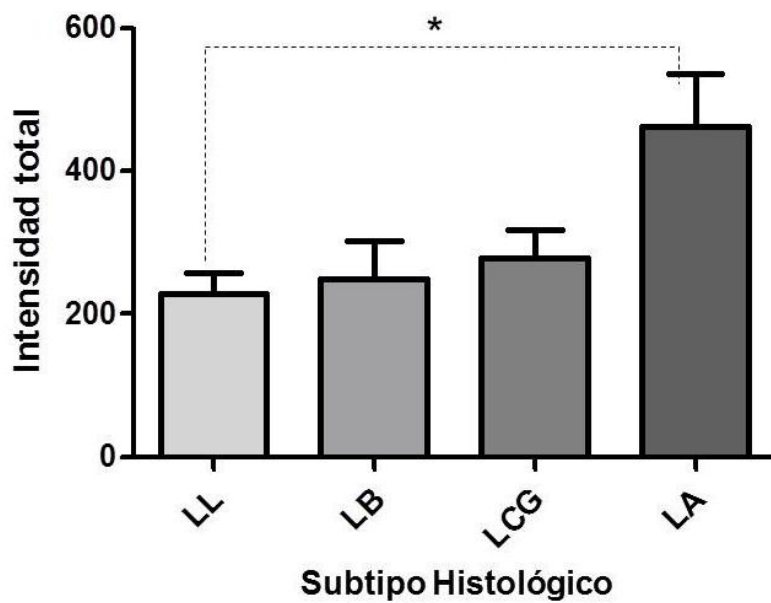


Figura 8. Análisis de la expresión de MAPK p-p38. Se muestra los diferentes subtipos histológico de LNH, linfoma de Burkitt (LB), linfoma linfoblástico (LL), linfoma de células grandes (LCG) y linfoma anaplásico (LA). Donde se puede observar que sólo existe diferencia significativa de la expresión de esta proteína entre el subtipo LL comparado con el subtipo LA ($p= 0.05$, ANOVA, índice de confianza del 95%).

8. DISCUSIÓN

La importancia de la activación de MAPK en respuesta al tratamiento tumoral y el desarrollo de resistencia al mismo, han ido aumentando en los últimos años. Actualmente se considera, que la activación de MAPK cinasas es uno de los componentes mayoritarios que deciden el destino celular en respuesta a estos agentes citotóxicos. Sin embargo, establecer el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo dicha resistencia resulta complicado [8].

La proteína MAPK p38 tiene un papel importante en la decisión del destino celular, así mismo en una amplia variedad de respuestas biológicas, incluyendo la regulación del ciclo celular, apoptosis y la diferenciación [28]. En algunos sistemas hematológicos, la activación de MAPK p38 juega un papel clave promoviendo o inhibiendo el crecimiento hematopoyético y en algunos de estos casos, promueve la formación de neoplasias. En el caso de la leucemia mielocítica crónica (una de las neoplasias hematológicas más comunes) se ha demostrado que la ruta de MAPK p38 juega un papel crucial, pues es esencial para los efectos anti-leucémicos del IFN- α .

En el caso de los linfomas (otra enfermedad hematológica), la sobreexpresión de MAPK p38 en los linfomas de Hodgkin se relaciona con los factores de crecimiento que promueven la proliferación celular descontrolada a través de TNF- α [30].

Así mismo otro hallazgo muy interesante es que Rituximab, (el cual es empleado como tratamiento de linfoma en adultos) inhibe la actividad de MAPK p38 en la línea celular de LNH 2F7, lo cual induce una disminución de la transcripción de IL-10 [26] y de manera similar la inhibición de la vía MAPK p38 induce la apoptosis e

impide la reactivación del virus de Epstein Barr en la línea celular de LNH Raji [27], además MAPK p38 se encuentra sobreexpresada en biopsias de adultos, esto evaluado mediante inmunohistoquímica [28]. Sin embargo, no existen datos publicados que muestren la expresión de MAPK p38 y su forma activa p-p38 en pacientes pediátricos, lo cual es muy importante, puesto que se sabe que la fisiopatogénesis del linfoma es diferente en adultos que en niños.

En el presente estudio se encontró que para líneas celulares de linfoma no Hodgkin 2F7 y Raji existe una sobreexpresión de MAPK p38, lo cual valida la funcionalidad de nuestros anticuerpos y concuerda con lo que se ha reportado [26], [27].

Posteriormente se procedió a la estandarización de nuestros anticuerpos en una muestra parafinada de un paciente pediátrico diagnosticado con LNH antes de proseguir directamente al microarreglo ya que no existen reportes en los que se empleen estos anticuerpos este tipo de muestras. Nuestros resultados demostraron que ambos anticuerpos funcionan de manera adecuada en tejido parafinado (Figura 3).

Una vez confirmada la funcionalidad, se procedió a evaluar la expresión de p38 y p-p38 en el microarreglo de tejidos, técnica que en los últimos años ha adquirido una gran importancia debido a que nos permite analizar una gran cantidad de muestras al mismo tiempo y bajo las mismas condiciones, lo cual elimina el error interensayo. Los resultados de la inmunotinción en el microarreglo mostraron una mayor expresión de MAPK p38 con respecto a su forma activa (p-p38), lo cual es congruente debido a que p38 es una proteína constitutiva y solo una porción del total se encuentra activada. Se encontró una expresión diferencial de p38 y p-p38

en las biopsias de LNH pediátrico. p38 se mostró expresado de manera exclusiva en el citoplasma, mientras que su forma activa p-p38 se observó primordialmente en núcleo y en menor proporción en citoplasma, lo cual es consistente con estudios donde se evalúa la expresión de estas proteínas en tejido, estos hallazgos son razonables ya que p38 se encuentra en el citoplasma donde ocurre su activación para posteriormente pueda traslocarse al núcleo donde ejerce su acción directa o indirecta sobre sus genes blanco [31].

De manera interesante se encontró que existe una mayor expresión de ambas formas de la proteína (p38, p-p38) en el subtipo LA, el cual es considerado uno de los más agresivos LNH pediátricos, el subtipo que presentó también expresión importante fue LCG, posteriormente LL y el subtipo con menor expresión fue LB, el cual tiene el mejor pronóstico. No se encontraron diferencias significativas entre los demás subtipos de linfomas empleados en el estudio, lo cual podría deberse al número de muestras, por lo que es necesario realizar otro estudio con mayor número de muestras en donde se aumentaría la posibilidad de encontrar diferencias significativas. Estos resultados son consistentes con lo reportado acerca de la relación de la sobreexpresión de MAPK p38 y la expresión de TNF- α en los LH. Además con lo reportado acerca de que MAPK p38 puede desempeñar un papel en la activación de los factores de crecimiento que promuevan la proliferación de células malignas en líneas celulares de LNH y con la expresión aberrante de c-Jun y JunB, cascada abajo de MAPK p38, lo que ha sugerido que participan en la proliferación de este tipo de células.

Es importante mencionar que el anticuerpo que reconoce p38 empleado en este estudio, solo reconoce las isoformas α y β (dos de las cuatro isoformas de p38),

por lo que sería muy interesante evaluar específicamente cual de las cuatro isoformas está mayormente involucrada en el desarrollo del LNH pediátrico.

Se sabe que las isoformas (α y β) se encuentran sobreexpresadas en tejido de pacientes con cáncer de colon [32]. Por otro lado, en líneas celulares derivadas de linfoma difuso de células B, mediante estudios de RT-PCR se encontró una mayor expresión de las isoformas, β , γ y δ pero no de la isoforma α , sin embargo es importante resaltar que la técnica de RT-PCR nos indica el nivel de RNA mensajero no de proteína y por lo tanto, no se puede saber mediante esta técnica si estas isoformas se encuentran fosforiladas, es decir activas.

En resumen en este estudio se muestra por primera vez que existe una asociación directa entre la expresión de la proteína p38 y p-p38 con los subtipos histológicos de LNH pediátrico considerados de peor pronóstico. Lo cual sugiere que la proteína MAPK p38 participa de manera importante en la fisiopatogénesis de esta enfermedad.

9. CONCLUSIÓN

- Se comprobó la funcionalidad de nuestros anticuerpos mediante el análisis de la expresión de p38 (α y β) y p-p38 en las líneas celulares y tejido parafinado de LNH.
- Se encontró una mayor expresión de las isoformas α y β de p38 comparada con su forma activa p-p38 en biopsias de pacientes pediátricos con LNH.
- Se encontró una asociación directa entre el nivel expresión de MAPK p38 (α y β) y p-p38 con los subtipos histológicos de LNH de peor pronóstico (linfoma anaplásico).

10. PERSPECTIVAS

- Construir un microarreglo de tejidos con mayor número de muestra de pacientes pediátricos con LNH, que tenga una mayor cantidad de datos clínicos.
- Correlacionar la expresión de p38 y p-p38 en el microarreglo de tejidos y realizar las correlaciones de la expresión con subtipo histológico, mortalidad, falla al tratamiento, recaída, etc.
- Correlacionar la expresión de las diferentes isoformas de p38 en el microarreglo de tejidos y realizar las correlaciones de la expresión con subtipo histológico, mortalidad, falla al tratamiento, recaída, etc.

11. REFERENCIAS

1. Cairo, M.S. Raetz , E. Lim MS, Davenport V, Perkins SL, 2005, *Childhood and adolescent non-Hodgkin lymphoma: new insights in biology and critical challenges for the future*, *Pediatr Blood Cancer*, 45, p. 753-769.
2. National Cancer Institute Physician Data Query (PDQ), Childhood Non-Hodgkin Lymphoma Treatment, 2010, Accessed at www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/child-non-hodgkins/healthprofessional on November 22, 2011.
3. Cáncer infantil a nivel mundial, Secretaría de Salud, CENSIA, 2010.
4. Elaine S. Jaffe, E.S. Jacques Diebold, Nancy L. Harris, Hans-Konrad Muller-Hermelink, Georges Flandrin and James W. Vardiman, 1999, *Burkitt's lymphoma: a single disease with multiple variants. The World Health Organization classification of neoplastic diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues*. *Blood*, 93, p. 1124.
5. Nancy Mueller, Alejandro Mohar, Alfred Evans, Nancy L. Harris, George W. Comstock, Egil Jellum, Knut Magnus, Norman Orentreich, B. Frank Polk, Joseph Vogelmann, 1991, *Epstein-Barr virus antibody patterns preceding the diagnosis of non-Hodgkin's lymphoma*. *Int J Cancer*, 49, p. 387-393.
6. Nyla A Heerema; Alain Bernheim; Megan S Lim; A Thomas Look; Laura Pasqualucci; Elizabeth Raetz; Warren G Sanger; Mitchell S Cairo; 2005, *State of the Art and Future Needs in Cytogenetic/Molecular Genetics/Arrays in childhood lymphoma: summary report of workshop at the First International Symposium on childhood and adolescent non-Hodgkin*

- lymphoma*, April 9, New York City, NY. *Pediatr Blood Cancer*, 45, p. 616-622.
7. Pineda Daboin K. Rosas García M. Rosas Uribe A., 2007, *Linfomas no Hodgkin en pacientes pediátricos: características clínicas, histológicas, inmunofenotípicas y genotípicas*, *Patología Revista latinoamericana*, 45, p.169-178.
 8. American Cancer Society *Cancer Facts & Figures 2011*. Atlanta, Ga: American Cancer Society.
 9. Barroso Álvarez M., 1999, *Histiopathological classifications of lymphomas*, *Revista Cubana de Oncología*, 15, p.67-69.
 10. Pearson, G., Robinson, F., Beers Gibson, T., Xu, B.E., Karandikar, M., Berman, K., y Cobb, M.H., 2001, *Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions*, *Endocr Rev*, 22, p.153-183.
 11. Nebreda, A.R., y Porras, A., 2000, *p38 MAP kinases: beyond the stress response*, *Trends Biochem Sci*, 25, p.257-260.
 12. Shi, Z., Resing, K.A., y Ahn, N.G, 2006, *Networks for the allosteric control of protein kinases*, *Curr Opin Struct Biol*, 16, p.686-692.
 13. Raingeaud, J., Gupta, S., Rogers, J.S., Dickens, M., Han, J., Ulevitch, R.J., y Davis, R.J. 1995, *Pro-inflammatory cytokines and environmental stress cause p38 mitogenactivated protein kinase activation by dual phosphorylation on tyrosine and threonine*, *J Biol Chem*, 270, p.7420-7426.

14. Lechner, C., Zahalka, M.A., Giot, J.F., Moller, N.P., y Ullrich, A., 1996, *ERK6, a mitogen-activated protein kinase involved in C2C12 myoblast differentiation*, Proc Natl Acad Sci U S A, 93, p.4355-4359.
15. Li, Z., Jiang, Y., Ulevitch, R.J., y Han, J., 1996, *The primary structure of p38 gamma: a new member of p38 group of MAP kinases*, Biochem Biophys Res Commun, 228, p.334-340.
16. Kumar, S., McDonnell, P.C., Gum, R.J., Hand, A.T., Lee, J.C., y Young, P.R., 1997, *Novel homologues of CSBP/p38 MAP kinase: activation, substrate specificity and sensitivity to inhibition by pyridinyl imidazoles*, Biochem Biophys Res Commun, 235, p.533-538.
17. Jiang, Y., Chen, C., Li, Z., Guo, W., Gegner, J.A., Lin, S., y Han, J., 1996, *Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta)*, J Biol Chem, 271, p.17920-17926.
18. Court, N.W., dos Remedios, C.G., Cordell, J., y Bogoyevitch, M.A., 2002, *Cardiac expression and subcellular localization of the p38 mitogen-activated protein kinase member, stress-activated protein kinase-3 (SAPK3)*, J Mol Cell Cardiol, 34, p.413-426.
19. Dashti, S.R., Efimova, T., y Eckert, R.L., 2001, *MEK7-dependent activation of p38 MAP kinase in keratinocytes*, J Biol Chem, 276, p.8059-8063.
20. Nemoto, S., Xiang, J., Huang, S., y Lin, A., 1998, *Induction of apoptosis by SB202190 through inhibition of p38beta mitogen-activated protein kinase*, J Biol Chem, 273, p.16415-16420.

21. Johnson, G.L. and R. Lapadat, 2002, *Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases*, Science, 298, p. 1911-1912.
22. Hallahan AR, Pritchard JI, Chandraratna RA, Ellenbogen RG, Geyer JR, Overland RP, 2003, *BMP-2 mediates retinoid-induced apoptosis in medulloblastoma cells through a paracrine effect*, Nat Med, 9, p.1033-1038.
23. Losa JH, Parada Cobo C, Viniegra JG, Sanchez- Arevalo Lobo VJ, Ramon y Cajal S, Sanchez-Prieto R., 2003, *Role of the MAPK p38 pathway in cisplatinbased therapy*, Oncogene, 22, p.3998-4006.
24. Guo, Xianling, Nannan Ma, Jin Wang, Jianrui Song, Xinxin Bu, Yue Cheng, Kai Sun, 2008, *Increased p38-MAPK is responsible for chemotherapy resistance in human gastric cancer cells*, BMC Cancer, 8, p.375.
25. Yang, Shi Yu, Anur Miah, Kevin M Sales, Barry Fuller, Alexander M Seifalian, and Marc Winslet, 2011, *Inhibition of the MAPK p38 pathway sensitises human colon cancer cells to 5-fluorouracil treatment*, International Journal of Oncology, 38, p.1695-1702.
26. Vega, Mario I, Sara Huerta-Yepaz, Hermes Garban, Ali Jazirehi, Christos Emmanouilides, and Benjamin Bonavida, 2004, *Rituximab inhibits MAPK p38 activity in 2F7 B NHL and decreases IL-10 transcription: pivotal role of MAPK p38 in drug resistance*, Oncogene , 23, p.3530-3540.
27. Matusali, Giulia, Giuseppe Arena, Alessandra De Leo, Livia Di Renzo, and Elena Mattia, 2009, *Inhibition of p38 MAP kinase pathway induces apoptosis and prevents Epstein Barr virus reactivation in Raji cells exposed to lytic cycle inducing compounds*, Molecular Cancer , 8.

28. Hu Ding, Ali M. Gabali, Stephen D. Jenson, Megan S. Lim, and Kojo S. J. Elenitoba-Johnson, *P38 mitogen activated protein kinase expression and regulation by interleukin-4 in human B cell non-Hodgkin lymphomas*. 2009, *J Hematop*, 2, p. 195-204.
29. Sergiy Kostenko, Gianina Dumitriu, Kari Jenssen Lægreid, Ugo Moens, 2011, *Physiological roles of mitogen-activated-protein-kinase-activated p38-regulated/activated protein kinase*, *World J Biol Chem* 2, p.73-89.
30. Feng, Y., J. Wen, and C.C. Chang, 2009, *p38 Mitogen-activated protein kinase and hematologic malignancies*. *Arch Pathol Lab Med*,. 133, p. 1850-1856.
31. Bradham, C. McClay, 2006, *MAPK p38 in development and cancer*, *Cell Cycle*, 5, p. 824-828.
32. Paillas, S. Boissiere, F. Bibeau, F. Denouel, A. Mollevi, C. Causse, A. Denis, V. Vezzio-Vie, N. Marzi, L. Cortijo, C. Ait-Arsa, I. Askari, N. Pourquier, P. Martineau, P. Del Rio, M. Gongora, C., 2011, *Targeting the MAPK p38 pathway inhibits irinotecan resistance in colon adenocarcinoma*, 71, p.3104-3109.