



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO PROTEÓMICO DE ASTROCITOMAS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO ARENAS ARANDA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

COMITÉ TUTORAL: DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

MÉXICO, D.F. MARZO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

ESTUDIO PROTEÓMICO DE ASTROCITOMAS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

RUTH RUIZ ESPARZA GARRIDO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. DIEGO ARENAS ARANDA
HOSPITAL DE PEDIATRÍA CMNSXXI
DE PEDIATRÍA. UNIDAD DE GENÉTICA

COMITÉ TUTORAL: DR. FABIO SALAMANCA GÓMEZ
CMNSXXI COORDINACIÓN DE INVESTIGACIÓN EN SALUD

DR. ALEJANDRO ZENTELLA DEHESA
HOSPITAL DE NUTRICIÓN SALVADOR ZUBIRÁN DEPARTAMENTO DE
BIOQUÍMICA

MÉXICO, D.F. MARZO, 2014.

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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 13 de enero de 2014, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **RUIZ ESPARZA GARRIDO RUTH** con número de cuenta **402092384** con la tesis titulada **"ESTUDIO PROTEÓMICO DE ASTROCITOMAS EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA"**, realizada bajo la dirección del **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**:

Presidente: DRA. MARTHA PATRICIA OSTROSKY SHEJET
Vocal: DR. SERGIO ENCARNACIÓN GUEVARA
Secretario: DR. FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
Suplente: DR. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO
Suplente: DR. MIGUEL ÁNGEL VELÁZQUEZ FLORES

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de febrero de 2014

M del Coro Arizmendi
DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Agradezco al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por el apoyo incondicional brindado durante el desarrollo de este trabajo de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, por la beca No. 207170 proporcionada durante la realización de este trabajo.

Al Dr. Diego Arenas Aranda por ser parte fundamental de mi formación académica, por la paciencia y apoyo incondicional que me brindo durante la realización de este trabajo.

Agradezco a los doctores Fabio Salamanca Gómez y Alejandro Zentella Dehesa por formar parte de mi comité tutorial, por el interés que siempre mostraron para mi formación académica y personal.

A los miembros del jurado de la tesis de doctorado:

Dra. Martha Patricia Ostrosky Shejet

Dr. Sergio Encarnación Guevara

Dr. Fabio Salamanca Gómez

Dr. Emilio Rojas Del Castillo

Dr. Miguel Ángel Velázquez Flores

Por la valiosa aportación que hicieron al presente trabajo.

Dedicatoria

Porque grande es hasta los cielos tu misericordia, y hasta las nubes tu verdad.
Exaltado seas sobre los cielos, oh Dios; sobre toda la tierra sea tu gloria.

Salmos 57:10-11

No tengo palabras para agradecerte por la vida, por el amor que me has dado a través de mis padres, mis hermanos y de mi hermoso esposo. Por permitirme concluir esta etapa de mi vida y sostenerme día a día sin importar lo difícil o complicado que parezca el camino, Gracias!!!

INDICE

Abreviaturas	1
Resumen.....	3
Abstract	5
Antecedentes	6
I. Astrocitomas.....	6
II. Tipos y características histológicas	8
Astrocitomas Grado I	8
a) Astrocitoma pilocítico	8
Astrocitomas Grado II	9
b) Astrocitoma Difuso	9
c) Astrocitomas Fibrilares.	10
Astrocitomas de alto grado	11
Astrocitomas Grado III	11
d) Anaplásicos	11
Astrocitomas Grado IV.....	13
e) Glioblastoma multiforme.....	13
III. Diferencias entre niños y adultos.....	14
IV. Vías de señalización celular alteradas en los Ast	15
a) Mecanismos moleculares de la vía de las MAPK que están únicamente alterados en los AstP.....	17
b) Mecanismos moleculares que están involucrados en la patogénesis de los GBM.....	19
i) Vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH)	19
ii) Vía de señalización e Notch.	21

iii) Vía de señalización Wingless e Int (Wnt)	22
iv) Vía de Señalización de las Proteínas Morfogénicas de Hueso (BMPs).	23
v) Receptores de Tipo Tirosina Cinasa (RTC). Alteraciones en el gen EGFR	23
vi) Factores de crecimiento vasculares endoteliales y Factores angiogénicos.	27
vii) Alteraciones de la vía TP53/MDM2/P14arf	28
viii) Alteraciones de la vía p16ink4/RB1/CDK4	29
ix) Otros Factores de transcripción involucrados en la patogénesis de los GBM.	30
V. Otros mecanismos asociados a la patogénesis de GBM.	31
a) Metilación de Promotores.....	33
b) MicroRNAs descritos en GBM.....	35
c) Aberraciones cromosómicas asociadas a GBM.....	38
VI. Técnicas de análisis masivo	38
Artículo Requisito	43
Discusión	58
Bibliografía.....	66

Abreviaturas

Ast. Astrocitoma

AstA. Astrocitoma Anaplásico

AstAg. Astrocitoma de alto grado

AstBg. Astrocitoma de bajo grado

AstD. Astrocitoma Difuso

AstP. Astrocitoma pilocítico

EGFR. Receptor del factor de crecimiento epidermal

ER. Retículo endoplásmico

ErB-2. Receptor de crecimiento epidérmico humano

FGFR1. Receptor del factor de crecimiento Fibroblástico

GBM. Glioblastoma Mutltiforme

HPLC. Cromatografía líquida de alta afinidad

IRS1. Sustrato del receptor de baja densidad 1

LRD-1. Lipoproteína de baja densidad 1

MAPK. Cinasas activadas por mitógenos

NF-1. Neurofibromatosis tipo 1

OMS. Organización Mundial de la Salud

PTEN. Homólogo de fosfatasa y tensina

RB. Retino blastoma

SNC. Sistema nervioso central

2D-PAGE. Electroforesis bidimensional

Resumen

Los astrocitomas son el principal tipo de tumor que se desarrolla en el sistema nervioso central, siendo la principal causa de muerte asociada a cáncer en edad pediátrica. Aunque se han identificado distintos mecanismos moleculares alterados en estos tumores, la mayoría de ellos han sido descritos en astrocitomas de adultos. Por lo cual, con el objetivo de identificar los mecanismos moleculares modificados en estos tumores pediátricos, de distintos grados histológicos, se determinó el patrón global de proteínas y microRNAs por medio de electroforesis bidimensional (2D SDS-PAGE), espectrometría de masas (MALDI-TOF) y RT² miRNA PCR Array. Los estudios proteómicos, revelaron 49 proteínas con cambio en su expresión respecto al tejido control y entre los distintos grados histológicos. El interactoma de vimentina, calreticulina y 14-3-3 epsilon, demostró que son proteínas centrales en estas neoplasias. Las redes de interacción proteína-proteína sugieren alteraciones en diversas vías de señalización celular como son la, apoptosis, transcripción de genes y mitosis. Asimismo, en concordancia con lo reportado para estas neoplasias, los interactomas de proteínas mostraron un gran número de alteraciones tanto en la vía de las proteínas activadas por mitógenos MAPK como en distintos miembros de las proteínas 14-3-3. Mediante western blot, se demostró una disminución del 50% en la expresión de la proteína 14-3-3 zeta/delta en los tumores de bajo y alto grado en relación con el tejido control. Asimismo, el análisis de la expresión de los miRNAs mostró mi con cambios en su expresión que no se han asociado a estos tumores y que controlan diversos “hallmarks” del cáncer. Interesantemente, la regulación a la baja del miR-138 y mir-145 en los tumores analizados, podría estar relacionada con la progresión tumoral ya que estos miRNAs están involucrados en la sobreexpresión de proteínas importantes como vimentina y Bax, respectivamente. Remarcablemente, muchas de las proteínas codificadas por los blancos de los miRNAs que encontramos con cambios en su expresión, interaccionan físicamente con proteínas que resultaron también con cambios en su expresión en el análisis de proteómica. En conjunto, nuestros resultados demuestran un alto nivel de

predicción bioinformático, basado en lo cual sugerimos posibles biomarcadores para el pronóstico, diagnóstico y tratamiento de estos tumores.

Abstract

Astrocytomas, a leading cause of death associated with cancer, are the most common primary central nervous system tumors in childhood. Although it has been identified several altered molecular mechanisms in these tumors, most of them have been described in adult astrocytomas. Therefore, in order to identify the molecular mechanisms modified in these pediatric tumors of different histological grades, we examined the global protein and microRNAs expression pattern by 2D SDS-PAGE, mass spectrometry (MALDI-TOF), and RT2 29 miRNA PCR Array System.

Proteomic studies revealed 49 proteins with expression change compared to control tissue and between different histological grades. Theoretical interactome showed that vimentin, calreticulin, and 14-3-3 epsilon protein are hub proteins in these neoplasms. Protein-protein interactions networks suggested alterations in various cell signaling pathways, apoptosis, gene transcription and mitosis. Also consistent with those reported for these tumors, the protein interactome showed many alterations in both the MAPK pathway and other members of the 14-3-3 protein. By western blot, a decrease of about 50 % of the protein 14-3-3 zeta / delta in tumors of low and high grade compared to the control tissue was demonstrated. Furthermore, analysis of RT2 PCR arrays showed altered microRNAs miRNAs that have not been associated with these tumors and controlling various " hallmarks " of cancer. Interestingly, the downregulation of miR-138 and miR-145 in the tumors may be associated with tumor progression because these miRNAs are involved in overexpression of important proteins such as Bax and vimentin, respectively . Remarkably, many of the proteins encoded by the targets of miRNAs that we found altered physically interact with proteins that were altered in our proteomic analysis. Taken together, our results demonstrate a high level of bioinformatic prediction, based on which we suggest possible biomarkers for prognosis, diagnosis and treatment of these tumors.

Antecedentes

I. Astrocitomas

Los astrocitomas (Ast) son un grupo de tumores del sistema nervioso central (SNC) que se desarrollan a partir de células específicas de la glía llamadas astrocitos [1-5]. Este grupo de tumores difieren tanto en su localización (pueden desarrollarse en cualquier región del SNC) como en sus características morfológicas y potencial de crecimiento. Se ha reportado una tasa de incidencia, estandarizada por edad de, 11.8 millones de personas por año a nivel mundial representando más del 50% de los tumores cerebrales infantiles [6-9] y cerca del 13% en edad adulta. La clasificación de estos tumores, se define con base en criterios morfológicos, citogenéticos, genéticos moleculares y marcadores inmunológicos establecidos por la organización mundial de la salud (OMS) [9]. Es importante mencionar, que con el fin de hacer más práctica la clasificación de los Ast, la OMS clasifica a estos tumores de dos maneras, una simplificada (Tabla I) y una extensa (Tabla II) [9].

Los Ast de bajo grado (AstBg), son considerados menos agresivos debido a que su crecimiento es lento, respondiendo mejor al tratamiento que los Ast de alto grado (AstAg). El índice de sobrevivencia de niños que presentan glioblastoma multiforme (GBM), con dos años de progresión va desde un 10 hasta un 30%, mientras que los niños con Ast pilocítico (AstP), con 10 años de progresión es mayor que el 95% [6-11]. Aunque la mayoría de los AstBg, se cree que son esporádicos, aquellos que se localizan en la vía óptica son asociados comúnmente con el síndrome de predisposición tumoral: neurofibromatosis de tipo 1 (NF-1) [12].

Tabla I. Clasificación simplificada de los Ast (OMS 2010).

Grado (OMS)	Nombre (OMS)	Criterios Histológicos
I	Astrocitoma Pilocítico	
II	Astrocitoma Difuso	Atipia Nuclear
III	Astrocitoma Anaplásico	Atipia Nuclear y alta actividad mitótica
IV	Glioblastoma Multiforme	Atipia Nuclear y alta actividad mitótica, proliferación del endotelio y/o necrosis

Tabla II. Clasificación extensa de los Ast (OMS 2010).

Astrocitoma Pilocítico		
Astrocitoma Pilomixóide	Grado I	AstBg
Astrocitoma Subependimal de Células Gigantes	Grado I	AstBg
Xantastrocitoma Pleomórfico	Grado II	AstBg
Astrocitoma Difuso	Grado II	AstBg
Astrocitoma Fibrilar		
Astrocitoma Gemiosfítico		
Astrocitoma Protoplásmico		
Astrocitoma Anaplásico	Grado III	AstAg
Glioblastoma	Grado IV	AstAg
Glioblastoma de Células Gigantes		
Giosarcoma		
Gliomatosis cerebelosa	Grado IV	

II. Tipos y características histológicas

Astrocitomas Grado I

a) Astrocitoma pilocítico

Los AstP, son el tipo de Ast más común en niños de 0-19 años de edad (Fig.1). Estos tumores se caracterizan por poseer un patrón bifásico: células bipolares compactas que presentan fibras de Rosenthal, microquistes y cuerpos granulares (Fig.2). En pocas ocasiones, se observan células en mitosis, núcleos hipercromáticos, angiogénesis e infiltración al área de las meninges. En general, los AstP pueden ser retirados quirúrgicamente sin dañar el tejido adyacente, cuando la estructura anatómica lo permite. Asimismo, estos tumores no progresan a estados más agresivos durante años e incluso décadas, por lo que son considerados como tumores de buen pronóstico. Los tumores de este tipo se pueden generar a lo largo del neuroeje y se sitúan preferentemente en el cerebelo [9 y 13-16]. Es importante mencionar, que existen enfermedades genéticas como la neurofibromatosis tipo I (NF1), que predisponen a la formación de AstP. Aproximadamente, el 15% de los individuos que presentan NF1 desarrollan estos tumores, especialmente en el nervio óptico [17-19].

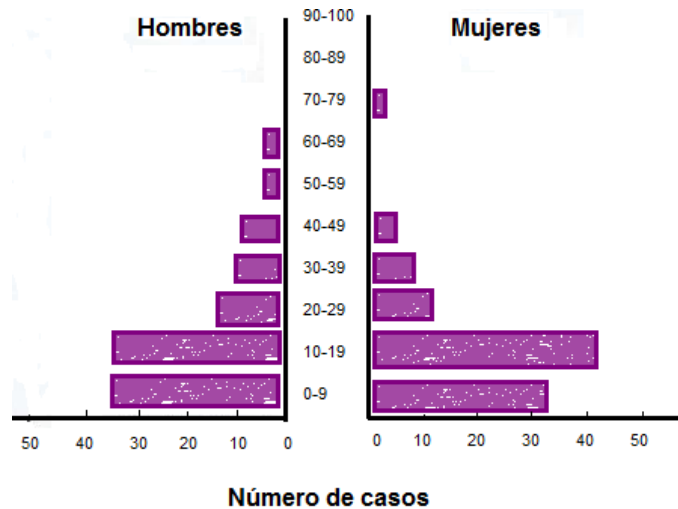


Figura 1. Distribución de los AsP por edad y sexo. La gráfica muestra una incidencia mayor de estos tumores en edades tempranas. Tomado y modificado de Kleihues *et al* 2000

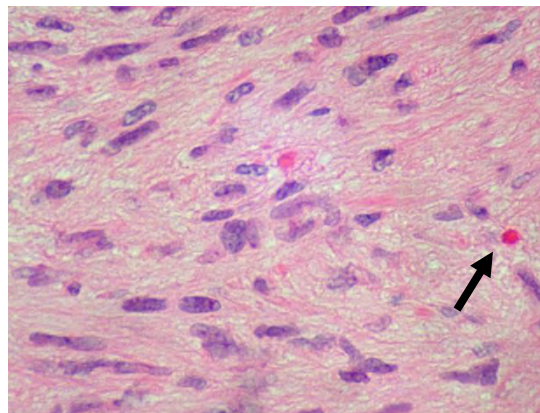


Figura 2. Características morfológicas de los AstP. Células con prolongaciones citoplasmáticas sin necrosis ni mitosis acompañándose de escasas fibras de Rosenthal. La flecha señala una de estas características fibras de Rosenthal (aumento 40x).

Astrocitomas Grado II

b) Astrocitoma Difuso

Por su parte, los Ast difusos (AstD) se caracterizan por presentar una alta diferenciación celular, crecimiento lento e infiltración difusa hacia las estructuras vecinas. Este tipo de tumores se presentan con una mayor frecuencia en los adultos jóvenes (Fig. 3), mostrando una tendencia inminente a progresar hacia los

grados III y IV. Los AstD, están conformados por astrocitos neoplásicos tanto fibrilares como gemiocíticos bien diferenciados. Como rasgo característico, la celularidad es moderada con algunos núcleos atípicos [9].

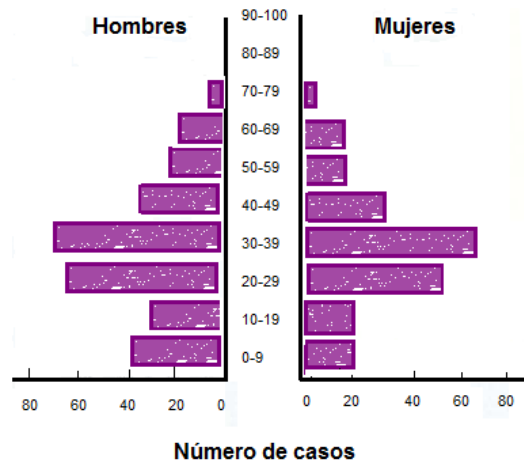


Figura 3. Distribución por edad y sexo de los AstD. La gráfica muestra mayor incidencia de esto tumores entre los 20-30 años de edad. Tomado y modificado de Kleihues *et al* 2000

c) Astrocitomas Fibrilares.

Los Ast fibrilares (AstF), son la forma más común de los Ast de grado II. Debido a su naturaleza infiltrante, usualmente se observa alargamiento y distorsión del tejido, sin llegar a la destrucción (Fig.4). Los AstF, están compuestos predominantemente por astrocitos neoplásicos fibrilares, presentando atipia nuclear, núcleo hipercromático y bajo índice mitótico; la necrosis y la microvascularización están ausentes. Los tumores de este tipo, pueden formar quistes tanto en la materia gris como en la blanca, con una densidad celular de baja a moderada; el citoplasma suele ser escaso, con apariencia de núcleos desnudos y una matriz fibrilar (Fig.5) [9 y 20]. Estos tumores, pueden desarrollarse en cualquier región del SNC, con preferencia a la región supratentorial del cerebro; los lóbulos frontal y temporal son los más afectados en niños y adultos. Asimismo, la presencia de estos tumores en el tallo cerebral y la médula espinal es común, mientras que en el cerebelo se presentan con poca frecuencia [9].

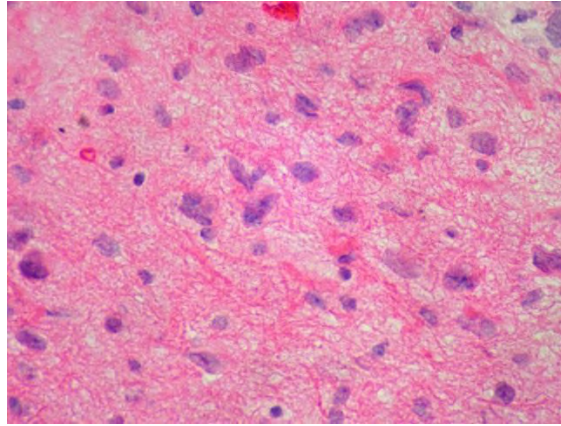


Figura. 4. Corte histológico de AstF. En la que se observa una neoplasia homogénea de astrocitos con leves cambios nucleares sobre un fondo fibrilar (40x).

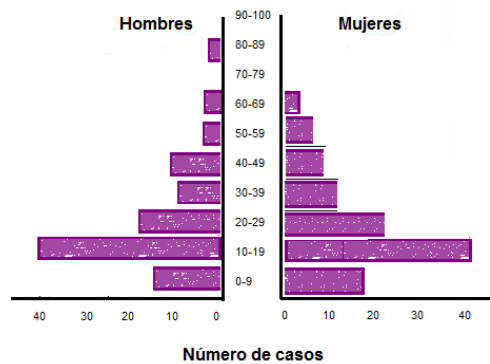


Figura 5. Distribución por edad y sexo de los AstF. La grafica muestra una notoria incidencia de estos tumores entre los 10y 19 años de edad Tomado y modificado de Kleihuues *et al* 2000.

Astrocitomas de alto grado

Astrocitomas Grado III

d) Anaplásicos

Los AstA, se describen como tumores infiltrantes con anaplasias focales y dispersas, además de poseer un potencial proliferativo muy evidente. Se presentan con mayor frecuencia en adultos jóvenes y tienen una incidencia mayor en hombres que en mujeres (Fig.6). Estos tumores pueden generarse a partir de AstBg o diagnosticarse sin existir un antecedente previo. La naturaleza intrínseca

de estos tumores, es progresar hacia GBM y su localización es la misma que la de los Ast grado II, aunque con una proliferación más elevada. Los quistes macroscópicos son inusuales, sin embargo, comúnmente se observan áreas de granulación opaca y de consistencia suave. Asimismo, los AstA muestran microvascularización y núcleos celulares atípicos, lo cual indica que estos tumores son progresivos y que poseen un nivel mitótico elevado (Fig.7) [9, 21].

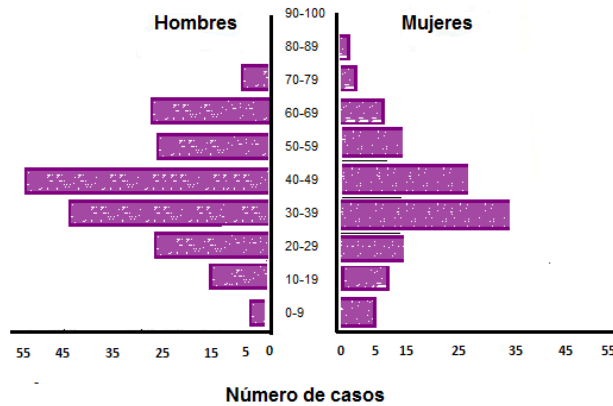


Figura 6. Distribución por edad y sexo de AstA. La gráfica muestra que las personas mayores de 30 años y hasta 69 años presentan una mayor incidencia de estos tumores respecto a otros rangos de edad. Tomado y modificado de Kleihues *et al* 2000.

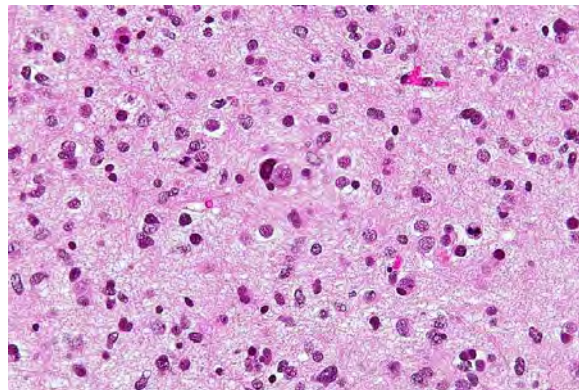


Figura 7. Características morfológicas de los AstA con alta celularidad, atipia nuclear muy marcada y actividad mitótica en astrocitos neoplásicos fibrilares y gemistocíticos (20x).

Astrocitomas Grado IV

e) Glioblastoma multiforme

El GMB, corresponde a la forma más agresiva de los tumores astrocíticos, debido a que presentan una invasión muy rápida hacia los tejidos circundantes. Estos tumores son mucho más frecuentes en adultos que en niños, con una mayor incidencia entre 45 y 70 años de edad (Fig.8). Este tumor, está compuesto por astrocitos neoplásicos, pobremente diferenciados, que histológicamente se caracterizan por presentar atipia nuclear, alta actividad mitótica, trombosis vascular, microvascularización y necrosis (Fig. 9). El GBM, se puede generar a partir de astrocitomas de grado II (AstF) y III (AstA); sin embargo, en la mayoría de los casos son diagnosticados de novo. En general, el GBM se encuentra pobremente delimitado, presentando quistes macroscópicos llenos de fluido que corresponden a tejido necrótico de desecho; la necrosis representa más del 80% de la masa total de estos tumores [9, 23-26].

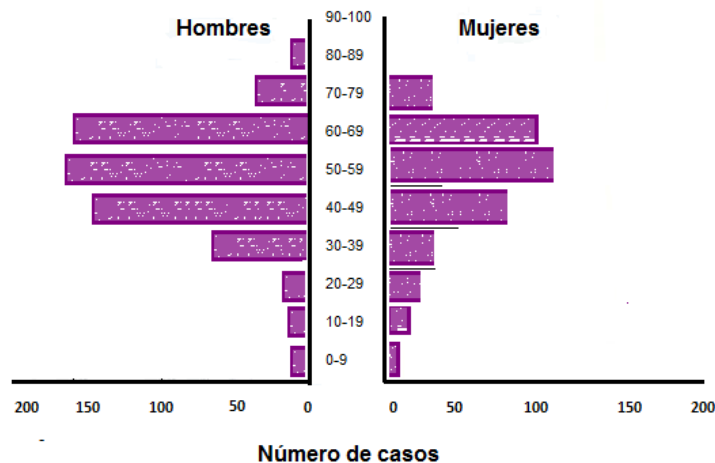


Figura 8. Distribución por edad y sexo de GBM. La incidencia como se muestra en la gráfica es mucho mayor en adultos. Tomado y modificado de Kleihues *et al* 2000.

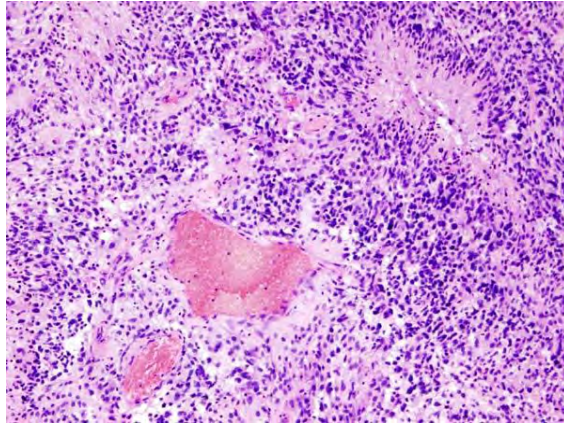


Fig. 9. Corte histológico de GBM. Se observa hiper-celularidad, con áreas de necrosis tumoral que son delimitadas por células neoplásicas en empalizada; la necrosis representa más del 80% de la masa total de estos tumores.

III. Diferencias entre niños y adultos

Los tumores astrocíticos, en niños y adultos, a pesar de ser histológicamente indistinguibles, presentan alteraciones genéticas y moleculares que permiten separarlos en distintos grupos [27-28]. Importantly, la mayoría de los estudios realizados hasta ahora han sido realizados en Ast de alto grado de población adulta. Sin embargo, los pocos análisis genéticos realizados en Ast pediátricos de alto grado, demostraron que estos tumores presentan una frecuencia menor de variantes en el número de copias (CNV) y un menor número de mutaciones (15 mutaciones por tumor), comparado con su contraparte en adultos (36 mutaciones por tumor) [28]. Asimismo, aun cuando existen vías de señalización preferencialmente alteradas como la vía de las (MAPK), los componentes alterados en esta vía son distintos y específicos para cada grupo (Tabla 3) [28].

Tabla 3. Localización y alteraciones más frecuentes en Astrocitomas de alto grado en las diferentes edades.

Alteración Genética Localización de los Tumores supratentorial (AstAg)	Infantes (<3años)	Niños(3– 14años)	Adolescentes (4–21 años)	Adultos jóvenes (21–45 años)	Adultos mayores (>45 años)
Transformación	-	-	+	+++	+
Número de alteraciones	-	+	+	++	+++
Ganancia 1q	++	++	++	+	-
Pérdida 16q	++	++	++	-	-
Ganancia del 7q	-	-	-	+	++
Pérdida 10q	+	+	+	++	+++
Genoma estable	++	++	++	-	-
Amplificación EGFR	-	+	+	++	+++
Amplificación PDGFRA	-	++	++	++	+
Pérdida de CDKN2A/ CDKN2B	+	++	++	+++	+++
Alteraciones en la vía de señalización de p53	+++	++	++	++	++
Alteraciones en la vía de señalización de PI3K	+	++	++	++	+++
Alteraciones en la vía de señalización de Rb	+	+	+	++	+++
MUTACIONES					
BRAF V600E	-	+	+	++	+++
IDH1 R132X	-	+	++	+	-
H3F3A K27M	NR	+++	++	+	-
H3F3A G34R/V	NR	+	++	+	-
HIST1H3B K27M	NR	-	-	-	-

Abreviaturas: - bajo, + moderado, ++ alto, +++ muy alto, NR no reportado. Tomado y modificado de Kleihues et al 2000.

IV. Vías de señalización celular alteradas en los Ast

La formación de un tumor, es un proceso complejo en el que interviene la acumulación de daño genético sobre genes que están involucrados en procesos celulares como la proliferación, diferenciación y muerte [29-30]. En este sentido, la vía de MAPK se encuentra alterada en un 88% de los Ast de alto y bajo grado, sin importar la edad del paciente (Fig. 10) [31-32]. Estas alteraciones, ocurren tanto a nivel de receptores de membrana: Receptor del factor de crecimiento epidermal

(EGFR), receptor de crecimiento epidérmico humano (ErbB-2), receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGFR1), como de ligandos y de proteínas específicas que participan río abajo de la vía: neurofibromina 1, B-Raf, homólogo de la fosfatasa y tensina (PTEN), y los miembros H-Ras, K-Ras y N-Ras de la subfamilia de GTPasas pequeñas Ras [31-33].

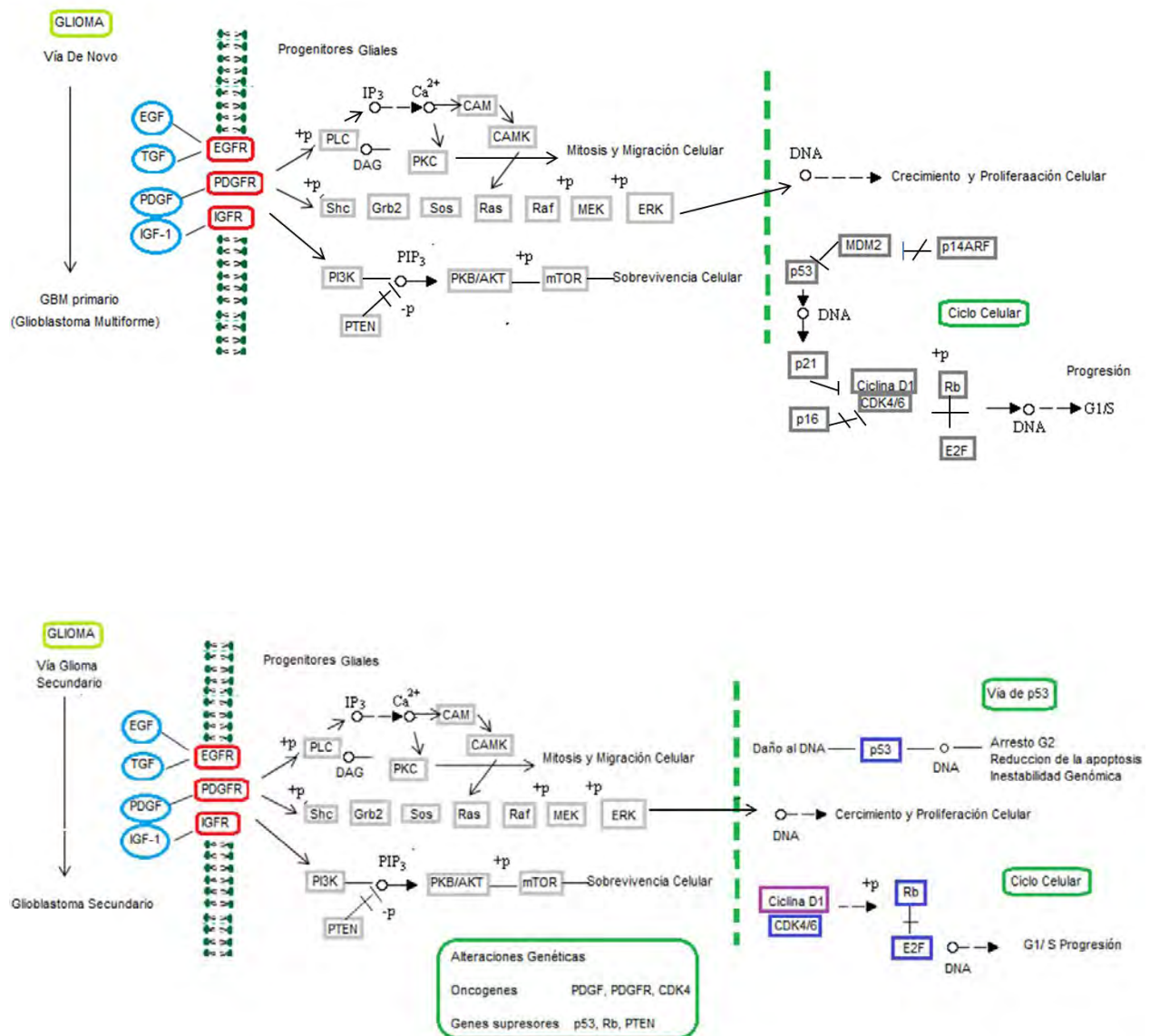


Figura 9. Vía de las MAPK. Principal vía desregulada en los astrocitomas de todos los grados histológicos.

a) Mecanismos moleculares de la vía de las MAPK que están únicamente alterados en los AstP

Como se mencionó anteriormente, los AstP son tumores que se encapsulan, raramente progresan a los grados II-IV y no invaden tejido circundante, lo que los hace ser considerados como tumores de buen pronóstico [9, 32]. Aun cuando se conoce poco a cerca de los mecanismos moleculares y genéticos que median su formación, la vía de señalización de las MAPK se encuentra constitutivamente activada, en la mayoría de los casos, a nivel de las proteínas p21^{ras}-Raf-MEK-ERK [9, 32-33]. En los AstP de origen hereditario, la pérdida de la actividad de NF1 incrementa los niveles de la forma activa de p21^{ras}, promoviendo la proliferación de los astrocitos [9, 12, 17-18]. En el caso de los AstP, de origen esporádicos, el 82% de los casos presentan alteraciones en la vía de las MAPK, en los cuales, la fusión de los genes *KIAA1549-BRAF* es la alteración más frecuente (70% de los casos) [34-35]; importantemente, esta alteración no se presenta en los AstP hereditarios [35-36]. Esta fusión incluye el dominio BRAF cinasa y la carencia del autoinhibidor N-terminal, resultando en una proteína de fusión que tiene la actividad cinasa de BRAF, pero sin región inhibidora. Además de esta fusión, la duplicación de la treonina 599 activa de forma constitutiva a la cinasa B-Raf. Estudios *in vitro*, mostraron que la sobreexpresión de la forma activa de BRAF incrementa la proliferación de astrocitos primarios de ratón, efecto que es bloqueado por el inhibidor de la cinasa sorafenib, el cual es un fármaco ampliamente utilizado como parte del tratamiento de estos tumores de bajo grado [36].

La mutación BRAF (V600E), se encuentra presente en la mayoría de los Ast grado II; sin embargo, en el 9 % de los casos de AstP esta mutación también está presente [37]. Además de la mutación *BRAF* (V600E), en un pequeño porcentaje de AstP esporádicos se han descrito mutaciones en el gen K-Ras, las cuales inducen la activación constitutiva de la vía de las MAPK mediante el mismo mecanismo descrito para los tumores hereditarios con alteraciones en NF1 [37-38].

Similar a lo reportado para BRAF, la duplicación en tándem del cromosoma 3p25 causa la fusión de los genes SRGAP3-RAF1, generando como resultado una proteína fusionada con actividad constitutiva de Raf-1 cinasa [39].

b) Mecanismos moleculares involucrados en Ast de Grado II, III y IV.

Se han descrito múltiples mecanismos y alteraciones moleculares involucradas en la formación de Ast grado II, III y IV, las cuales están implicadas fundamentalmente en el mantenimiento, progresión e invasión de las células que conforman al tumor. Sin embargo antes de comenzar a describir los mecanismos que median estos procesos, es importante mencionar que estas alteraciones se encuentran presentes a lo largo de los grados histológicos II, III y IV, apoyando de esta manera la teoría de que los AstP (I) son entidades muy distintas a los demás grados histológicos. Asimismo es importante mencionar que los GBM pueden desarrollarse de dos formas distintas, es decir, pueden generarse como un tumor sin antecedentes de un lesión previa, en cuyo caso se denomina GBM primario o de “novo” (GBM1), o generarse a partir de un AstBg (a partir de un tumor grado II) que va sufriendo transformación anaplásica e ir evolucionando hasta generar un GBM, en cuyo caso se denomina GBM secundario (GBM2). Los mecanismos moleculares que están involucrados en ambos casos son distintos, siendo la desregulación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) la alteración más común para GBM1 mientras que para GBM2 las mutaciones en el gen p53 corresponden a la alteración más frecuente reportada. Estos datos sugieren que tanto el GBM1 como el GBM2 conforman dos entidades diferentes en cuanto a su origen (Fig.11). Es importante mencionar que además de las mutaciones en EGFR y p53, se han descrito diversas alteraciones genéticas que afectan a diversas vías de señalización, muchas de las cuales son críticas para el desarrollo del órgano, regulación de la apoptosis, detención del ciclo celular, proliferación y supervivencia [9, 20 y 40]

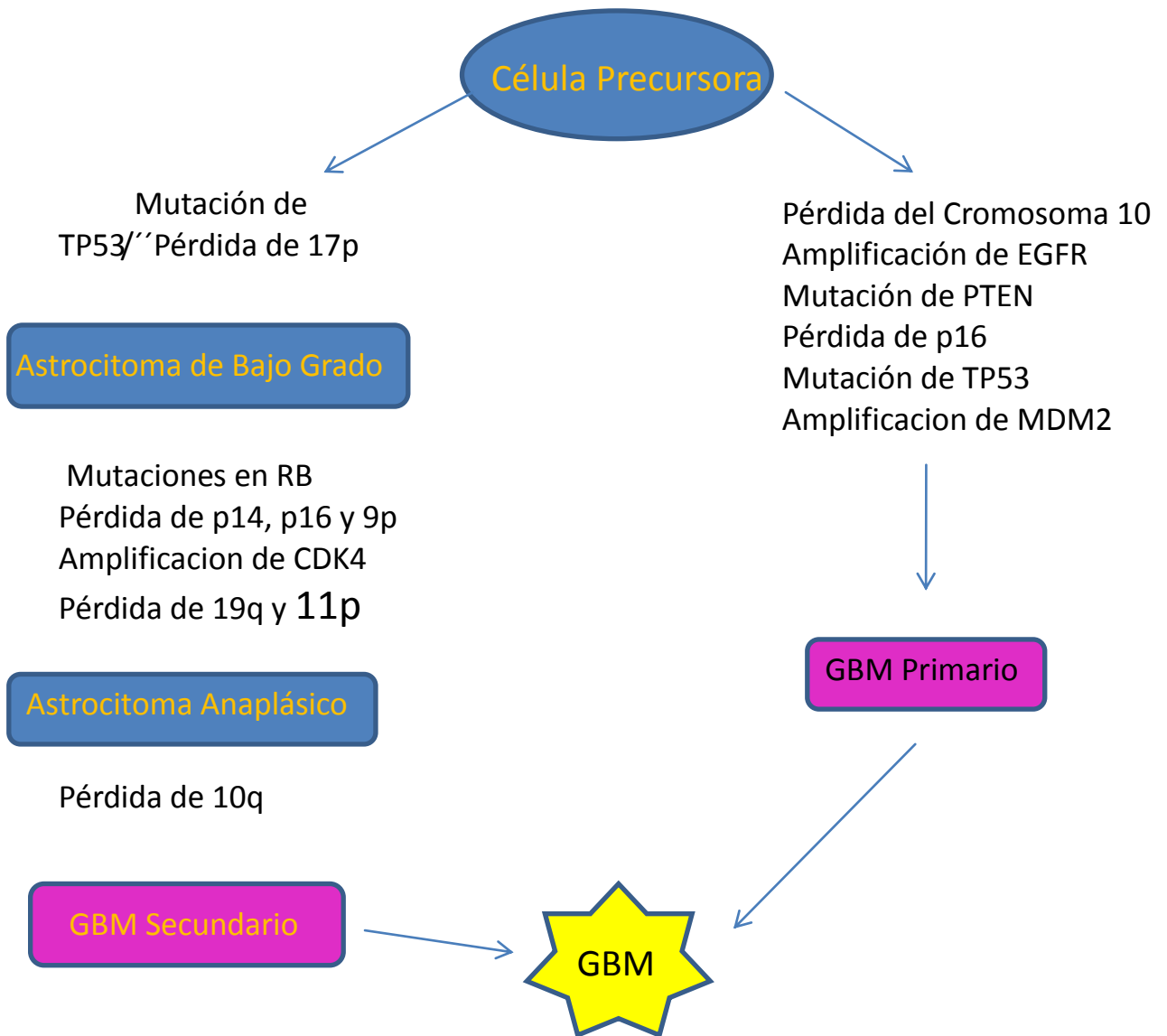


Figura.11. Mecanismos moleculares involucrados en la formación y progresión de los GBM1 y GBM2. Modificado de Kleihues et al 2000.

b) Mecanismos moleculares que están involucrados en la patogénesis de los GBM.

i) Vía de señalización Sonic Hedgehog (SHH)

La vía de señalización de SHH, como ya es conocido, es fundamental durante la embriogénesis para el desarrollo de múltiples órganos. Durante este proceso, esta vía controla eventos específicos como proliferación, supervivencia celular y

especificación de los distintos tipos celulares. La activación de la vía se produce cuando Hedgehog (Hh) se une físicamente con su receptor Patch (Ptc) el cual activa a su vez a Smoothed (Smo). Una vez activado Ptc inicia su internalización liberando a Smo, el cual inicia la cascada de transducción de la señal que culmina con la modulación de la actividad de los factores de transcripción Gli (homólogo del oncogén asociado a glioma 1). En ausencia de Hh, Ptc reprime la actividad de Smo lo que se traduce en la fosforilación de Gli1 y su subsecuente procesamiento proteolítico. Las proteínas Gli son factores de transcripción multifuncionales que pueden actuar como activadores o represores de la transcripción. Estudios genéticos y bioquímicos indican que Gli1 funciona como un activador transcripcional, el cual una vez activado, se transloca al núcleo acumulándose y promoviendo la transcripción de sus genes diana, que incluyen a los factores angiogénicos angiopoietin-1 y angiopoietin-2, así como las ciclinas D1 y B1, promoviendo así mismo la represión de genes antiapoptóticos como Fas. Por su parte, Gli2 y Gli3 pueden actuar como activadores o represores según el contexto o las necesidades requeridas por la célula. La presencia de Shh evita que Gli3 sea procesada a una forma corta de 83 kD, procesamiento que le otorga la capacidad de ser un potente represor transcripcional de Gli1. Alteraciones en la vía de Shh ha sido reportada en tumores cerebrales como el meduloblastomas y más recientemente en los Ast grado II, III y principalmente grado IV. La alteración más frecuente de esta vía presente en GBM es la pérdida de la actividad de Ptc por mutaciones. Como se mencionó Ptc, reprime la actividad de Smo, por lo que la pérdida de su actividad causado por mutaciones, permitirá la activación de la vía independiente de la presencia del ligando y por consiguiente permitiendo la transcripción de los genes ya mencionados, promoviendo la progresión tumoral (Fig. 7) [9 y 41]. Otra de las alteraciones frecuentes en GBM corresponde a eventos de empalme alternativo en una variante de GLI1 que promueve la invasividad y la migración de las células de los GBM. Durante la transcripción de GLI1 se ha reportado la generación de una isoforma llamada tGLI, la cual es producida por medio de empalme alternativo y solo se ha encontrado presente en GBM. La formación de esta isoforma se genera por la pérdida de 123 pares de

bases dentro del marco de lectura del codón 41, lo que origina una isoforma trunca. Un aspecto importante de esta variante es que conserva todos los dominios funcionales conocidos de GLI1, por lo que posee la capacidad de activar todos los genes blanco de GLI1, sin embargo, esta variante no ha sido detectada en células normales, mientras que se encuentra altamente expresada en célula de GBM. Por otra parte, se ha descrito que esta variante presenta la capacidad de activar a CD24 a diferencia de GLI1, el cual es un gen asociado con invasión. Con base en lo anterior se ha sugerido que la expresión de CD24 mediada por tGLI1 es indispensable para la migración e invasión de las células tumorales de los GBM [42-43].

ii) Vía de señalización e Notch.

La vía de señalización de NOTCH inicia cuando los ligandos transmembranales se unen a los receptores NOTCH, que se encuentran localizados en una célula adyacente, provocando que la γ -secretasa medie la liberación proteolítica de un dominio intracelular de NOTCH denominado NICD. Posteriormente NICD se translocará al núcleo donde interactúa con el co-factor transcripcional CBF1 activando blancos específicos como los genes HES y HEY, encargados de la modulación y diferenciación neuronal y glial. En los vertebrados se han identificado por lo menos cuatro receptores NOTCH, cinco ligandos JAG1, JAG2, DLL1, DLL3, DLL4 así como múltiples efectores como HES1-6, HEY1, 2. Tanto los receptores, ligandos y efectores de esta vía se encuentran alterados en los distintos tipos de neoplasias, siendo en específico Notch-1, Delta-like1 y Jagged-1 los elementos críticos alterados por mutaciones en Ast y meduloblastomas. Esta vía es fundamental en la patogénesis de los GBM, ya que se ha observado que la actividad incrementada de NOTCH promueve el crecimiento tumoral aumentando de forma proporcional el número de células CD133+, por consiguiente, si esta vía es bloqueada, las células tumorales que expresan CD133 ira en decremento (Fig. 7) [9, 44-45].

iii) Vía de señalización Wingless e Int (Wnt)

Esta vía es fundamental en el desarrollo embrionario normal así como en diversos tipos de cáncer en los que se ha visto implicada como colon, mama, próstata, ovario y algunos tumores cerebrales como el meduloblastomas y GBM. Su activación se lleva a cabo cuando el ligando de Wnt se une a su receptor denominado frizzled (FZD) junto con sus co-receptores LRP5 or LRP6. Una vez unidos, este complejo promueve la activación y el reclutamiento de la fosfoproteína Dishevelled (Dvl). Dvl recluta a su vez a la proteína Axin a la membrana plasmática, permitiendo la transcripción y acumulación de β -catenina en el núcleo. β -catenina es indispensable ya que interactúa con los factores de transcripción Tcf/Lef que inducen la expresión de genes como c-Myc, N-Myc, c-jun y la ciclina D1, los cuales, como ya se había mencionado, inducen proliferación, promoviendo un estado indiferenciado de las células. Aunque esta vía no había sido muy estudiada para los Ast, estudios recientes reportaron la sobre expresión de mRNA de Dvl y por consiguiente el aumento de β -catenina en astrocitomas de diversos grados (II, III y IV), correlacionando el grado del tumor con el aumentando de la expresión de Dvl. Por otra parte, debemos mencionar que WIF-1 agonista endógeno de Wnt, se ha encontrado regulado a la baja en AstAg en específico GBM, lo cual podría explicar la acumulación de β -catenina en el núcleo que ha sido reportada en este tipo de tumores, sin que aparentemente algún componente de la vía se encuentre alterado. En un estudio reciente se demostró que tanto la sobreexpresión del mRNA de WIF-1, como de la proteína, correlaciona directamente con el grado de malignidad en astrocitomas. Sugiriendo por lo tanto, que WIF-1, frecuentemente se encuentra regulado a la baja en astrocitomas, especialmente en los de alto grado. Uno de los mecanismos propuestos para explicar la regulación a la baja de WIF-1 es la hipermetilación del promotor del gen WIF-1, la cual ha sido reportado en cerca del 54.29 % de los GBM, sugiriendo que este podría ser un evento temprano en la desregulación de esta vía de esta vía (Fig. 7) [46-48].

iv) Vía de Señalización de las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMPs).

La vía de señalización de las BMPs, ha surgido como importante en la patogénesis de los GBM debido a que son factores cruciales que regulan la proliferación y la apoptosis en las NSCs, promoviendo su diferenciación hacia neuronas y células de la glia. Las BMPs llevan a cabo su función a través de la unión con receptores tipo cinasa, los cuales son fosforilados por Smad 1/5/8, permite que esta proteína se una al co-activador Smad4, el cual se transloca al núcleo y regula la transcripción de factores específicos. El mecanismo de pro-diferenciación que modulan las BMPs se ha encontrado conservado en las CSCs. Es decir, cuando las CSCs son promovidas en ensayos in vitro a expresar las BMPs, la proliferación de estas células se inhibe promoviendo su diferenciación hacia astroglia y neuronas. Sugiriendo que la activación esta vía podría representar un blanco terapéutico importante en GBM (Fig. 7) [9,49-51].

v) Receptores de Tipo Tirosina Cinasa (RTC). Alteraciones en el gen EGFR

La familia de los RTC media los efectos de múltiples factores de crecimiento, dentro de los cuales el receptor para el factor de crecimiento epidermal (EGFR) es uno de los mejores caracterizados en Ast. En AstAg, en específico GBM, es común encontrar a EGFR sobre-expresado. Se ha descrito que esta sobre-expresión se genera como resultado de las distintas variantes del mRNA que son generadas durante el proceso de empalme alternativo que se lleva a cabo durante la regulación de este gen, dando lugar a diferentes variantes de la proteína; la más común es la variante EGFRvIII. Esta variante se caracteriza por presentar una pérdida de 801 pares de bases, que abarca desde los exones 2 al 7 y una fusión del resto de los exones, dando lugar a una amplificación en tándem del gen. De esta manera se genera un receptor truncado, el cual funciona de manera constitutiva independientemente del ligando; como resultado la célula comienza a dividirse de forma incontrolada. Es importante mencionar que la polisomía de cromosoma 7, una de las alteraciones más frecuentes en los GBM, puede provocar la sobreexpresión de este gen (Fig. 7) [9, 40, 51-53].

Otra vía activada por los RTC y que se encuentra alterada en los GBM es la vía específica de AKT/ fosfoinositido 3-hidroxilasa. Se ha comprobado que la activación descontrolada de esta ruta contribuye a la transformación celular y a la progresión tumoral en diversos tipos de tumores como los de Ast, mama, ovario y carcinomas renales. Esta ruta desempeña un papel fundamental en la progresión del ciclo celular ya que disminuye la apoptosis e incrementan la capacidad metastásica de las células tumorales. La activación de PI3K puede ocurrir a través de Ras o directamente por algunos receptores tirosina quinasa, que responden a varios factores de crecimiento o citocinas como IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, factor de crecimiento tipo insulina (IGF), factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factores de crecimiento de insulina (IGF-1 e IGF-2) y el factor estimulador de colonias (CSF). La activación de estos receptores con actividad tipo tirosina cinasas conduce a la autofosforilación de la porción intracelular de los mismos, sirviendo como punto de arranque para otras proteínas intracelulares. La activación de la ruta PI3K/Akt inicia con el reclutamiento de PI3K, el cual a su vez recluta a la serina/treonina cinasa Akt (c-Akt, también llamada proteína-quinasa B, PKB) a la membrana plasmática. Una vez que Akt se localiza en la membrana, será fosforilado por una serina/treonina cinasa, la cinasa 1, dependiente de fosfatidil inositol-3 (PKD1), resultando en la activación de Akt. Esta activación controlará la supervivencia celular a través de la fosforilación de dianas que median este proceso, resultando en un incremento de la supervivencia celular y proliferación. Las dianas que activa Akt han sido clasificadas en tres grupos distintos: proteínas apoptóticas, factores de transcripción y proteína-cinasas. Una de las funciones específicas de Akt es fosforilar a BAD y caspasa 9, dos proteínas apoptóticas, inhibiendo su actividad y promoviendo por tanto la supervivencia celular. Akt activa de igual manera a los factores de transcripción NF- κ B, HIF-1 α y CREB, lo que tiene como consecuencia un incremento en la transcripción de genes anti-apoptóticos. Sin embargo cabe destacar que estos factores transcripcionales pueden ser tanto activados como inhibidos tras la fosforilación de Akt. NF- κ B como ya es conocido, es el mediador central de la respuesta inmune, de la respuesta inflamatoria y la respuesta de

supervivencia celular. NF- κ B es activado por Akt a través de la fosforilación de la cinasa IKK α). Tras su activación, IKK fosforila a I κ B, marcándolo para la ubiquitinación y degradación en el proteosoma. La traslocación al núcleo ocurre por la exposición de sitios de localización nuclear de NF- κ B, la cual una vez dentro del núcleo, induce la expresión de genes anti-apoptóticos. Los factores de crecimiento como EGF pueden activar a NF- κ B y proteger de esta manera contra la apoptosis. Por el contrario, la inhibición de NF- κ B sensibiliza a la célula a una amplia variedad de estímulos pro-apoptóticos. Como se mencionó Akt también puede fosforilar a CREB activándola transcripcionalmente y sobre-expresando genes antiapoptóticos como Mcl-1 [9, 53].

También se ha reportado la inactivación de factores de transcripción como FOXO (familia Forkhead) y p53 por Akt, ya sea directamente por la fosforilación de proteínas FOXO o por fosforilación y activación de MDM2, regulador negativo de p53. En ambos casos, la expresión de genes proapoptóticos disminuye causando un aumento de la supervivencia celular. Otro blanco de regulación de Akt es mTOR (mammalian Target of Rapamycin). La regulación de mTOR ocurre a través de la inactivación del complejo de esclerosis tuberosa (TSC). Dicho complejo es un heterodímero que consiste en tuberina (TSC2) no fosforilada y hamartina (TSC1), que actúa como proteína GTPasa activadora (GAP), inhibiendo proteínas G pequeñas como G-Rheb. La fosforilación de TSC2, por Akt interrumpe el complejo, permitiendo a la proteína Rheb, unirse a ATP y pasar desde el estado GDP inactivo al estado activo. Rheb, unido a GTP, activa a mTOR. La familia de proteínas TOR serina/treonina quinasa, tiene funciones pleiotrópicas, participando en la regulación del inicio de la transcripción del mRNA y la traducción de proteína en respuesta a concentraciones intracelulares de aminoácidos y otros nutrientes esenciales. Interviene en la organización del citoesqueleto, en el tráfico de membrana, degradación de proteínas, señalización de PKC y biogénesis del ribosoma. Se ha comprobado que la inhibición farmacológica de AKT promueve la apoptosis de células CSC, mostrando ser sumamente importante para el mantenimiento y progresión de estas células en los GBM. Dentro de esta vía, se

ha propuesto, que PTEN puede desfosforilar a PIP3, actuando de esta manera como regulador de la ruta de señalización de PI3K. PTEN tiene un dominio proteína-tirosina fosfatasa y un dominio de homología a la tensina, lo que sugiere que PTEN suprime el crecimiento celular tumoral ejerciendo un efecto antagonista al de las proteínas tirosina quinasas, regulando la invasión de las células tumorales y la metástasis a través de las interacciones con las adhesiones focales. Dado que la pérdida en homocigosis de PTEN es bastante rara, el mecanismo que se postula para su inactivación es la metilación de su promotor. Las mutaciones de PTEN son más frecuentes en GBM que en AstA, por lo que se sugiere que dichas mutaciones constituyen una alteración importante en el desarrollo y progresión de los GBM, pudiendo representar un paso molecular necesario en la transformación de gliomas de bajo a alto grado. Las mutaciones de PTEN son más frecuentes en GBM1 (25%) pero no exclusivas, ya que algunos autores han identificado mutaciones de PTEN en GBM2 (4%). Se han identificado alrededor de 78 mutaciones diferentes de PTEN involucradas en GBM. Estas mutaciones se localizan frecuentemente en los exones 1-6 de PTEN, región que presenta homología con ciertos dominios de las fosfatasas (Fig7). [9, 33 y 53].

FGFR-1 es un receptor de tipo tirosina-quinasa que pertenece a una familia conformada por cuatro genes cuyos miembros son diferencialmente activados por uno o más de los nueve ligandos pertenecientes a los factores de crecimiento fibroblásticos. Los FGFRs son indispensables en distintos eventos celulares como la formación de las extremidades, la organización de los queratinocitos y el desarrollo del cerebro. La gran diversidad de funciones que desempeñan se debe, en parte, al procesamiento alternativo de los transcritos primarios que codifican para los receptores y sus ligandos, alterando diferencialmente la afinidad de los receptores por sus ligandos, la especificidad por estos, su asociación a la membrana y su actividad de tipo tirosina quinasa. Dentro de la secuencia de este gen se ha comprobado que el exón α es indispensable para determinar la afinidad por sus ligandos. En Ast se ha observado una variante denominada FGFR- β , producto de empalme alternativo que carece del exón α . Esta variante del receptor

parece estar estrictamente relacionada con el grado de malignidad de las células gliales, ya que al ser eliminado el exón α , se genera como resultado una alta afinidad por ligandos específicos (factores de crecimiento), promoviendo el crecimiento y progresión del tumor [54-55].

vi) Factores de crecimiento vasculares endoteliales y Factores angiogénicos.

La activación no regulada de la angiogénesis puede ser el primer paso en la formación de una neoplasia maligna. Es por esta razón que el crecimiento celular requiere del balance entre los factores angiogénicos y antiangiogénicos que permitan o repriman la remodelación de los vasos sanguíneos. Estas señales son activadas por medio de factores que interactúan con su ligando en la superficie celular. Uno de los principales estímulos que las células pueden recibir para la síntesis de factores angiogénicos es la hipoxia, que induce la síntesis del factor de crecimiento endotelial (VEGF). Se considera que el VEGF es el mediador más importante en la neo-vascularización de GBM. VEGF tiene tres receptores (VEGFR-1,2,3), dos de ellos, el VEGFR-1 y el VEGFR-3 sobreexpresados exclusivamente en las células endoteliales de AstA. Hay otros factores de crecimiento que también juegan un papel importante en la patogénesis de los GBM, cada uno de los cuales interactúan con proteínas tipo tirosín-cinasas para inducir dimerización y autofosforilación, promoviendo la expresión de sitios de unión con los que interactúan las proteínas de señal. El complejo así formado activa una cascada de señales promoviendo la transcripción, la cual provocará un aumento de la división celular debido a la activación de genes antiapoptóticos y genes que intervienen en la división celular. Los factores de crecimiento que están involucrados en la génesis de un glioma hasta ahora reportados son: EGF (Factor de crecimiento epidérmico) y su receptor EGFR, los cuales median la proliferación celular, promueven la resistencia a fármacos, aumentando el tamaño del tumor, factor de crecimiento fibroblástico (FGF), el cual promueve de igual manera la proliferación celular presentando un efecto sinérgico con el factor de crecimiento

endotelial vascular (VEGF) y el factor de crecimiento hepatocítico (HGF) estimulando la angiogénesis. Al igual que EGFR, también se ha observado una sobre expresión de FGF y sus receptores tanto en AstA como GBM. VEGF junto con el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF) median la angiogénesis, promoviendo la proteólisis de las proteínas de la matriz extracelular, promoviendo asimismo, la transcripción de factores angiogénicos. Estos mecanismos raramente se ha reportado para los AstBg (grado II), indicando un mal pronóstico para el paciente [9, 56-58].

vii) Alteraciones de la vía TP53/MDM2/P14arf

La vía genética TP53/MDM2/P14arf está implicada en respuesta a estrés celular y por lo tanto en la activación de genes relacionados con el control del ciclo celular, reparación de DNA y apoptosis. Esta vía se encuentra alterada con frecuencia en los GBM, cabe destacar no es exclusiva ya que los AstBg también presentan alteración de esta vía aunque con una frecuencia muy baja [9]. El gen TP53 codifica para la proteína p53 que actúa como factor de transcripción uniéndose a los promotores de genes implicados en la reparación de DNA. La proteína MDM2, en condiciones normales, es represor de p53, es decir, mantiene inactivada a p53, sin embargo, cuando la célula entra en división (fase G1-S), MDM2 libera a p53. Una vez liberado, p53 promueve la transcripción de otros genes que están implicados en reparación de DNA y/o apoptosis. En condiciones normales p53 se une a los promotores que activan genes implicados en la reparación del DNA para corregir los daños detectados. p53 activo también induce ciertas proteínas, como GADD45 (por growth arrest and DNA damage) que colaboran en la reparación del DNA. De igual forma, puede activar algunas proteínas pro-apoptosis, como BAX o PUMA, si el material genético no puede ser reparado. Si la célula posee mutaciones en p53 los daños producidos en el DNA no podrán ser reparados provocando un aumento de la división celular con una disminución de la apoptosis. La proteína p14arf, es fundamental para el control de la activación de esta vía ya que es represor de MDM2 cuando no está unida a p53. Si p14arf no ejerza su

correcta función, se genera un exceso de MDM2 libre y como consecuencia p53 estará reprimido, provocando una mayor acumulación de daño en el DNA. Aun cuando la pérdida homocigótica es el mecanismo más frecuente de alteración para p14arf, también se ha reportado la inactivación por hipermetilación del promotor del gen que lo codifica. Con base en lo anterior, podemos decir que la alteración de esta vía en cualquier nivel provocará la desregulación del ciclo celular, promoviendo la formación de tumores. Alrededor del 65% de GBM2 presentan mutaciones en TP53; como se mencionó, la alteración de esta vía también se presenta en AstA y en menor frecuencia en los AstBg en específico en los Ast grado II, lo cual sugiere que podría ser un evento temprano en la transformación neoplásica. (Fig. 7) [9, 59-60].

viii) Alteraciones de la vía p16ink4/RB1/CDK4

Otra de las vías afectadas en GBM es p16ink4/ RB1/CDK4. RB1 (gen del retinoblastoma) localizado en el cromosoma 13q14.2, el cual codifica para la proteína rb1, la cual controla la transición G1—S en el ciclo celular. Cuando rb1 no está fosforilado secuestra y reprime la función de E2F, el cual es un factor de transcripción que activa genes implicados en la transición G1—S del ciclo celular cuando no está unido a rb1. La fosforilación de rb1 es producida por CDK4 (ciclina dependiente de la cinasa 4) y la proteína encargada de inhibir a esta ciclina es p16ink4 (inhibidor de la ciclina dependiente de la quinasa 4). La pérdida en homocigosis de p16ink4, y/o la amplificación de CDK4 provoca que rb1 esté continuamente fosforilada y no pueda unirse a E2F; como resultado se produce una división celular incontrolada. Estas dos alteraciones han sido reportadas en glioblastomas así como también la metilación del promotor de RB1, aunque esta metilación es más frecuente en GBM2 que en GBM1. En AstBg, hasta el momento no existen suficientes datos que nos demuestren que existe metilación del promotor de RB1. Mientras que en AstA es bastante infrecuente la metilación de dicho promotor, por lo que se cree que esta alteración sería un evento tardío en la progresión del Ast a GBM2 [9, 61-62].

Otro factor de transcripción que es activado mediante la vía p16ink4/ RB1/CDK), es c-Myc. Las células que presentan una proliferación acelerada expresan niveles altos de c-Myc, pero cuando estas células inician su diferenciación, se produce un descenso importante de los niveles de c-Myc. Además de estas funciones que debemos considerar de regulación, c-Myc también modula los procesos de apoptosis. Cuando c-Myc forma un heterodímero con la proteína MAX se unen a los promotores de genes blanco activando su transcripción, mientras que si el dímero se forma entre c-Myc y la proteína MAD impide la transcripción de los genes diana al competir con los lugares de unión del heterodímero. c-Myc también ha sido asociado con eventos epigenéticos como remodelación de la cromatina de los promotores de sus genes blanco. c-Myc, es una proteína (oncoproteína) crítica para la transición de células stem hacia la malignidad celular. Esta oncoproteína ha sido ampliamente estudiada por su importancia en la proliferación tanto de células normales como tumorales. A pesar de que c-Myc está involucrado en distintas neoplasias, existe evidencia que sugiere su participación en la patogénesis de los GBM. Aun cuando no se conoce mucho acerca del mecanismo molecular por medio del cual interacciona en los GBM, se ha propuesto que podría estar mediado por cambios genéticos como el incremento en el receptor del factor de crecimiento plaquetario (PDGF), comúnmente observado durante las etapas iniciales de la formación de los astrocitomas. Recientemente, se ha podido transformar a células diferenciadas hacia stem pluripotentes mediante la introducción de factores de transcripción que induce a c-Myc, Es importante destacar que el nivel de expresión de c-Myc concuerda con el grado de malignidad en los gliomas (Fig. 7) [9, 63-64].

ix) Otros Factores de transcripción involucrados en la patogénesis de los GBM.

Octamer 4 (Oct 4). Junto con Sox2 y Nanog, son factores de transcripción que forman el componente central para controlar el balance entre la autor-renovación y

la diferenciación en las células embrionarias stem. Oct4 se ha encontrado sobreexpresado en muchos AstA y GBM tanto de muestras de pacientes como en líneas celulares, correlacionando con el grado del tumor. La expresión de Oct4 aumenta por lo tanto la expresión de células CD133+. Lo cual sugieren que Oct4 podría estar inhibiendo mediante mecanismos aun no muy claros la diferenciación de las CSC y contribuir a su mantenimiento [9, 65-66].

El factor de transcripción de linaje oligodendrocito-2 (Olig2) se expresa casi exclusivamente en el SNC. Durante el desarrollo cerebral, Olig2 se expresa en las células progenitoras que dan origen a los oligodendrocitos y ciertas líneas neuronales. Análisis patológicos revelaron que Olig2 se encuentra sobreexpresado en casi en todos los GBM de adultos y es requerida para la iniciación tumoral. Funcionalmente, Olig2 es requerido tanto en las células NSCs como en las CSCs, ya que Olig2 sustenta la replicación de los progenitores neuronales mediante la supresión de p21 [9, 66].

Por su parte Bmi-1, controlar la diferenciación celular tanto de células normales como tumorales. Se ha visto implicado en la determinación o destino celular en muchos tejidos, siendo un regulador positivo de la auto-renovación de las NSC. Bmi-1 es también un conocido oncogen que se encuentra sobreexpresado en distintos tipos de cáncer incluyendo los GBM [9, 65-66].

En el caso de los factores de transcripción descritos cabe destacar que aún faltan estudios para dilucidar tanto los mecanismos por medio de los cuales se alteran estos factores como la importancia real que desempeñan en los astrocitomas de todos los grados histológicos.

V. Otros mecanismos asociados a la patogénesis de GBM.

El glutamato es considerado el principal neurotransmisor excitador en el SNC, desempeñando un papel fisiológico fundamental en el desarrollo del sistema nervioso, la migración celular, la diferenciación y la muerte neuronal. Sin embargo, también, es un potente neurotóxico, puesto que una vez que activa a sus

receptores, debe ser eliminado del espacio sináptico ya que su acumulación provoca daño neuronal. El mecanismo para la eliminación del glutamato del espacio sináptico es la recaptura de este mediante proteínas específicas llamadas transportadores, las cuales utilizan los gradientes iónicos de sodio y potasio para transportar al glutamato desde el espacio sináptico hacia el interior de las neuronas y las células gliales [67-70]. Cabe destacar que la liberación de glutamato puede activar tanto receptores de tipo N-metil-D-aspartato (NMDA), como amino-3-ácido-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico (AMPA) o receptores de glutamato acoplados a proteína G. En los gliomas, los receptores AMPA parecen llevar a cabo un papel fundamental, al mediar efectos biológicos de glutamato. Estos receptores están conformados por heterodímeros complejos compuestos a su vez por cuatro subunidades homólogas llamadas GluR1-4, cada una de las cuales pueden combinarse de distintas maneras formando receptores con propiedades únicas. Estudios recientes han demostrado que la mayoría de las células que conforman a los gliomas carecen de la subunidad GluR2. Esta subunidad es fundamental para permitir la permeabilidad al calcio, por lo que la carencia de esta, provoca un bloqueo de la entrada de calcio que promueve un aumento en la migración celular (Fig.11) [67-73].

La pérdida del transportador EAAT2 también llamado GLT-1 (transportador de glutamato-1) y la disminución de la captura del mismo han sido ampliamente reportada y asociada a la transformación neoplásica en Ast de todos los grados histológicos. Estudios realizados en tejido normal de cerebro, han descrito una compleja regulación del gen que codifica para EAAT2, la cual incluye diferentes variantes producto de mecanismos de regulación post-transcripcional como empalme alternativo del transcrito primario. Cada una de estas variantes es expresada en regiones específicas del SNC. Sin embargo, al estudiar estos mecanismos de regulación en muestras de tumores astrocíticos, se comprobó que existe una reducción en la expresión de las variantes funcionales de EAAT2. Esta reducción es producida por eventos de empalme alternativo específicamente de la secuencia 5' reguladora del RNA de EAAT2. Esta pérdida funcional de las

variantes ha sido sugerida como mediador de la transformación neoplásica de las células astrocíticas. Estos resultados fortalecen la hipótesis que sugiere que los mecanismos de regulación como el empalme alternativo son mecanismos moleculares sumamente importantes durante la progresión de una neoplasia. La importancia funcional del empalme alternativo de EAAT2 en los astrocitomas así como el daño causado por el incremento del glutamato aún no ha sido evaluado con detalle. Sin embargo, es claro que la regulación del transportador de glutamato está relacionada con algunas propiedades que adquieren las células tumorales en los Ast como la necrosis [67-73].

a) Metilación de Promotores

La metilación del DNA es uno de los procesos epigenéticos más comunes en tumores de distintos tipos, promoviendo la represión transcripcional de genes específicos. En este sentido, podemos mencionar algunos trabajos que han demostrado la importancia de este tipo de procesos en los Ast. Recientemente, se estudió el perfil global de promotores alterados por metilación mediante las bases de datos The Cancer Genome Atlas (TCGA) en GBM. Este trabajo denostó, la existencia de grupos de tumores que presentan patrones de hipermetilación específicos en un gran número de loci, confirmando la existencia de islas de metilación de los gliomas o CpG específicas de GBM. Este estudio también reveló que la mayoría de los tumores que presentan estas CpG presentan mutaciones somáticas de la enzima isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH-1) siendo pacientes jóvenes en su mayoría [74-76].

La familia de las proteínas de dominio de unión a metilo (MBD) como su nombre lo indica, se caracteriza por presentar un dominio de unión a metil-CpG. Entre sus miembros podemos mencionar a las proteínas MECP2 (proteína obligatoria metílica 2), MBD1, MBD2, MBD3 y MBD4, cada una de las cuales, excepto la MBD3, se unen específicamente al ADN metilado. Asimismo, MECP2, MBD1 y MBD2 pueden reprimir la transcripción de promotores de genes metilados. Debido a la función tan importante que llevan a cabo las MBD en la célula, su participación

se ha estudiado ampliamente en los Ast. Hasta el momento se ha podido corroborar la sobre expresión de MBD3 y MBD4 en la mayor en AstA y GBM; sin embargo, aún faltan estudios para profundizar en los mecanismos específicos que modulan estas proteínas en los Ast de alto grado [74-76].

Asimismo, se ha comprobado que en Ast los promotores de la Ciclina D2 y el promotor de PTCH1 están metilados hasta en un 63% en cultivos celulares y en un 32% de las biopsias estudiadas. Estos resultados son muy importantes ya que demuestran la existencia de mecanismos de regulación de la vía de Sonic Hedgehog (SHH) muy finos y distintos en Ast comparado con los que se generan en meduloblastomas [74-76].

Por otra parte, estudios recientes indican que las alteraciones epigenéticas más frecuentes reportadas en Ast por hipermetilación de sus promotores corresponden a RASSF1A y MGMT. La hipermetilación del gen que codifica para la proteína metilguanina metil transferasa (MGMT), cuya función es la reparación del genoma mediante la eliminación de grupos alquilo, se ha reportado en cerca del 75-80% de los Ast de bajo grado y en GBM2 [77-78]. Adicionalmente, los genes de la familia RASSF (familia de genes con dominio asociado a Ras), se han encontrado alterados en distintos tipos de cáncer, reportándose en específico la pérdida de RASS10 en Ast, generada por la hipermetilación del promotor de este gen. Se ha reportado que esta hipermetilación ocurre en cerca del 92% de los Ast grado II y III, y en un 67% de los GBM. Recientemente se demostró que RASSF10 en específico en Ast, puede actuar como un gen supresor de tumores y que la frecuente hipermetilación de su promotor podría ser considerado como un posible marcador pronostico en Ast [74-78].

Como se mencionó, la proteína p14arf, es indispensable durante el ciclo celular ya que actúa como represor de MDM2 el cual es a su vez represor de p53. Si p14arf no ejerza su correcta función, se genera un exceso de MDM2 libre y como consecuencia p53 será reprimido por MDM2 en mayor nivel, provocando la acumulación de daño en el DNA. Por lo tanto, las alteraciones que se generen en

la vía de p53, en cualquier nivel, provocará la desregulación del ciclo celular y como consecuencia las células serán propensas a formar tumores. Aun cuando la pérdida homocigótica es el mecanismo más frecuente de alteración para p14ARF, la inactivación por hipermetilación de su promotor ha sido reportada en un 39.4 % de los pacientes con Ast de alto grado [74-75 y 79].

Por último, otro promotor que se ha encontrado metilado y que es de gran importancia en los Ast es el factor de inhibición de la vía de señalización WNT (wingless) denominado WIF-1 (factor-1 inhibidor de wnt). WIF-1 actúa como un antagonista de WNT, pero la hipermetilación del promotor del gen de WIF-1, la cual ha sido detectada en un 54.29% de los tumores estudiados, promueve una baja en la expresión de WIF-1, permitiendo la activación constante de la vía e influyendo directamente en el desarrollo de tumores astrocíticos. Es importante destacar que se ha observado tanto la regulación a la baja tanto del mRNA como de la proteína WIF-1 en los Ast, incrementando de manera proporcional con el grado del tumor [80].

La pérdida de función de estos genes debido a la metilación de sus promotores, como se ha demostrado a lo largo de varios años de investigaciones intensas, es de gran importancia en la etiología de los Ast.

b) MicroRNAs descritos en GBM.

Los microRNAs son reguladores endógenos no codificantes que desempeñan funciones muy importantes en procesos como proliferación celular, apoptosis, regulación del ciclo celular, invasión y angiogénesis, tanto en células normales como cancerosas. Se ha propuesto que estos reguladores son uno de los mecanismos claves en la patogénesis de los astrocitomas de todos los grados histológicos. Un ejemplo de los microRNAs que se encuentran involucrados en los gliomas es miR-21. Este microRNA se encuentra sobre expresado en astrocitomas de grado II, III y IV, asociándose con defectos tanto en las vías de apoptosis como en las vías de señalización de p53 y TGF- β . Los blancos directos de miR-21 son p63 (un homólogo de p53), los activadores de p53, TOPORS (proteína de

interacción con topoisomerasas), TP53BP2 (gene codificante para un miembro de la familia de ASPP (proteínas de apoptosis), que estimula a p53, DAXX (proteínas asociadas a dominio de muerte) y HNRNPK (Ribonucleoproteína nuclear heterogénea K) lo cuales pueden regular los niveles de p53 interfiriendo con MDM2 o actuando como co-factor transcripcional de p53, generando la transactivación de genes que inducen apoptosis y arresto del crecimiento. Al modular los blancos antes mencionados, miR-21 puede reprimir la respuesta de p53, proceso que se ha descrito asociado a distintos tipos de cáncer. MiR-21 también está involucrado en la modulación del factor de crecimiento transformante beta (TGF- β), mediante la regulación tanto de los receptores TGFBR2/3 como del gen apoptótico DAXX. Por otra parte, miR-21 es fundamental en el control de la invasividad de las células de GBM, ya que regula los MMPs (inhibidores de metaloproteinasas de matriz) a través de la modulación de sus inhibidores RECK (proteína rica en cisteína, que induce la reversión con motivos Kazal) y TIMP3 (tejido inhibidor de metaloproteinasas de la matriz). Asimismo, miR-21 regula a la proteína supresora de tumores PDCD4 (Programed Cell Death). Esta proteína inhibe la traducción mediante la interacción con factores que inician la traducción de eIF4A y de IF4G [82-90].

El miR-221 en contraste con miR-21 solo se encuentra sobre-expresado en los astrocitomas de alto grado (AstA y GBM). Su función ha sido estudiada en conjunto con miR-222 ya que tienen los mismos blancos específicos siendo por lo tanto co-regulada. miR-221/222 reprimen la expresión de p27 (regulador del ciclo celular), el cual es un inhibidor de las proteínas cinasas dependientes de ciclinas (CDK). Al reprimir la expresión de p27 se genera una continua proliferación celular (Fig. 9) [82-89].

MiR-181a y miR-181, son otros dos microRNAs que se han encontrado regulados a la baja en GBM. En específico la expresión de miR-18a correlaciona negativamente dependiendo del grado del tumor, mientras que miR-181b muestra diferencias significativas entre los astrocitomas de grado II y III. Se ha demostrado

que ambos microRNAs pueden iniciar la proliferación de células de glioma in vivo (Fig. 9) [82-90].

Como se mencionó, una de las principales alteraciones encontradas en los GBM1 es la sobreexpresión de EGFR, en más del 60%, sin embargo, no en todos los casos se ha encontrado la amplificación de gen EGFR. Recientemente se describió que miR-7 se une directamente a EGFR modulando sus niveles dentro de las células de GBM. Asimismo, se ha demostrado que la proteína AKT puede ser activada de forma independiente al receptor mediante IRS-1 e IRS-2 (proteínas de unión a tirosinas fosforiladas). Estas últimas ha sido identificadas como blancos de miR-7 [82, 91-93].

miR-128 pertenece a los miRNAs específicos de cerebro. Se ha reportado la subexpresión de este microARN tanto en GBM como en los Ast grado II y III aunque en menor medida. miR-128 regula la transcripción de E2F3a, el cual es indispensable para activa los genes necesarios para la progresión de la ciclo celular. miR-128 puede inhibir la proliferación de las células cerebrales por regulación negativa de E2F3a. Otro blanco directo de miR-128 es el oncogén Bmil-1, como se mencionó, Bmil-1 puede regular a genes supresores de tumores como p53 y p16Ink4a. Es importante destacar que Bmil-1 también puede promueve la auto renovación de las células madre [82,94-95].

Otros microRNAs que han sido reportados subexpresados en GBM son miR-124 y miR-137, estos dos microRNAs afectan directamente a las cinasa dependiente de ciclina 6 (CDK6), que regula la progresión del ciclo celular y la diferenciación. Por lo que la regulación a la baja de ambos microRNAs, promueve la proliferación incontrolada de células indiferenciadas [82 y 96].

Es importante mencionar que se han descrito una serie de microRNAs que podrían estar participando de forma importante en la patogénesis de los astrocitomas de todos los grados histológicos, sin embargo, aún hace falta realizar más estudios para poder determinar su participación (Tabla 4).

Tabla 4. Otros microRNAs involucrados en GBM.

miR-451	Sub-expresión inhibe crecimiento
miR-10b	Sobre-expresión correlaciona con el grado de malignidad
miR-129,	Sub-expresión en GBM función desconocida
miR-218	Sub-expresión en GBM función desconocida
miR-139	Sub-expresión en GBM función desconocida

c) Aberraciones cromosómicas asociadas a GBM

Por último las aberraciones cromosómicas son también muy frecuentes en los GBM. Sin embargo, cada una de ellas refleja la pérdida o ganancia de regiones cromosómicas que contienen genes implicados en todas las vías descritas. Por ejemplo, la pérdida de la heterocigocidad (LOH), en 10q, la cual constituye la alteración más frecuente identificada en GBM, conlleva a la pérdida de genes supresores de tumores como: PTEN en 10q23.3, DMBT1 (supresor de tumores cerebrales malignos) localizado en 10q25.3-q26.1, FGFR2, en la región 10q26. La frecuencia de LOH en 10q es similar en GBM1 (70%) y en GBM2 (63%) aunque en GBM1 se ha observado que la pérdida generada es del cromosoma 10 completo. También es importante mencionar, que en cerca del 44% de los AstA y el 21-24% de los GBM2 se ha encontrado presente LOH del cromosoma 19p. Esta aberración al estar presente solo en GBM2 sugiere ser un evento en la progresión tumoral [9, 40].

VI. Técnicas de análisis masivo

La **Genómica** es una rama de la Biología que se dedica al estudio de los genomas, dividida a su vez en distintas disciplinas como la **Genómica Estructural**

orientada a la caracterización y localización de las secuencias que conforman los genes, la **Genómica Comparativa** la cual estudia las relaciones entre genomas de diferentes especies o poblaciones y finalmente la **Genómica Funcional** dedicada a la recolección de información de la función de los genes, mediante la aplicación de aproximaciones experimentales. Esta rama de la genómica utiliza herramientas de Biología Molecular de alta capacidad de procesamiento para el análisis de RNAm, proteínas y metabolitos, con el propósito de conocer cuál es la función biológica de cada gen a través de su expresión, analizando cada uno de estos parámetros a escala global [97-98].

Una de las metodologías más utilizadas por la Genómica para determinar variaciones tanto en la secuencia como en los niveles de expresión de miles de genes de forma simultánea y reproducible son los microarreglos, Actualmente se cuenta con una gran variedad de arreglos que permiten evaluar la expresión génica, como: Microarreglos de hibridación genómica comparada (CGH arrays), microarreglos de microRNAs, así como aquellos que permiten evaluar de manera muy fina cambios en un solo nucleótido (SNPs) [97, 99-100].

Gracias al desarrollo de la **Genómica Funcional** se ha podido comprender mejor, el complejo proceso que involucra la regulación de la expresión genética, obtenido información valiosa no solo de la expresión de los mensajeros (RNAm), sino también de la expresión e interacción de proteínas y metabolitos dentro de las células. Cada uno de estos procesos interaccionan generando complejas redes de información que modulan las funciones celulares de un organismo [98]. En este sentido, es importante resaltar que las proteínas son los "ladrillos" de la vida ya que llevan a cabo funciones fundamentales en los seres vivos, siendo las biomoléculas más diversas y versátiles que se conocen. Estas biomoléculas se encuentran involucradas en un sin número de procesos celulares como: estructura, vías de señalización, catálisis, transporte y muchas otras funciones, por lo que la regulación de su expresión es un proceso complejo y sumamente especializado [97].

La **Proteómica**, rama de la **Genómica Funcional**, está enfocada al estudio masivo de proteínas que son codificadas por un genoma. Cabe resaltar que el genoma de un organismo no cambia a lo largo de la vida, sin embargo su expresión (transcripción y traducción de proteínas), va cambiando a lo largo de la vida. Por lo tanto el genoma es el mismo, mientras que el conjunto de proteínas expresadas temporalmente en una célula, tejido u organismo particular en un momento dado serán distintas dependiendo del momento, las necesidades y las circunstancias. A este conjunto completo de proteínas expresadas en un momento dado se le denomina **proteoma** [98-99].

Dentro de las técnicas especializadas para analizar los cambios que se generan en los **proteomas** encontramos la electroforesis bidimensional (2D-PAGE), la cromatografía líquida (HPLC), la espectrometría de masas y sus variantes, que permiten separar, identificar y cuantificar la magnitud de los cambios en la expresión de proteínas. Asimismo, contamos con otras herramientas como la bioinformática, la cual, mediante programas computacionales nos permite identificar y sugerir cuales son los cambios en las interacciones de proteínas dentro de redes complejas de un sistema que podrían ser los más significativos [99-101]. Otra técnica que permite la separación de proteínas individuales provenientes de mezclas complejas es la cromatografía líquida o HPLC. Al igual que los geles 2D-PAGE se basa en la separación de proteínas basada en las diferencias de carga, tamaño, afinidad de unión y otras propiedades de las proteínas. [98-99].

Aplicaciones de Genómica y Proteómica en cáncer

La aplicación de la Genómica y la Proteómica en el estudio de enfermedades como el cáncer ha mostrado ser una herramienta indispensable para el entendimiento del desarrollo mantenimiento y progresión de estas patologías. Gracias a ellas se ha podido identificar moléculas específicas que nos permiten discriminar ente distintos estados biológicos, es decir sano/enfermo o bien, averiguar cómo distintos pacientes responde a determinado tratamiento [102-107].

Las enfermedades oncológicas son un problema de salud pública ya que a los tratamientos actuales no son los suficientemente adecuados para controlar estas patologías [106-108]. La incidencia del cáncer varía según la edad, la raza, los factores geográficos y las características genéticas [108]. En el 2006, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó 63,888 defunciones en México por éste motivo, ubicándose como la tercera causa de mortalidad, estimando que alrededor de 84 millones de personas morirán a causa de esta enfermedad entre el 2005 y 2015 [108-109].

La aplicación de estas metodologías en el cáncer ha permitido estudiar el perfil génico diferencial (tumor/ tejido normal) y entre los distintos grados de progresión; obteniendo firmas moleculares y por consiguiente mejores clasificaciones moleculares de los diferentes tipos de cáncer [101].

Los estudios realizados hasta hoy con estas metodologías han permitido identificar y proponer una serie de genes, proteínas, biomarcadores y vías de señalización que han contribuido a la comprensión de los mecanismos moleculares que dirigen la capacidad de las células para iniciar el tumor. De esta manera, se podrá mejorar la práctica clínica, el diagnóstico y el descubrimiento de nuevos fármacos para mejorar el tratamiento en los pacientes con cáncer [101-103 y 107].

Aplicación de la Proteómica en los Ast

Como se ha mencionado, los astrocitomas presentan alteraciones específicas que han sido ampliamente estudiadas, desarrollándose fármacos específicos para algunas moléculas involucradas. Asimismo, muchas de estas alteraciones han servido para realizar clasificaciones cada vez más precisas; sin embargo, aún existen interrogantes acerca de su formación y progresión, por lo que la aplicación de técnicas masivas ha contribuido de forma importante en el estudio de estos tumores [110-113].

Diversos análisis proteómicos han sido reportados, mayormente en líneas celulares de GBM y algunos otros trabajos en Ast de bajo grado, en los cuales se

han confirmado que la vía de las MAPK es la más afectada en estas neoplasias. Además diversa moléculas han sido postuladas como marcadores de pronóstico y diagnóstico gracia estos análisis [110-114].

Artículo Requisito

Los resultados centrales del trabajo se publicaron en la revista Journal of Proteomics; se anexa copia del manuscrito



Available online at www.elsevier.com

ScienceDirect

www.elsevier.com/locate/jpro



A proteomic approach of pediatric astrocytomas: MiRNAs and network insight



Ruth Ruiz Esparza-Garrido^{a,*,1}, Miguel Á. Velázquez-Flores^{a,1}, Jaime Diegopérez-Ramírez^b, Enrique López-Aguilar^c, Georgina Siordia-Reyes^d, Magdalena Hernández-Ortiz^e, Ángel G. Martínez-Batallar^e, Sergio Encarnación-Guevara^f, Fabián Salamanco-Gómez^f, Diego Julio Arenas-Aranda^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06702 México, D.F., México

^b Servicio de Neurocirugía, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06702 México, D.F., México

^c Servicio de Cirugía, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06702 México, D.F., México

^d Servicio de Patología, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06702 México, D.F., México

^e Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 Cuernavaca, México, México

^f Coordinación de Investigación en Salud, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06702 México, D.F., México

^{*} Present address: Centro de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México, P.O. Universidad 3000, C.P. 04510 Cuernavaca, D.F., México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 17 May 2013

Accepted 12 September 2013

Keywords:

Pediatric astrocytoma

Proteomic

Protein-protein interactions

Hub proteins

Novel miRNAs

ABSTRACT

Pediatric astrocytomas, a leading cause of death associated with cancer, are the most common primary central nervous system tumors found in children. Molecular studies of these tumors focus on adults, not on children. We assessed the global protein and microRNA expression pattern by 2D SDS-PAGE mass spectrometry (MALDI-TOF) and *in situ* miRNA, qRT-PCR arrays. Proteomic studies revealed 25 proteins with changes in the expression. Interactions showed that *actin*, *cathepsin*, and *14-3-3* protein are hub proteins in these neoplasms. MicroRNA analysis demonstrated for the first time novel miRNAs masked in the astrocytoma biology. Network and our results show that these proteins and microRNAs with expression changes on pediatric astrocytomas could serve as biomarkers of tumor progression.

Biological significance

Astrocytomas are tumors that progress rapidly and that invade surrounding tissues, although some drugs have been developed to treat these neoplasms, the mortality of patients is still very high. In this study we describe, for the first time, to our knowledge, some proteins and miRNAs associated with the biology of astrocytic tumors that could be postulated as possible diagnostic or prognostic biomarkers. Altogether, our results indicate that integrative analyses allow making a fairly accurate prediction of different cellular processes altered in astrocytic tumors.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

* Corresponding author. Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, 06702 México, D.F., México. Tel.: +52 55 56277844.

E-mail address: arenas@genoma.unam.mx (D.J. Arenas-Aranda).

¹ These authors contributed equally to this work.

1. Introduction

Astrocytomas (Ast) are a heterogeneous group of tumors that differ in their localization and morphologic characteristics as defined by a wide range of genetic alterations [1]. Astrocytic tumors are classified under a specific criteria established by the World Health Organization (WHO) into four different grades: pilocytic (grade I), diffuse (grade II), anaplastic (grade III) and glioblastoma multiforme (grade IV) [2]. The incidence is low, approximately 11.8 million people per year worldwide, represents more than 50% of the brain tumors in children and adults [3–6]. Astrocytomas are the leading cause of childhood cancer deaths [5, 6]. It is important to note that pediatric and adult astrocytic tumors have distinct cytogenetic and clinical courses with separate genetic alterations [7, 8]. Genomic studies have revealed that pediatric high-grade Ast (HGA) shows lower frequency copy number variants (CNVs) and lower number mutations in children (15 mutations) than in adults (36 mutations) [9]. Although these are altered postnatal pathways in both pediatric and adult astrocytic tumors, such as the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway changes rarely occur at the same molecular level [9]. Proteomic analysis of Ast has revealed protein expression changes depending on the tumor grade, the response to drug treatments, and the extent to which some proteins have been perturbed in possible prognostic and diagnostic biomarkers [10]. However, the vast majority of these studies were performed on adult glioblastoma multiforme (GBM) and very few on other histologic grades [11] and on childhood Ast. To the best of our knowledge, there is only one proteomic study on pediatric Ast, which was performed on pilocytic Ast (Pwt) [12]. Also, alterations in a neoplasm could be associated with diverse regulatory mechanisms such as microRNAs (miRNAs) [13]. Although it is true there are few studies estimating alterations in the miRNA expression in childhood gliomas [13] even though diverse miRNA subsets were found that may have a potential to be diagnostic and prognostic biomarkers [14, 15].

To interpret massive data, diverse bioinformatic platforms are used to link expression changes to aberrant biological processes involved in cancer. Biological functions are regulated by protein-protein interactions. Depending on the nature of the interaction, a single protein can interact with diverse partners under different conditions, producing different biological outcomes. Protein interactions are essential for understanding the molecular mechanisms of cellular functions as well as diseases [16].

In order to chart global protein and miRNA expression pattern in pediatric Ast, we performed bidimensional electrophoresis [17], HPLC-ESI/MS, mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), and a RT-miRNA PCR Array. Data obtained by these methodologies were analyzed by bioinformatic databases. We detected proteins and miRNAs with expression changes in pediatric Ast of different histologic grades (I, II and IV). The differences in protein and miRNA expression among tumors class and their behavior (interaction of the proteins identified) showed the *calmodulin* (*CALM*), *calreticulin* (*CALR*) and *14-3-3 protein epsilon* (*1433*) could be hub proteins in these neoplasms. Also, protein-protein interactions networks demonstrate low protein interact with other proteins

participating in the cellular processes of apoptosis, mitosis, signal transduction and gene regulation. Interestingly, *14-3-3 protein epsilon/delta* (*1433*) acts as a convergence point, interacting *VDR*, *CALR* and *1433* in a network suggesting that this protein plays an important role in the biology of Ast. Meanwhile, miRNA analysis showed diverse miRNAs with changes on the expression controlling diverse hallmarks of cancer [18], which have not been associated with Ast. Due to this point, miRNA targets interact physically with many of the proteins determined by proteomics, suggesting a link between miRNAs and proteins that showed expression changes.

2. Material and methods

2.1. Patients and clinical data

Tumor tissue samples were collected at surgery, snap frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use. A total of twelve astrocytic tumors and four control tissues were collected during the period 2000–2012: seven low-grade (3 pilocytic astrocytomas (Pwt); 4 diffuse astrocytomas (Dwt)) and five high-grade (5 glioblastoma multiforme (GBM)) as only a case. Tumors were collected from children <one through 17 years of age = four families with no history of cancer (file *case* attached) (Table 1). Also, one sample was obtained from pediatric patients (2 boys and 2 girls) who had submitted to temporal lobe resection for epilepsy (Table 1). Tumors were histopathologically classified by pathologists according to a criteria established by the WHO.

Table 1 Clinical features of human brain tissue samples

Clinical features	Age
Control tissue 1	8
Control tissue 2	9
Control tissue 3	13
Control tissue 4	5
Mean age	10.12
Gender (male/female)	2/2
Total	4
Pilocytic astrocytoma 1	5
Pilocytic astrocytoma 2	8
Pilocytic astrocytoma 3	6
Mean age	6
Gender (male/female)	3/1
Total	3/1
Diffuse astrocytoma 1	7
Diffuse astrocytoma 2	11
Diffuse astrocytoma 3	8
Diffuse astrocytoma 4	7
Mean age	7.75
Gender (male/female)	3/1
Total	4
GBM 1	11
GBM 2	14
GBM 3	9
GBM 4	5
GBM 5	6
Mean age	9.4
Gender (male/female)	3/2
Total	5

2.2 Phenol extraction of proteins for proteomic studies

Tissue was microdissected to avoid areas of necrosis or hemorrhage and was ground with liquid nitrogen and protease inhibitors cocktail (Calbiochem Molecular Biologicals Indianapolis, IN). The protein extraction was performed according to Hartman's protocol modified by Esmeralda et al. [29]. All samples were dissolved in 500 μ l of extraction buffer (in 45 success: 0.7, Tris-Base 0.5, KCl 0.1, HCl 0.08 and EDTA 0.05, 8 mercaptoethanol 2%). After that, coronated phenol (500 μ l) was added and tissue was incubated for 30 min at -20°C . Samples were centrifuged at 400 g for 10 min [4, 31] and the

aqueous phase was removed by adding ammonium acetate (0.1 M) and incubating 15–20 h at -20°C . Thereafter, two washes were performed with ammonium acetate (0.1 M) and samples were centrifuged at 4000 g for 10 min at 4°C ; the pellet was washed with 1 ml of acetone 80% and centrifuged under the same conditions. The resulting supernatant was discarded and the pellet was resuspended in solubilization buffer (in 45 success: 2, thiourea 7 and dithiothreitol 0.1) (10% ampholytes 2% [3–10 μ l] and CHAPS 4%). Finally, samples were centrifuged at 8000 g during 30 min (4°C) and the supernatant was recovered and frozen at -80°C until the experiments were performed.

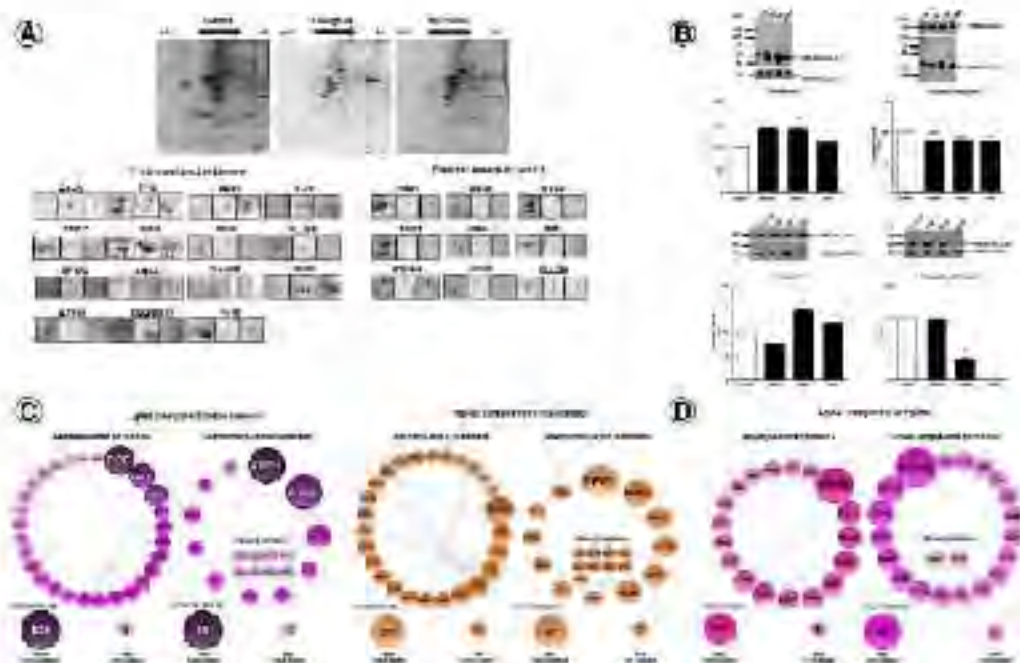


Fig. 1. A) 2D SDS-PAGE gels from the control, low-grade and high-grade astrocytomas. 2D gels for each condition were performed in triplicate. B) Proteomic validation by western blotting. Calreticulin expression increased by 41% in pilocytic and in diffuseAst, showing no significant changes in GBM when compared to the control. Meanwhile, carbonic anhydrase I decreased its levels by 14 + 3% in pilocytic tumors, remaining without significant changes in diffuse and GBM tumors. Pilocytic ANXA2 showed a decrease of 23 + 5% in the ANKAS protein levels when compared to the control, but increased by 41 + 4% and 18 + 6% in diffuse and GBM, respectively. Notably, γ -tocopherol 2 subunit beta also had stable expression levels in pilocytic and astrocytomas, decreasing by 76 + 5% in diffuse tumors and being absent in GBM. Protein levels were normalized to the levels of α -actin. Values represent mean \pm SEM from three experiments ($^*p < 0.0005$; Student's t-test vs. control); $^{**}p < 0.001$; Student's t-test vs. control; $^{***}p < 0.0005$; Student's t-test vs. control; $^{\#}p < 0.008$; Student's t-test vs. control; $^{\#}\#p < 0.0005$; Student's t-test vs. control; $^{\#}\#p < 0.015$; Student's t-test vs. control; $^{\#}\#p < 0.001$; Student's t-test vs. control). C) Proteins with changes on the expression in low-grade tumors compared to the control. The highest expression increase was observed in ITIS (178-fold change), CALR (77-fold change) and VIME (16-fold change), whereas proteins with the lowest levels were ATP5H (-56-fold decrease), STX6L (-27-fold decrease), and L43E (-17-fold decrease). The Enr connecting proteins represent physical interactions experimentally validated. Proteins that showed the highest expression changes in high-grade tumors were ANLP, FBG, and TRFE, while TPE, SPP25, and BTMN1 have shown to be most under-expressed. D) Proteins altered among tumors. TPIS, FBG and PNAS showed the highest fold change increase in high-grade compared to high-grade astrocytomas. On the other hand, ATP5H, GANAB, and SPTA2 were the most under-expressed proteins in low-grade tumors. See also Table S1.

2.3. 2D SDS-PAGE

A 2D SDS-PAGE was performed as previously described by International et al. [14]. Briefly, standard 2D SDS-PAGE was performed from 400 µg of total protein from independent samples in triplicate (images were deposited in ProteoMet Explorer). Analytical gels were fixed, silver stained, and scanned in a 124000 densitometer (ProScan Densitometer, USA) for their analysis by means of the 2DQuest 8.0.1 software (Bio-Rad, Hercules, CA). To identify proteins by mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), 500 µg of total protein from a pool of control fibroblasts or a pool of IgG/IgG or IgG/anti was loaded for preparative 2D SDS-PAGE in a pH range of 5-10 (Fig. 1A). Preparative gels were fixed and stained with colloidal Coomassie Brilliant Blue in triplicate.

2.4. Mass spectrometry

Spots which showed a 2-fold change from at least three gels in each group, and a significance level of 95% (Student's *t*-test, *p* < 0.05) were excised and processed for MALDI-TOF analysis. Proteins were cut, deplated, reduced, digested and

automatically transferred to a MALDI analysis target by a Proteome SP-1 and SP-robot, employing the 4-Protein 133-400 V software (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) with the aid of a 1000 Chemicals 30 gel digestion kit (Bruker Daltonik). The peptide mass fingerprint was obtained in a MALDI-TOF Analyser (Bruker Daltonik). The number of laboratory spots in 2D microspots were marked out; the peak resolution threshold was set at 1400, the signal/noise ratio of tolerance was 6 and contaminants were not excluded. The spectrum was processed by the GenAnalysis 1.2.4-MS Patch 2 (Bruker Daltonik). The search engine MASCOT [25] was used to compare the fingerprints against the UNIPROT [24] release 2010.06 database with the following parameters: Taxon: Human, mass tolerance of up to 500 ppm, one ms cleavage allowed, and as the fixed modification Cysteine carbonyl and oxidation of methionine as the variable modification.

2.5. Protein network reconstruction

Protein data mining was performed with the HIVE database which integrates information from the KEGG, KEGG1, IntAct, OMIM, PubMed, UniProt, BioGRID, NP-000, Colliand04,

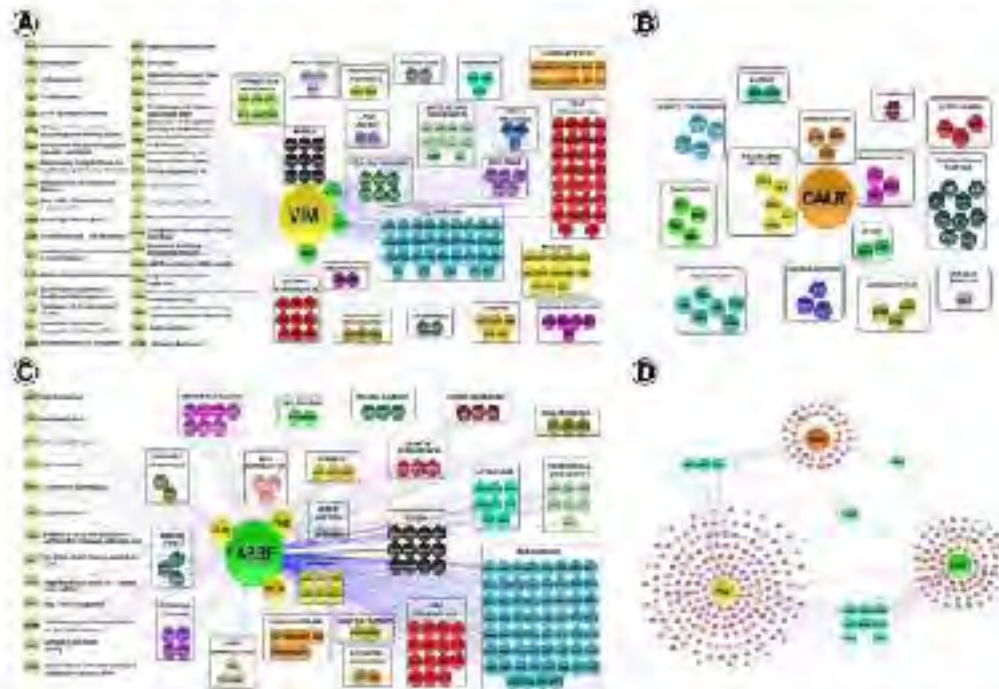


Fig. 2 – In vivo cross of vimentin, calcitriol, and 14332. A) Vimentin a hub protein, interacts physically with 14332, GFAP, SIRT2, (proteins identified with changes on the expression by proteomics) and with other proteins implicated in diverse cellular processes. Cell signaling proteins, such as 14332 members, carboxyls, and some proteins that participate in gene transcription could be affected. B) Calcitriol network is constituted by interacting proteins associated with the endoplasmic reticulum, plasma membrane, and cell signaling. C) The 14332 interactome revealed ninety three proteins, interacting proteins, principally involved in cell signaling, gene transcription, mitosis, and apoptosis. D) Protein networks showed that 14332 is the only interacting protein which binds vimentin, calcitriol, and 14332 in interactomes.

bioGRID, AllianceDB, MINT, WormBaseDB, KEGG, UniProt and NCBI GeneDB databases (20). The analysis was achieved with its open source bioinformatics platform Cytoscape (22) and BioGrid Web page using the Alter Tool (contains its built nodes and adding edges as follows: Organism > Homo sapiens, protein-identifiers only, Data Source > protein-protein interactions, all (564 sources) and all experimental methods) method > by adding edges connecting input nodes and as Output > Proteins.

2.6. Proteomic validation by western blot analysis

Western blot analysis was performed as previously described by Velázquez-Flores and Salcedo (24). Astrocytic tumors (20–30 µg) were transfected into a lysis buffer (1.5 µl/l, RIPA-Tis buffer (mM: EGTA 2; NaCl 316; NaF 50; Tris-HCl 20; Na2VO4 100; PMSF 100 and EDTA 100, 0.1% of laurylsulfate and aprotinin, SDS 0.2% and Triton X 100 2%) and maintained under constant shaking for 2 h at 4 °C. After that, the sample was centrifuged for 5 min at 20,000 g and the supernatant (30 µg of protein) was denatured in Laemmli's sample buffer, resolved through 12%

SDS-polyacrylamide gels (cm) and transferred to PVDF membranes. Blots were stained with Ponceau S to confirm that protein loading was the same at all lanes. Membranes were washed in TBS in sequence for 5 min and incubated for 30 min in Tis buffered saline TBS containing 5% dried skimmed milk and 0.1% Tween 20 (TBS/Tween-milk) to block the nonspecific protein-binding sites. Subsequently, membranes were incubated for 16 h at 4 °C with the primary antibody (anti-CAIR (Abcam ab22613), CAH1 (Abcam ab6516), GLUT3 (Abcam ab39062), ANOAS (Abcam ab54775), EAX ED169 (Santa Cruz Biotechnology sc-30466), 14332 (Abcam ab31129), VIME (Abcam ab8273) or alpha-actin (Abcam ab3664) and secondary antibodies (ECL anti-mouse (Abcam ab6728) ECL anti-rabbit (Abcam ab6721) or ECL anti-goat (Abcam ab6741) diluted in TBS/Tween-milk. The protein was detected using an ECL western blot detection kit (Millipore). The blots were subjected to a densitometry analysis and data were analyzed using the GraphPad Prism5 software (San Diego, CA). The intensity values for all proteins were normalized against the α -actin loading control. Values are the mean \pm SEM from three independent experiments.

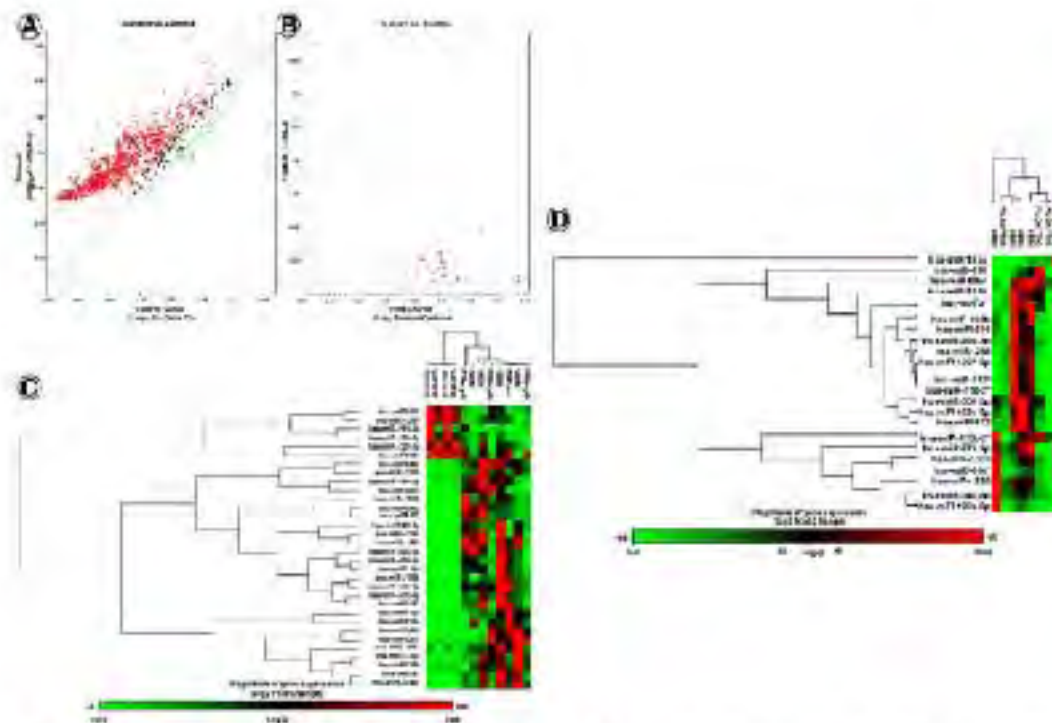


Fig. 3 – miRNAs with expression changes in pediatric astrocytomas. A) Scatter plot comparing the normalized expression of every gene ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) on the array between the control tissue and tumors. Most of the miRNAs prove to be over-expressed (red dots), some unchanged in expression (black dots) and few were down-regulated (green dots). B) Of the miRNAs over-expressed (300) or down-regulated (20), only 26 and 6 displayed significant changes against the control, respectively (Student's *t*-test; $p \leq 0.05$). C) Heat map of miRNAs statistically significant between tumors and control tissue represents co-regulation across groups and individual samples of tumors. Values represent \log_2 of the fold change. D) Heat map of miRNAs statistically significant between high-grade tumors and low-grade neoplasms. See also Table S2.

Table 7—miRNAs with expression changes in pediatric astrocytomas relative to the normal tissue and between Light and Heavy.

Expression profile	Student's <i>t</i> -test (<i>p</i> < 0.05)	log ₂ fold change
Down-regulated miRNAs in tumors compared to the control tissue		
hsa-miR-138	0.00109987	-2.65203278
hsa-miR-1330	1.2E-07E-05	-2.36259886
hsa-miR-129-3p	0.00131887	-2.87887179
hsa-miR-159-3p	0.00181907	-2.14919862
hsa-miR-214-3p	0.00107194	-2.05203689
hsa-miR-185	0.00108682	-2.26722726
Up-regulated miRNAs in tumors compared to the control tissue		
hsa-miR-4195	0.04037997	2.14877775
hsa-miR-475	0.04037998	2.14877775
hsa-miR-1336	0.00135405	2.01627254
hsa-miR-307	0.00104887	2.25048903
hsa-miR-157	0.04037997	2.14877775
hsa-miR-476	0.00104887	2.14877775
hsa-miR-374*	0.00109987	1.13070697
hsa-miR-476b	0.00109987	2.23693608
hsa-miR-484-3p	0.04131125	1.84139813
hsa-miR-122-3p	0.00132942	2.51163787
hsa-miR-805-3p	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-9	0.00111818	2.26203278
hsa-miR-424	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-476a	0.04037997	2.14877775
hsa-miR-1336b	0.00135405	2.01627254
hsa-miR-138	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-316	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-79-3p	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-474	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-174	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-129-3p	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-204	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-476c	0.00109987	2.14877775
hsa-miR-302-3p	0.00109987	2.14877775
Up-regulated miRNAs in Heavy compared to Light		
hsa-miR-770-3p	0.00109987	0.74
hsa-miR-916-3p	0.00109987	0.59
hsa-miR-501	0.00109987	24.29
hsa-miR-153a-5p	0.00109987	1.81
hsa-miR-473	0.00109987	22.26
hsa-miR-79*	0.00109987	3.23
hsa-miR-1336-2'	0.00109987	6.27
hsa-miR-1298-3p	0.00109987	21.23
hsa-miR-480-3p	0.00109987	19.20
hsa-miR-476d	0.00109987	15.53
hsa-miR-4197	0.00109987	29.11
hsa-miR-4232	0.00109987	26.21
hsa-miR-916-3p	0.00109987	11.23
hsa-miR-384	0.00109987	24.26
hsa-miR-4195	0.00109987	19.57
hsa-miR-4198	0.00109987	27.11
hsa-miR-1336	0.00109987	21.46
hsa-miR-475a	0.00109987	18.23
hsa-miR-157*	0.00109987	23.25
hsa-miR-214-3p*	0.00109987	19.51
hsa-miR-122-3p*	0.00109987	20.76
hsa-miR-1336*	0.00109987	7.18

2.2. RT²miRNA PCR Array system

Total RNA isolation (30 mg of tissue) was performed using the Trizol reagent protocol (Invitrogen, USA) according to the manufacturer's instructions. The RNA extracted was quantified in a spectrophotometer (Sandrop DU-800, Thermo Scientific) and stored at -80°C until analysis. RNA quality, purity and integrity were assessed by 1% agarose gel electrophoresis. The miRNA array analysis was performed with a real-time PCR-based miRNA detection method, RT² miRNA PCR Array Human Genome V2.0 Complete (38-well, SABioscience, QIA443) that array covers up the expression of the 60 most abundantly expressed and best characterized miRNA in the Human mRNA genome. For the first round assay, 5 µg of total RNA was placed in a thermocycler (Applied Biosystems) for 2 h at 37°C, followed by 5 min at 95°C. For real-time PCR, the appropriate RT² SYBR Green qPCR Master Mix (SABioscience) was added to the new mix containing the first round diluted and RNase free water. Finally, the mixture was added to each RT² miRNA PCR Array System with 38-well Genome V2.0 Array that contained specific primers for 351 known human miRNAs, 4 housekeeping genes (B2M; GAPDH; U6; SNORD47), and two 2 RNA quality and 2 polymerase chain reaction (PCR)-free controls.

2.3. Microarray data analysis

Expression of individual miRNA was determined using Ct values obtained with a threshold of 0.3. Fold changes in controls, RT negative controls and genomic DNA contamination controls were tested for each array. Values (Ct) that passed through these stringent criteria were uploaded into the SABioscience software (miScript, miRNA PCR Array Data Analysis) and the fold change for each miRNA was calculated. Then, data were further subjected to statistical analysis using the SABioscience Web site (<http://pubdataanalysis.sabioscience.com/microarrays/analysis.php>). The ANOVA method was used to calculate the relative expression of miRNAs in the tumors and astrocyte cultures. MicroRNAs with fold changes of 2 and with significant *p* value (Student's *t*-test; *p* ≤ 0.05) between the two groups (control tissues (*n* = 4); tumors (*n* = 8)) were considered to be differentially expressed.

2.4. RT² miRNA PCR Array data normalization

For accurate and reproducible results we normalized the amount of target miRNA by using a suitable endogenous reference RNA. Multiple PCR Control gene primers designed to quantify a panel of 7 miRNAs (SNORD44, SNORD47 and SNORD48) and the miRNA RNU6B (RNU6-2). Normalization corrects for factors that could otherwise lead to inaccurate quantification because we performed a relative quantification. These factors include variation in quantity of input RNA, possible RNA degradation, presence of inhibitors in the RNA samples, and differences in sample handling. All five miRNAs have amplification efficiencies close to 100% (www.qiagen.com/miRNA/online). The ΔCt method was used for relative quantification and interpretation of the control assay. Fold Change (2^{-(ΔCt)}) is the normalized gene expression (2^{-(ΔCt)}) in the test sample divided the

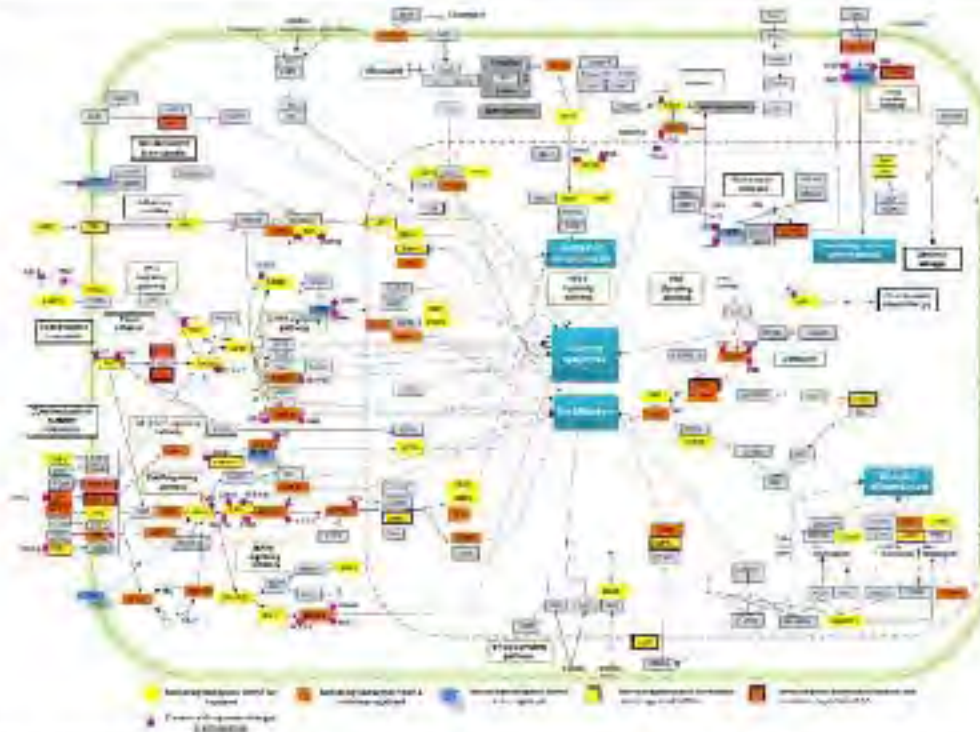


Fig. 4 - Enriched KEGG pathway visualization analysis. Most nodes of dysregulated miRNAs are involved in the MAPK signaling pathway. Also, Wnt2, Notch1, sonic hedgehog, and TGFβ pathways are regulated at different levels by miRNAs with expression changes in pediatric neurocytomas. Yellow boxes genes targeted by one miRNA up regulated. Orange boxes genes targeted by >1 miRNAs up regulated. Purple boxes of yellow boxes refers to genes targeted by one up- and one down-regulated miRNA, whereas purple boxes of orange boxes indicate genes targeted by >1 up-regulated and one down-regulated miRNA. Genes regulated only by one down-regulated miRNA are highlighted in blue. Proteins identified with expression changes by proteomics that establish physical interactions with the miRNA targets are represented as red circles.

normalized gene expression (24, Delta Ct) in the control sample.

2.10. Pathway analysis

To determine gene interactions and molecular pathways potentially altered in the astrocytic tumors by the expression of single or multiple miRNAs, we used MIANA miRPath v2.0 (<http://www.miansa.org/miRPath/>) [25]. The cutoff values for inclusion in these analyses were differential gene expression, with p value < 0.05 and 25 in fold change (Student's t test). This analysis was performed using both predicted targets, based on DIANA-micro TDE and those validated with TARBase v5. Analysis identified all the significantly pathways based on their interaction levels (Wilcoxon Rank-Sum Test; $p < 0.05$).

2.11. Ethics

The project had the approval of the Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI Research Ethics E 20011

3906 S). Written consent forms were obtained from parents who provided fresh samples of tissues for the proteomics and miRNA RT-Array component of the study.

2.12. Accession numbers

The microarray data discussed in this study have been deposited in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) and are available at GEO Series accession number GSE44285 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE44285>).

The proteomic data discussed in this study have been deposited in ProteomeX-DB and are available at MSF01 Series accession number:

http://proteome.ucsb.edu/projects/MIAP01MIAP01A1_C1_C21-100-proteome.ucsb.edu/MIAP01MIAP01A1_C1_C21-100

http://proteome.ucsb.edu/projects/MIAP01MIAP01A1_C1_C21-100-proteome.ucsb.edu/MIAP01MIAP01A1_C1_C21-100

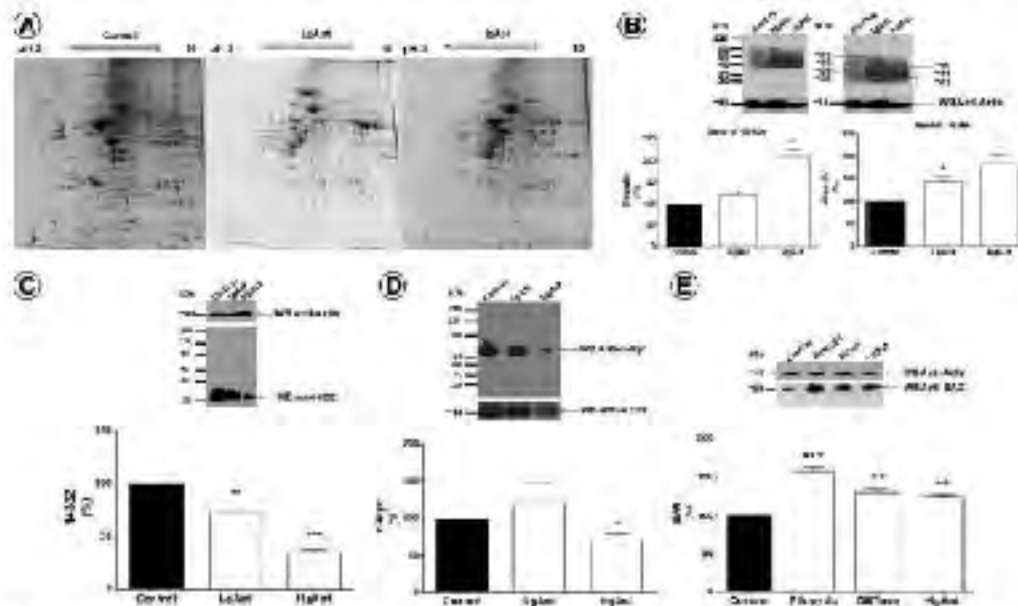


Fig. 3 – Predicted mRNA targets show protein expression changes upon tumor progression. A) 2D SDS-PAGE studies revealed the appearance of distinct vimentin forms in tumors related to the control (red boxes). The arrow shows VIME variants 3 and 4 as demonstrated by mass spectrometry. B) Western blot studies showed that vimentin bands of ~55 and ~75 kDa increased by $171 \pm 8\%$ and $140 \pm 12\%$ in low-grade astrocytomas related to the control, respectively. Similarly, vimentin expression increased by $210 \pm 15\%$ (band of ~55 kDa) and by $183 \pm 18\%$ (band of ~39 kDa) in high-grade astrocytomas related to the control. The appearance of other vimentin forms (~62, ~50, ~46 and ~41 kDa) was observed in tumors. C) Expression levels of p53 decreased by $28 \pm 4\%$ in low-grade astrocytomas and $66 \pm 3\%$ in high-grade astrocytomas, respectively. D) p53 levels remained similar to the control tissue in low-grade astrocytomas, but decreased by $25 \pm 5\%$ in high-grade tumors. E) Expression levels of BAX increased by $60 \pm 4\%$ and $25 \pm 3\%$ in low-grade astrocytomas pilocytic and diffuse tumors, respectively. In high-grade astrocytomas, BAX expression also increased by $90 \pm 2\%$. Protein levels were normalized to the levels of α -actin. Western blot values are the mean \pm SEM from 3 independent experiments. *** $p < 0.0001$; t student vs control; ** $p < 0.002$; t student vs control; * $p < 0.05$; t student vs control; $\dagger p \leq 0.009$; t student vs control.

http://ncic.scripps.edu/ncicinfo/proteome/NCIATMCAPE_M5.asp?method=go&tree=116271643&path=116271643&path=116271643
http://ncic.scripps.edu/ncicinfo/proteome/NCIATMCAPE_M5.asp?method=go&tree=116271643&path=116271643&path=116271643

2.13. Supplementary material

Refer to Web version on PubMed Central for supplementary material.

3. Results

In order to analyze the proteomic patterns of low-grade Aa (LGA) and HGA and the control tissue, 2D SDS-PAGE was performed on all samples. In all, more than 1000 protein spots were identified following 2D SDS-PAGE and image analysis

(Fig. 1A, see Protocol 1, MDAPE). Protein spots analyzed by mass spectrometry were those showing a 2-fold change in expression from at least three gels for each group and statistically significant values (Student's *t*-test, $p \leq 0.05$). From 200 spots analyzed, we identified 49 different proteins (Table 3); all showing changes in expression between the control tissue and astrocytic tumors, and 19 among LGA and HGA (Fig. 1A-B). Remarkably, the control tissue exhibited patches upon detection in tumors both LGA and HGA (Fig. 1A, D). Also, HGA showed two absent proteins (Annexin 2 and mitf-like (MIFL)) and nestin (NEST), which were present in LGA (Fig. 1A).

Low grade Aa exhibited 28 up and 11 down expressed proteins with respect to the control, where fibrinogen beta chain (FIB3), CALR and VIME showed the highest fold change 103, 92 and 53, respectively (Fig. 1C). Meanwhile, a 50 fold decrease was shown by ATP synthase subunit c (ATP4) and actinin 1 (ACTN1) (Fig. 1C). LGA exhibited 26 proteins with increased expression compared to the control, whereas 12 proteins displayed lower levels (Fig. 1C). The highest increase

Table 3 – Pathways altered in high grade Ast compared to low grade Ast

KEGG pathway (predicted)	Wilcoxon Rank Sum Test p-value (p < 0.05)	MPROs with change in expression
Glycine, serine, and threonine metabolism	1.544E-04	hms-m8-346-7p hms-m8-593-7p hms-m8-488-5p hms-m8-575-5-3p hms-m8-1207-5p hms-m8-1295a hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p hms-m8-523-5p hms-m8-136-5p hms-m8-125b-2-3p hms-m8-1593 hms-m8-1207-5p hms-m8-1298 hms-m8-73-3p hms-m8-523-5p hms-m8-136-5p hms-m8-571 hms-m8-612 hms-m8-129a-3p hms-m8-929-3p hms-m8-888-5p hms-m8-120-3p hms-m8-126-1-3p hms-m8-1267-3p hms-m8-1299 hms-m8-129a-3p hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p hms-m8-676-5 hms-m8-390-5p hms-m8-679 hms-m8-129a-3p hms-m8-449-3p hms-m8-676-5 hms-m8-593-7p hms-m8-1207-5p hms-m8-129 hms-m8-125a-3p hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p
Adhesion junction	1.23542E-05	hms-m8-676-5 hms-m8-390-5p hms-m8-571 hms-m8-612 hms-m8-129a-3p hms-m8-929-3p hms-m8-888-5p hms-m8-120-3p hms-m8-126-1-3p hms-m8-1267-3p hms-m8-1299 hms-m8-129a-3p hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p hms-m8-676-5 hms-m8-390-5p hms-m8-679 hms-m8-129a-3p hms-m8-449-3p hms-m8-676-5 hms-m8-593-7p hms-m8-1207-5p hms-m8-129 hms-m8-125a-3p hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p
Wound healing	1.11E-0004	hms-m8-676-5 hms-m8-390-5p hms-m8-571 hms-m8-612 hms-m8-129a-3p hms-m8-929-3p hms-m8-888-5p hms-m8-120-3p hms-m8-126-1-3p hms-m8-1267-3p hms-m8-1299 hms-m8-129a-3p hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p hms-m8-676-5 hms-m8-390-5p hms-m8-679 hms-m8-129a-3p hms-m8-449-3p hms-m8-676-5 hms-m8-593-7p hms-m8-1207-5p hms-m8-129 hms-m8-125a-3p hms-m8-676-5 hms-m8-73-3p

the expression levels was observed in such proteins as cytoskeletal antiopoptases (AIMPL), FIBG, transferrin (TFE) and VIME, showing a fold-increase of 85, 46, 39, and 52, respectively (Fig. 8). On the other hand, down regulated proteins with the highest fold change were nicotinic succinate (TDS) (7-fold decrease), SHP2 (20-fold decrease) and STMN1 (16-fold decrease). Even more, a comparison of IgAst and HgAst, indicated that 28 protein spots were over expressed in IgAst, with TFE, DUB and PMA and CALR showing the highest fold change: 25, 5.5 and 4, respectively. By contrast, 19 proteins showed a down-ward expression when the fold-decrease was large: ATP10 (2.4-fold-decrease), neutral alpha glucosidase AB (NAGAB; 5-fold decrease) and spectrin alpha class, domain 2 (SPTA2; 4-fold-decrease) (Fig. 10).

3.1. Protein validation by western blot

To validate protein changes by western blot, four proteins were chosen from a group identified by mass spectrometry. CALR, annexin 5 (ANXA5) and malic enzyme 1 (ME1) were chosen based on their significant increases evidenced by proteomic studies, and GLUT3 protein was tested because of its absence in GBM compared to IgAst. Similar to 2D SDS PAGE, we employed 3 control samples and 3 IgAst, 4 Diffuse Ast (DAst) and 5 GBM. CALR expression increased by 41% in IgAst and showed no change in high-grade tumors (Fig. 11). Meanwhile, ANXA5 levels decreased by 23 ± 3% in DAst. Our suggested 41 ± 4% and 18 ± 5% of DAst and GBM, respectively (Fig. 11). These results seem to agree with proteomic data where a 52-fold increase of CALR in IgAst and a 6-fold increase of ANXA5 in both IgAst and GBM were observed; however, the 24-fold increase of CALR in GBM could not be detected by western blot (Fig. 11). In the case of ME1, this protein showed a significant decrease of 14 ± 7% in IgAst relative to the control, without discernible change in the other histopathologic grades (Fig. 12). In IgAst, GLUT3 levels remained similar to those observed in the control (30 ± 4%) and diminished by 76 ± 5% in DAst. In apparent contradiction, proteomic studies revealed a 3-fold increase of CALR in IgAst and a 5-fold decrease in GBM. Also, GLUT3 showed an 8-fold increase in IgAst, whereas western blot revealed a nearly decrease in ME1 (Fig. 11). Of interest was the fact that GLUT3 is absent in GBM, a result that is consistent with proteomic studies (Fig. 11).

3.2. Interaction protein network

Interactions of the 49 proteins with expression changes in astrocytic tumors were determined by an interaction, using HPPIC database and analyzed with Cytoscape software. The interaction of the 49 proteins with expression changes in tumors indicates that only 26 of these proteins had experimentally validated interactions (Fig. 5). Nodes with the highest number of interactions observed in the protein network were VIME, CALR and 1433E. VIME established physical interactions with VIME (score = 0.9), SPTA2 (score = 0.7), GFAP (score = 0.69) and 1433E (score = 0.55). Meanwhile, CALR interacts physically with PDI1F, FIBG, DUB and with itself, showing interaction scores of 0.81, 0.77, 0.75 and 0.65, respectively. Regarding 1433E, this protein interacts physically with 143P (score = 0.67), 1479E (score = 0.59), VIME (score = 0.55) and SYTA (score = 0.55) (Fig. 5).

3.3. VIME, CALR and 1433E network share components

Because VIME, CALR and 1433E are the proteins with the highest number of interconnections, we decided to construct a network of these proteins to evaluate possible pathways where they are involved. As described above, we used HPPIC database and Cytoscape software for this purpose. In addition to SPTA2, GFAP and 1433E interacting proteins, VIME interacts physically with 143 additional proteins (Fig. 6A) of which 1433E and VIME have the highest interaction score (0.9), followed by annexin (ANX1, 0.8) and pleckstrin (PLECKHA9). Meanwhile, the CALR network consisted of 34 interacting

proteins where PTPN3 shows an interaction score of 0.80 and the myoid beta A1 protein (61), androgen receptor (AR) (6), and glucocorticoid receptor (GR) of 0.86 (Fig. 2B). Meanwhile, protein 14952 interacts with 93 others. The coding VIM2 (Fig. 3C). Protein 14952 shows the highest score of interaction with 14952, an HSP70 (HSP), nitrogen-activated protein kinase kinase (NAK2) (39), histone deacetylase 4 (HDAC4) (3), and M-phase inducer phosphatase 2 (MIE2) (39). Interestingly, VIME, CALR and 14952 network shows protein nodes, with 14952 being the protein that connects the three networks (Fig. 3D).

3.4. 37th miRNA PCR Array data analysis

Several studies have demonstrated that miRNAs are strongly involved in the initiation and progression of cancer [12]. In this study, we evaluated the expression of 752 miRNAs (RT² miRNA PCR Array, SABioscience, Qiagen) in eight Acs samples (4 IgAs and 4 HgAs) in initial untreated tissues (Fig. 3E). Only 163 statistically significant (Student's t-test, $p < 0.05$) with a two-fold change in their expression were included in the analysis. Our results showed that most miRNA levels were up-regulated in astrocytic tumors compared with the control (Fig. 3A). Of these up-regulated miRNAs, only 32 were statistically significant, whereas six were down-regulated significantly (Fig. 3A and Table 2). Also, data were sorted by hierarchical cluster showing dendrograms that indicate co-regulation of miRNAs along the samples (Fig. 3B).

3.5. Pathway analysis

In order to know the signaling pathways in which miRNAs with change on the expression are participating, we analyzed both down-regulated and up-regulated miRNAs by means of DIANA-miRPath v2.0 application using 1-CD5 (DNA) (predicted targets) and TarBase (validated targets) databases. Down-regulated miRNAs showed predictable and validated targets participating in 22 out of 2 pathways, respectively (Table S2). On the other hand, up-regulated miRNA analysis revealed targets that were involved in 46 predictable and 4 validated pathways (Table S3). Because the option "pathways in cancer" includes different pathways and cellular processes shared in different types of cancer including astrocytomas, we decided to focus the analysis in this way. This analysis indicates that most of the miRNA targets participate in signaling cascades as MAPK, Wnt (Wnt), laminin subunit gamma-1 (LAM1), and sonic hedgehog homolog (SHH) (Fig. 4). Significantly proteins encoded by these targets interact physically with distinct proteins that are identified with expression changes by proteomic studies. Proteins with the highest number of interactions with miRNA targets were 14952, 14934, VIME, CALR, PTPN3 (61) and VIM2 (Fig. 4). Importantly, expression changes of VIME, HSP70 (HSP), and BAX were detected by western blotting (Fig. 5A-4) suggesting a connection between miRNA targets and proteins with changes on the expression in Acs. However, further studies are necessary to demonstrate this assumption.

3.6. miRNAs as possible biomarkers of progression in pediatric Acs

A total of 22 miRNAs up-expressed in HgAs compared with IgAs were observed (Table 2). In particular, most of these

small RNA molecules are not associated with astrocytic tumors and cancer in general; however, 12 of them are predicted to be involved in glycosaminoglycan biosynthesis (Table 2). Expression changes of these miRNAs could indicate a possible role in progression and invasion in HgAs.

4. Discussion

4.1. Proteomics of pediatric astrocytomas

The proteomic analysis performed in this study revealed changes in the expression of proteins previously associated and not associated with cancer, including Act. Because this approach revealed many proteins with expression changes, discussion will focus on hub proteins VIME, CALR and 14952. VIME levels were similarly increased in both IgAs and HgAs relative to the control tissue, correlating with VIM over-expression observed in distinct cancer types. Increased expression of VIME has been associated with accelerated tumor growth, invasiveness and metastasis. Notably, these alterations cellular processes were stimulated or stabilized under experimentally controlled VIME down-regulation [26]. In addition to VIME expression changes, proteomic studies showed the existence of different electrokinetic profiles in tumors, which correspond to VIME variants 3 (VIME3) and 4 (VIME4) and possibly to post-translational modifications because of a 2D SDS-PAGE gel migration pattern of VIME variants in a more acidic isoelectric point ($pI \sim 4.2$) (Fig. 5A-B). Acid forms of VIME (3-4) are related to tumor and cancer: the protein in rheumatoid arthritis patients, changing VIME 2.0 SDS-PAGE migration from a basic $pI \sim 5$ to an acidic one $pI \sim 4.3$ [27]. Besides rheumatoid arthritis, abnormal accumulation of VIME-related proteins, including VIME, has been observed in Alzheimer's disease, Creutzfeldt-Jakob disease and multiple sclerosis [28]. To our knowledge, VIME distribution has not been widely studied in cancer; therefore, future studies are needed to establish the presence of distinct VIME 3 and VIME 4 in pediatric Acs.

Similar to VIME, CALR levels were shown to be higher in pediatric tumors than in the control tissue; however, western blot analysis revealed an increased CALR expression only in HgAs (Fig. 1B). While different lines of evidence show that CALR over-expression induces apoptosis in distinct cell lines, including GBM U251 cells [29], other studies indicate that CALR inhibits apoptosis signaling by promoting fibroblast survival through the PI3K/Akt cascade [30]. This pro-survival effect of CALR on apoptosis could be related not only to expression changes, but also to CALR cellular localization. Therefore, in addition to CALR action at the endoplasmic reticulum level (ER), novel functions of this protein have been determined at the cell surface, in the cytosol and in the extracellular matrix [31]. Thus far, cell surface CALR has not been shown to have direct signaling capacity, but only to transduce intracellular signaling through the low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) in specific functions. Transmembrane signaling through the CALR/LRP1 co-complex stimulates random and directed cell migration, focal adhesion disassembly or resistance to anchorage-independence survival (anchorage dependence). Lack of CALR on the cell surface renders dying cancer cells

macrophages, and therefore, phagocytosis by dendritic cells is suppressed [52]. Based on these observations, CALR gene downregulation is not enough to understand the mechanism of CALR in the biology of sarcomatous tumors, because cellular activation of this protein needs to be established in these neoplasms.

The H3SE regulates a wide range of biological processes such as protein trafficking, signal transduction, metabolic control, apoptosis and cell cycle regulation, playing a significant role in the formation of malignant tumors [14]. Overexpressed 1433E promotes tumor cell growth and metastasis in vivo, being correlated with shortened overall lifespan and progression free survival [54]. On the other hand, decreased 1433E levels are associated with poor tumor prognosis in laryngeal carcinoma [35] and with an increased apoptosis in HT 29 cells [36]. Although Cao et al. demonstrated that 1433E expression increases with an increase of pathological grade of both meningiomas [37] and Ast [38] our data showed a significant 1433E decrease in both LgAe and HgAe. These apparent conflicting results might be related to differences between adult and pediatric sarcomatous tumors, or associated with different genetic 1433E spots that were not identified in our study.

1.2. Proteomic validation by western blotting

Proteomic validation by western blotting revealed in some cases a correlation in the protein expression pattern observed by proteomics. However, the extent of change observed by western blotting was weaker than that determined by 2D gels. Initially, this is related to the presence of distinct electrophoretic variants that were not identified by proteomics, which could be related to post-translational modifications and/or to the presence of different protein isoforms.

4.3. VIME, CALR and 1433E interactions

Protein-protein interaction networks have been extremely useful in understanding and predicting future states of a system, particularly in cancer. In interaction networks of VIME and 1433E revealed that most of its physical interactions they established were with proteins involved in cell signaling, gene transcription, apoptosis and mitosis regulation. Because distinct members of the 1433E protein family have shown to be increasing proteins of VIME and 1433E, we postulate possible expression changes of 1433E proteins in pediatric Aa. In fact, western blot studies showed lower 1433E levels in HgAe than in LgAe or in the control (Fig. 3C); however, increased expression levels of 1433E have been observed in diverse cancer types. While over expression of 1433E has been related to cancer initiation, progression and malignancy, experimental down regulation has markedly increased apoptosis, reduced cell proliferation and reverse endocrine resistance of breast cancer cells [37]. Also, knockdown of 1433E in invasive cancer lung cells has led to a reversal of epithelial-mesenchymal transition [39]. Based on this, 1433E has been proposed as a possible therapeutic target in cancer. The physiologic significance of decreased 1433E levels in pediatric Aa needs to be clarified.

As expected, CALR interactions showed that CALR interacts with proteins localized in the ER as PDIA3, CALB, GAP

TP5B and GR75. Similar to CALR, PDIA3 has been described as an ER resident protein, having a nuclear localization sequence (NLS) and entering the nucleus from the cytosol to alter transcription of target genes. PDIA3 downregulation and anti-sense expression are associated with a variety of cancers. PDIA3 over-expression is associated with low overall survival and recurrence free survival rates in cervical carcinoma. Experimental PDIA3 down-regulation has led to decreased cell cycle progression and inhibition of lung metastasis in a xenograft mouse model [40]. Notably, CALR interacts with transmembrane proteins including LRP1. A recent study showed that TGF β signaling through the GAL/ALP1 complex confers chemoresistance to cancer by means of the TGF β /Smad3 intermediate signaling pathway and by inhibiting apoptosis signaling [41]. Thus, another mechanism has been associated to prolonged survival of cells involved in fibroproliferative diseases, such as arthritis, atherosclerosis and extended myocardial survival involved in aging fibrosis [42].

4.4. miRNAs altered in pediatric sarcomas

In the present study, miRNA PCR Array System analysis revealed six down-regulated and twenty-one up-regulated miRNAs in tumors compared to the control tumor. miR-138 showed lower levels in pediatric LgAe than in LgAe or in the control, coinciding with down regulation of this miRNA in distinct types of cancer. Lower miR-138 levels have been associated with metastasis reduction [43] and with malignant Aa progression [42]. Recently, it was shown that miR-138 down-regulation led to increased VIME levels, which together with E-cadherin reduction led to down-regulated cell morphology and to enhanced cell migration and invasion of head and neck squamous cell carcinoma [26]. Our results revealed down regulation of miR-138 in both LgAe and HgAe as well as VIME over-expression (Fig. 3e-f). This suggests a possible regulatory action of miR-138 over VIME expression; however, further studies are necessary to establish a direct action of this miRNA regulating VIME levels. On the other hand, miR-138 over expression is also associated with poor adult glioma prognosis for survival, being a molecular signature of a subpopulation of tumor-initiating glioma stem cells [44].

Other miRNAs that displayed lower expression levels in tumors compared with the control tissue were miR-145, miR-219-5p, miR139-5p, miR-125b, and miR-129-3p. miR-145 is a tumor suppressive miRNA that targets c Myc and the growth receptor substrate 1 (GRB1), implicated in cellular differentiation when regulating pluripotency factors Oct4, Sox2 and Klf4 [45]. Different studies have shown that miR-145 expression depends on a cross-talk between p53 and cMYB [46], the latter important in the Aa activation [15]. Remarkably, miR-145 shows a strong correlation between its expression and the progression free survival of patients with LgAe and the overall survival of patients with GEM [46]. Similar to miR-145, miR-219-5p functions as tumor suppressive miRNA in distinct cancer types. The down regulation of miR-219-5p correlates with tumor size, histological differentiation and overall survival time in hepatocellular carcinoma (HCC) patients [47]. Besides, the miRNA expression profile of meningiomas demonstrated that the down-expression of

miR-200c-3p and miR-200b-3p is associated with advanced clinical stages of meningioma, as well as with higher recurrence rates in meningioma patients [60]. In vitro studies have shown that the re-establishment of miR-200c-3p levels inhibited HCC proliferation and arrested cell cycle at the G1 to S transition [40]. Also, in vitro miR-200c-3p over-expression inhibited U138 GBM cell proliferation and inhibited cell cycle entry formation [49]. Although changes in expression of miRNAs 139-5p, 125b, and 129-5p have been detected in various cancers and are also related to tumor malignancy [61,62], to our knowledge, participation of these miRNAs has not been associated with Aca. Thus, this is the first study that indicates a possible role of these miRNAs in the establishment, development and progression of these neoplasms.

Members of the 17-92a (miR-47; miR-92) and the 106-25 (miR-106; miR-23; miR-23) clusters were found up-regulated in pediatric Aca, and are strongly involved in the growth of cancer tumors [15,63]. Members of the 17-92a cluster are important regulators of the transcription factor E2F1, which regulates cell cycle through the retinoblastoma protein, whereas miRNAs of the 106-25 cluster regulate diverse elements of the TGF β /SMAD signaling pathway as well as p21 and Bmi1 which are related to cell cycle and apoptosis signaling [64]. Cluster members of 106-25 are involved in the proliferation and differentiation of the adult central nervous system, specifically in the neural stem/progenitor cell level [64]. In addition to 17-92a and 106-25 members, miRNAs 182, 183, 19a, 194, 194a, 193b, 21a, 200c-3p and 200c have been frequently associated with gliomas and bad prognosis [64-66]. Remarkably, although the remaining 17 up-regulated miRNAs (Table 1) are altered in cancer, none of them have been associated with astrocyte tumors [67]; so our data indicate for the first time the involvement of these miRNAs in pediatric Aca.

4.5 Altered miRNAs control networks of tumor

RNAi miRPath 2.0 database showed that the processes mainly controlled by altered miRNAs were focused on cell adhesion molecules, protein kinases, TGF β signaling pathway and other oncogenic pathways. miRNA targets participating in "pathways in cancer" touched the MAPK pathway, which is the principal cascade altered in gliomas. Also, ERK1, Wnt, SHH and TGF β signaling pathways have shown to be regulated at distinct levels by specific miRNAs with expression changes. Notoriously, all these pathways converge on cellular mechanisms which are hallmarks of cancer such as apoptosis evasion, proliferation, sustained angiogenesis, resistance to chemotherapy and insensitivity to anti-growth signals [68]. Interestingly, most of the miRNA targets interact physically with many of the proteins which exhibited expression changes by proteomic studies. These results are encouraging, in the sense that it is possible to make a fairly accurate prediction of the signaling pathways altered, starting from large-scale proteins and miRNA analysis. Although our results revealed changes on the expression of miRNAs miR-145, miR-148 and miR-149 that match with changes at the protein level (E2F, VEGF and p-Myc) in tumors, further studies are needed to establish a direct regulation of these miRNA over protein expression changes.

4.6 miRNAs possibly associated with tumor progression

In this study we found 22 miRNAs differentially expressed among tumor grades; 19 of them are predicted to be involved in glycosaminoglycan biosynthesis (chondroitin and heparan sulfate). Very interestingly, previous studies have demonstrated that heparan sulfate proteoglycans (HSPGs) are important, as they bind diverse extracellular proteins, including growth factors and cell adhesion molecules, regulating the activity of several ligand mediated signaling pathways. Alteration in enzymes that participated in the biosynthesis of these molecules could represent a process capable of promoting invasion and/or progression in GBM [67]. Based on this, further studies are necessary to elucidate the participation of these miRNAs regulating glycosaminoglycan biosynthesis and promoting progression and/or invasion in pediatric Aca.

Importantly, the over-expression of miR-145-3p and miR-822 in Hspat might be related to the diminished protein levels of Myc and PRDX6. Interestingly, miR-822 has only one experimentally target proved, PRDX6, a protein involved in the regulation of the phospholipid turnover. However, as mentioned above, many of miRNAs have not been linked to astrocyte tumors in cancer, therefore the study of these molecules could be relevant to determine their participation in the progression of cancer.

5. Conclusion

Altogether our results indicate that it is possible to make a fairly accurate prediction of different cellular processes altered in astrocyte tumors, starting from proteins and miRNAs with expression changes. It is suggested that some proteins and miRNAs we found with expression changes could be associated to possible prognostic or diagnostic biomarkers. Knowledge of molecular alterations of pediatric Aca using methodologies of large-scale analysis, contributes significantly to the understanding of these pediatric neoplasms.

Supplementary data to this article can be found online at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2011.09.009>

Conflict of interest

All authors have read and approved the submission to the journal and declare no conflict of interest.

Acknowledgments

This paper constitutes a partial fulfillment of the Graduate Program in Biological Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM). R. Ruiz-Espinoza-García acknowledges the scholarship (No. 267179) and financial support provided by the National Council of Science and Technology (CONACYT), and UNAM. This research was supported by SALUD 2009 CO1115296 (BASS-CONACYT) and U200877-RE0710/08.

We thank M. del C. Mirra-Aguilar, E. and Dr. Higuera-Almaza, J.L., for their technical assistance and Dr. Torres-Miguel, M.E., and Dr. Salcedo, R., Jr. reviewing the content of the manuscript. We declare no conflict of interest.

A.A.D., S.H.T., V.L.M.A. and R.G.R. designed the study; R.G.R. and V.L.M.A. performed experiments, analyzed data and wrote the paper; E.L.S. supervised its analysis and edited the manuscript; H.O.M. and M.E.C. performed protein identification and supervised its analysis, and D.R.J. and L.A.S. provided tumor samples and control tissue.

REFERENCES

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WC, Burger PC, Vogelstein A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol* 2007;114:97-109.
2. Bruchman A, Gajar A. Spinothalamic high-grade astrocytoma and diffuse leucocentric glioma: two challenges for the pediatric oncologist. *Neurologia* 2004;3:199-200.
3. Pohlmann S, Marthens G, Grotzer C, Jarrous B, Pichlerich S, Giese-Juppé B, Mazza A, et al. Childhood central nervous system tumour incidence and survival in Europe (1978-1997): report from the pan-European childhood cancer information system project. *Eur J Cancer* 2006;42:2064-66.
4. Ricard D, Ichikuni A, Durray F, Lafitte M, Young-Xu F, Delisle D. Primary brain tumours in adults. *Lancet* 2012;379:1089-96.
5. Qaddumi I, Sotter J, Bruchman A. Pediatric malignant gliomas and the need for new options for therapy: why and how? *Cancer Biol Ther* 2009;10:1-10.
6. Huse JT, Phillips MI, Vuceman CW. Whole-genome analysis of diffuse gliomas: seeing order in the chaos. *BMC Biol* 2011;9:110-9.
7. Hambardzumyan D, Squatrito M, Corfa L, Hatan M. Glioma formation, cancer stem cells, and cell signaling. *Stem Cell Res* 2009;4:507-17.
8. Joritz C, Pennington L, Hargrave D. Pediatric and adult malignant glioma: does order exist in the chaos? *Nat Rev Clin Oncol* 2011;7:400-13.
9. Delignon M, Metzger R, Sime L, Marillat H, Whittle IR. Glioma pathophysiology: insights emerging from genomics. *Brain Res* 2009;1240:61-70.
10. Bruchman C, Mochizuki H, Hambardzumyan D, Grews T, Tindorf A, Jeddan A, et al. Glioblastoma subclones can be defined by activity among a gene transcription pathway and associated genomic alterations. *PLoS One* 2009;4:e7777.
11. Anagnostouliakis AK, Linnis SE, Papadimitrakou C, Broukalaki M, Anagnostouliakis E, Voulgaris K, et al. Proteinase activities in childhood glioblastoma. *J Proteome Res* 2011;10:2565-65.
12. Eutman KJ, Yang BR. The involvement of microRNAs in malignant transformation. *World Neurology* 2012;3:1262-70.
13. Dulac AM, Mack S, Duvicange A, Mouton SA, Tachet MD. The significance of brain tumours. *Methods Mol Biol* 2012;91:139-55.
14. Sills DK, Butler VN, Denson AM, Hunsberger M, Vitharana S, Frazier NE. Survey of microRNA expression in pediatric brain tumors. *Pediatr Blood Cancer* 2011;56:211-6.
15. Uozumi H, Bishof IM, Vornik M, Lulla M, Wang M, Sridhar S, et al. New. Treatment of microRNAs as potential prognostic markers in glioblastoma. *PLoS One* 2011;6:e27014.
16. Wang X, Zhang H, Zhang A, Hu L, Wang K, Liu R, et al. Upregulation of miR-30b and miR-106b is involved in the regulation of malignancy of pediatric brainstem gliomas. *Neuro Rep* 2011;32:1274-76.
17. Beggs AW, Clark GW, Thirumangalakudi R, Yu M, Thirumangalakudi R. Coevolution reveals a network of human proteins co-occurring with multifaculty. *Mol Biol Evol* 2012;29:262-66.
18. Pansani V, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2011;126:103-7-20.
19. Encarnacion S, Hernandez M, Martinez-Salazar C, Coimbra E, Vargas-Lobos C, Maza J. Comparative proteomics using 2-D gel electrophoresis and mass spectrometry as tools to detect alterations and regulate in bacteria with sequenced or partially sequenced genomes. *Electron J Biotechnol* 2008;11:17-25.
20. Perkins DM, Pappin DJ, Creasy DM, Cottrell B. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 1999;20:3571-77.
21. The Jcoprot Consortium. The universal protein resource (UniProt). *Nucleic Acids Res* 2008;36:D100-5.
22. Schaefer MS, Penton J, Wang Y, Torres P, Wanker EE, Andrade-Navarro MA. HIPPET: integrating protein interaction networks with experiment-based quality scores. *Nat Protoc* 2011;6:1030-6.
23. Sherman P, Mariani A, Oriani F, Baliga NI, Wang Y, Wang D, et al. Cytoscope: a software environment for integrated models of cellular molecular interaction networks. *BMC Syst Biol* 2008;15:1498-504.
24. Volkerstorfer Flores MA. Calcitonin receptor-related protein immunolocalization by protein kinase C activation. *Symposium* 2011;65:1331-4.
25. Vlachos IS, LiANA, mitchell V. An investigating the combinatorial effect of microRNAs in pathways. *Nucleic Acids Res* 2011;39:5948-504.
26. Yamashita T, Seo N, Yamada Y, Yamamoto T, Hatake E, Chiyomura T, et al. Tumor suppressor miR-133b contributes to cell migration and invasion through its targeting of annexin A2 in oral esophageal carcinoma. *Int J Oncol* 2007;31:876-87.
27. Van Herckelen K, Tilletier K, De Ceuninck M, De Keyser F, Flawell D, Deforce D. Circulation-related rheumatoid arthritis antigen in immune complexes from a patient with a rheumatoid arthritis patient with antibodies against circulation proteins. *Arthritis Res Ther* 2009;11:R132.
28. Jang H, Lee YH, Cho YC, Park M, Kim J, Cho YG, et al. A miR-133b target, perlecanin-1, determines the physiological roles of a class vii collagen in bone. *Altered multifunction of proteoglycan and neurodegenerative diseases. Biochem J* 2002;365:93-99.
29. Okumura T, Ueda Y, Goto S, Matsuo T, Mizuno S, Tsutsumi K, et al. Calcitonin receptor-related protein in the endoplasmic reticulum modulates microendocytosis of human glioblastoma U251MG cells. *Cancer Res* 2009;69:662-71.
30. Corrales-Munoz G, Belmont V, Martin-Negroni J, Ichikawa H, Lopez S, Rodriguez P, et al. HDL acetylase activity prevents smooth muscle cell apoptosis: potential new antiatherogenic property. *Circ Res* 2009;105:1176-83.
31. Cho KM, Hwang CA, Kwon TS, Murphy-Thorne JP. Thrombospondin signaling through the calcitonin receptor-related protein co-receptor complex controls randomized directed cell migration. *J Cell Sci* 2009;122:987-97.
32. Panatier H, Sopp U, Beckhofs U, Bissler A, Bjerkedal AC, Chaurain DC, et al. Mechanism of coxsackovirus-induced apoptosis in immunogenic cell death. *EMBO J* 2005;24:578-90.
33. Seetharam M, Finkbeiner S, Shih A, Fisher AD. Intracellular targeting of p53 to the nucleus requires MDM2 activity and binding to 14-3-3. *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C133-41.
34. Ko SS. Overexpression of p53-dependent tumor suppressor and pro-apoptosis in hepatocellular carcinoma. *Pathobiology* 2011;78:307-11.
35. Cho KM, Cho H, Ko SS, Shung H, Kim H, Park W, et al. Deletion contributes to tumor suppression in hepatocellular carcinoma.

- carcinoma by affecting apoptosis and invasion. BMC Cancer 2010;10:266.
- [38] Liu J, Chen D, Jia S, Wu SS. Neuroendocrine and inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by up-regulating p53 expression. Cancer Res 2010;70:1075-81.
- [39] Cao J, Cao JZ, Zhang W, Liu H, Song X, Shen J, et al. Identification of 14-3-3 protein isoforms in human osteosarcoma by microarray and bioinformatic analysis using bioinformatics. J Cell Biochem 2010;97:102-109.
- [40] Li Y, Tian BF, Li YM, Li WJ, Cao J, Yang XJ, et al. The expression of seven 14-3-3 isoforms in human osteosarcoma. J Cell Biochem 2010;97:96-102.
- [41] Chen CB, Chuang SH, Yang MF, Liao WJ, Yu SL, Chen JY, et al. Novel function of TWIST2: controls cell proliferation and cancer metastasis. Mol Cancer Res 2012;19:1112-21.
- [42] Liao Q, Wu H, Huang YH, Cheng TC, Wang CS, Tsai MH, et al. Choxc, a regulated protein 32, modulates cell invasion and serves as a prognostic marker for cervical cancer. Cancer Sci 2010;101:225-33.
- [43] Keller MK, Kiderlen J, Schlegl M, Herberich B, Thomsen J, et al. Transcription factor p53 and p21^{ras} regulate resistance to matrix (MMP)-14 and p21^{ras} invasion. J Cell Physiol 2010;193:101-110.
- [44] Li T, Chen P, Li XY, Zhang Y, Wang W, Chen M, et al. Tissue-specific expression profiles of miRNAs in 2166 and screening strategy in human genes. J Cell Biochem 2011;102:77-82.
- [45] Chen XH, Nana S, Gupta P, Rask P, Ramasamy S, Suresham G, et al. Targeting glioma stem cells by functional inhibition of a putative stem cell niche in malignant gliomas. Cell Rep 2012;2:891-902.
- [46] Sachdeva M, Zhai S, Wang W, Wu J, Wilder P, Kumar S, et al. p43 suppresses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-143. Proc Natl Acad Sci U S A 2008;105:209-12.
- [47] Takahashi T, Shirota Y, Inagawa H, Inoue T, Ogasawara M, et al. Forced expression of miR-143 suppresses c-Myc and p53 signaling in concert with miR-145 in gliomas of ApoE-deficient mice. PLoS One 2010;5:e12117.
- [48] Speranza MC, Satali V, Picoli F, Kaptein D, Novati P, Belli M, et al. NEDD9, a novel target of miR-143, increases the invasiveness of glioblastoma. Oncotarget 2012;3:22-34.
- [49] Huang N, Shi J, Han J, Li N, Qiang H, Liu S, et al. MiR-143-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. J Cell Biochem 2012;106:82-91.
- [50] Shi J, Chen H, Wang X, Shi W, Song Y, Chen K, et al. A microRNA expression signature predicts meningioma aggressiveness for clinical prognosis. PLoS One 2010;5:e12117.
- [51] Ren SA, Shen W, Sun J, Sun J, Li F. Genome-wide expression profiling identifies downregulated miRNAs in rat glioblastoma. Mol Biol 2010;20:1404-17.
- [52] Wu X, Wang L, Li X, Guo C, Fu SH, Jin M, et al. Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal-cell carcinoma metastasis and prognosis. PLoS One 2012;7:e35881.
- [53] Smith AJ, Swann JR, Deane DJ, Mearns DS, Vural B, Fan AC, et al. The miR-10b-25 cluster targets Smad3, activates TGF-beta signaling and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Shc1 in human breast cancer. Oncogene 2012;31:5182-91.
- [54] Walter M, Wehrhahn A, Hecker H, Wehrhahn M, Voggenrefer G, et al. MicroRNA-92 (miR-92) as a VEGF gene expression and the hypoxic activation of miR-92 in a mouse model of cell carcinoma. J Cancer 2011;2:375-85.
- [55] Gu X, Zhang W, Ning G, Liu Y. MicroRNA-92a inhibits human brain glioma cell growth by down-regulation of Stat3. J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci 2012;32:370-4.
- [56] Yang J, Wang Q, Qiu C, Song Z, Fu F, Zhang A, et al. A predicted miR-27a-mediated network identifies a signature of glioma. Oncol 2012;22:1227-36.
- [57] Hong J, Sun X, Wang W, Jin X, Bo X, Li Z, et al. Tumor microRNA-92b expression is associated with poor prognosis in human glioma. Mol Biol 2009;21:107-12.
- [58] Winkler GJ, Koch I, Wood B, Wray A, Dougherty GJ, Miyajima M, et al. A cell cycle regulator of the ErbB receptor signaling pathway: a candidate for cancer chemoprevention. Cancer Res 1997;57:449-54.
- [59] Phillips B. Novel therapeutic targets in the brain tumor microenvironment. Oncotarget 2012;3:1538-75.

Discusión

El análisis reveló diversas proteínas con cambios en su expresión, sin embargo, nos enfocamos en las proteínas que resultaron con mayor número de interacciones en nuestro análisis (“hub proteins”) VIME, CALR y 1433E.

En el presente trabajo, los niveles de VIME resultaron elevados en ambos grupos de tumores (AstBg y AstAg) respecto al tejido control, correlacionando con el incremento de esta proteína en distintos tipos de cáncer en los que se le ha relacionado con el crecimiento tumoral, invasión y metástasis. Interesantemente estos procesos pueden ser atenuados regulando la expresión de VIME de manera experimental [115]. Asimismo, los análisis proteómicos mostraron la presencia de diferentes entidades electroforéticas en los tumores, las cuales correspondieron a variantes de VIME, variante 3 (VIME3) y variante 4 (VIME4) así como posibles modificaciones post-traduccionales ya que el patrón proteico del gel 2D SDS-PAGE mostró puntos isoelectricos más ácidos (pI~4.0) (Fig. 5A–B Artículo). Formas ácidas de la VIME (citrulinación) [116] han sido descritas en diversos padecimientos como la artritis reumatoide, Alzheimer, enfermedad de Creutzfeldt–Jakob y la esclerosis múltiple [117]. Hasta nuestro conocimiento, la citrulinación de la VIME, así como la presencia de las variantes 3 y 4 no ha sido muy estudiada en cáncer, por lo que estudios futuros son necesarios para establecer sus implicaciones en Ast pediátricos.

Similar a la VIME, el análisis proteómico demostró que los niveles de expresión de CALR mostraron ser mayores respecto a los tejidos control, sin embargo, el análisis por western blot mostro un incremento significativo solo de en los AstBg (Fig. 1B Artículo). Distintas líneas de investigación han demostrado que la sobre expresión de CALR induce apoptosis en distintas líneas celulares incluyendo células U251 de GBM [118], contradictoriamente otros estudios han demostrado que CALR inhibe la señalización de la apoptosis al inducir la cascada de sobrevivencia mediada por PI3K/AKT [119]. Estos datos contradictorios de CALR sobre la apoptosis pueden estar relacionados no solo con los cambios en la expresión, sino también con la localización de la CALR. Asimismo, además de la

acción de CALR a nivel de retículo endoplásmico (ER) donde desempeña su acción canónica, se han determinado nuevas funciones para esta proteína a nivel de superficie celular y matriz extracelular [120]. CALR en la superficie celular es capaz de transducir señales a través del receptor relacionado con lipoproteínas de baja densidad 1 (LRP-1). La vía de señalización de Trombospodin a través del complejo CALR/LRP-1 estimula la migración celular, al inducir la separación de adhesiones focales o la resistencia a la supervivencia independiente del anclaje proceso denominado como “anoikis”. La ausencia de CALR en la superficie celular hace morir las células cancerosas no inmunogénicas, y por lo tanto, la fagocitosis por las células dendríticas se suprime [121]. Basándose en estas observaciones, la determinación de los niveles de CALR no son suficientes para comprender la participación de CALR en la biología de los tumores astrocíticos, por lo que, la localización celular de esta proteína se debe establecer en estas neoplasias.

La proteína 14-3-3E regula una amplia gama de procesos biológicos tales como el tráfico de proteínas, la transducción de señales, el control del metabolismo, la apoptosis y la regulación del ciclo celular, procesos que desempeñan un papel fundamental en la formación de tumores malignos [122]. La sobreexpresión de 14-3-3E se ha comprobado que promueve el crecimiento anormal y metástasis de las células cáncer, lo cual es de mal pronóstico ya que se ha correlacionado con una pobre esperanza de vida a corto plazo [123]. Por otra parte, la disminución de los niveles de esta proteína se han asociado con mal pronóstico para pacientes con carcinoma de laringe [124] y con un aumento de la apoptosis en células HT-29 [125]. Aunque Cao *et al.* demostraron que en meningiomas de adultos la expresión de 14-3-3E aumenta en relación con el grado del tumor [126], nuestros datos de tumores pediátricos, mostraron una disminución significativa de 1433E tanto en AstBg y AstAg. Estos resultados contradictorios aparentes podrían estar relacionados con las diferencias que se han reportado para los tumores Ast entre adultos y niños.

Interactoma de VIME, CALR y 1433E

Las redes de interacción proteína-proteína han sido de gran utilidad para comprender y predecir los estados futuros de un sistema, en particular en el cáncer. Las redes de interacción realizadas para de VIME y 14-3-3E revelaron que la mayoría de las interacciones físicas que establecen son con las proteínas implicadas en la señalización celular, la transcripción de genes, la apoptosis y la regulación de la mitosis. Debido a que distintos miembros de la familia de las proteínas de 14-3-3 interactúan con VIME y 14-3-3E, postulamos posibles cambios en la expresión de proteínas de la familia 14-3-3 en Ast pediátrica. De hecho, los estudios de western blot mostraron que los niveles más bajos de 14-3-3Z se encuentran en los AstAg respecto a los que en AstBg o en el control (Fig. 5C Artículo). Sin embargo, se ha observado aumento de los niveles de expresión de 14-3-3Z en diversos tipos de cáncer. Mientras que sobre-expresión de 14-3-3Z se ha relacionado con la promoción del cáncer, la progresión y la malignidad, la regulación a la baja de esta proteína ha probado favorecer notablemente la apoptosis, reducir la proliferación celular y la resistencia de células de cáncer de mama [126]. Además, se ha demostrado que la desregulación de 14-3-3Z puede promover la transición epitelio-mesenquima [127]. Basado en esto, se ha propuesto a esta proteína como una posible diana terapéutica en cáncer. La importancia fisiológica de la disminución de los niveles 14-3-3Z en Ast pediátrica debe ser estudiado a fondo. Por otra parte, el interactoma de CALR mostró, como era de esperarse, que CALR interactúa con proteínas localizadas en el RE como PDIA3, CALX, TAP1 TPSN y GRP75.

Similar a CALR, PDIA3 ha sido descrito como una proteína residente del ER, que tiene una secuencia de localización nuclear que le permite entrar al núcleo desde el citosol para modular la transcripción de los genes diana. La desregulación y expresión variable de PDIA3 se asocian con una variedad de tipos de cánceres. La sobreexpresión de PDIA3 se asocia con una pobre supervivencia y una baja sobrevida libre de recurrencia en carcinoma de cuello uterino. Experimentalmente, la regulación a la baja de PDIA3 da lugar a una disminución de la invasividad de células HeLa y la inhibición de la metástasis de pulmón en xenotrasplantes de

ratón [128]. En particular, CALR interactúa con proteínas transmembranales como LRP1. Un estudio reciente mostró que TSP1 lleva a cabo señalización a través del complejo CALR/LRP1, lo cual confiere resistencia a la anoikis en fibroblastos por medio de la vía de señalización de PI3K/Akt y por inhibición de la señalización de apoptosis [129]. Entonces, la resistencia a la anoikis se ha asociado a supervivencia prolongada de las células implicadas en las enfermedades proliferativas, tales como la artritis, la aterosclerosis y la fibrosis pulmonar [130].

MiRNAs alterados en Ast pediátricos

En el presente estudio, se realizó un RT² miRNA PCR array, el cual reveló seis miRNAs regulados a la baja y veintiséis miRNAs a la alta en los tumores en comparación con el tejido control. En el caso del miRNA miR-138 reportamos niveles más bajos en AstBg respecto a los AstAg o en el control, importantemente en la literatura sea reportado la regulación a la baja de este miRNA en distintos tipos de cáncer. Niveles a la baja de miR-138 se han asociado con la inducción de metástasis [117] y con la progresión maligna de gliomas pediátricos [130]. Recientemente, se demostró que la regulación a la baja de este miRNA conduce a un aumento de los niveles de VIME, que junto con la reducción de E-cadherina llevó a las células mesenquimales a la migración e la invasión celular en carcinoma de células escamosas del cuello [117]. Nuestros resultados revelaron la regulación a la baja del miR-138 en ambos grupos de tumores AstBg y AstAg, así como la sobre-expresión de VIME (Fig. 5A – B Artículo). Esto sugiere una posible acción reguladora del miR-138 sobre la expresión de la VIME, sin embargo, son necesarios más estudios para establecer una acción directa de la regulación de los niveles de VIME por este miRNA. Por otro lado, la sobre expresión de miR-138 también se asocia con un mal pronóstico para los glioma de adulto, siendo una molécula clave para la iniciación de una subpoblación de células iniciadoras del tumor glial [131]. Otros miRNAs que mostraron niveles bajos de expresión en todos los tumores comparado con el tejido control fueron miR-145, miR-219- 5p, miR139- 5p, miR- 1259 y miR-129-3p. MiR- 145 es un miRNA supresor tumoral que regula a c- Myc y al sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1), implicado en la

diferenciación celular y en la regulación de factores de pluripotencia como Oct4 , Sox2 y KLF [44]. Diferentes estudios han demostrado que la expresión de miR-145 depende de una estrecha relación entre p53 y C/EBP beta, este último importante en la activación de Akt [132]. Sorprendentemente, miR-145 muestra una fuerte correlación entre la expresión y la supervivencia libre de progresión de los pacientes con AstBg y la supervivencia global de los pacientes con GBM [132].

Al igual que miR-145, miR -219- 5p es considerado como un miRNA supresor de tumores. La regulación a la baja de este miRNA correlaciona con el tamaño tumoral, la diferenciación histológica y el tiempo de supervivencia global en pacientes con carcinoma hepatocelular (HCC) [133]. Asimismo, un estudio en el que se evaluó el perfil de expresión de diversos miRNAs en meningioma demostró que la expresión a la baja de miR-29c-3p y miR- 219- 5p se asocia con estadios clínicos avanzados de estos tumores, así como con altas tasas de recurrencia en estos pacientes [134]. Los estudios in vitro han demostrado que el restablecimiento de los niveles de miR-219-5p en HCC inhibe la proliferación y el arresto del ciclo celular en la transición del ciclo celular en G1 [133]. Además, la sobreexpresión in vitro de miR-219-5p inhibe la proliferación de células U138 de GBM [130]. Aunque los cambios en la expresión de los miRNAs 139-5p, 1259 y 129-3p han sido reportados en varios tipos de cáncer, es importante destacar que estos cambios están muy relacionados con la agresividad de estos tumores [136-137] importantemente, la participación de estos miRNAs no han sido asociado con gliomas pediátricos. Por lo que, este es el primer estudio que indica un posible papel de estos miRNAs en la formación, el desarrollo y la progresión de estos tumores.

Por otra parte en nuestro análisis, los miRNAs miembros de la familia 17-92a (miR-17, miR-92) y los miembros de la familia 106-25 (miR-106, miR-93, miR-25) se encontraron sobre-expresados en Ast pediátricos, interesantemente estos miRNAs están fuertemente involucrados en el crecimiento de los tumores [138-139].

Los miembros de la familia 17-92a son importantes reguladores del factor de transcripción E2F1, que regula el ciclo celular a través de la proteína del

retinoblastoma (RB), mientras que los miRNAs del clúster 106-25 regulan diversos elementos de la vía de señalización de TGF-SMAD, así como p21 y BIM que son miembros importantes del ciclo celular y la señalización de la apoptosis [51]. Los miembros del clúster de 106-25 están involucrados en la proliferación y la diferenciación del sistema nervioso central adulto, específicamente a nivel de células madre y/o progenitoras neurales [138]. Además de los miembros de las familias 17-92a y 106-25, los miRNAs 182, 126, 15 bis, 134, 134a, 130b, 27a, 342-3p y 335 que también se encontraron sobre-expresados en nuestro análisis, se han asociado con mal pronóstico en gliomas [130-141]. Cabe destacar que, aunque los restantes 17 miRNAs sobre-expresados (Tabla 1 Artículo) se han reportado alterados en distintos tipos de cáncer, ninguno de ellos ha sido asociada con los tumores astrocíticos [58], de modo que nuestros datos indican por primera vez la participación de estos miRNAs en Ast pediátricos.

Los miRNAs con cambio en su expresión regulan diversos “hallmarks” del cáncer

Al analizar los miRNAs con cambios en su expresión mediante la base de datos DIANA-miRPath v.2 encontramos que los procesos controlados principalmente por estos miRNAs se centraron en las moléculas de adhesión celular, las enfermedades causadas por priones, la vía de señalización de TGF -beta y otras vías oncogénicas. Los mRNAs blanco de dichos miRNAs participan principalmente en "vías relacionadas con el cáncer " por lo que decidimos analizar a fondo estas vías en conjunto. Interesantemente una de las principales vías de señalización alteradas como era de esperarse fue la vía MAPK. Asimismo, las vías LMNC1, Wnt, SHH y TGF mostraron estar siendo reguladas por estos miRNAs en distintos niveles. Notoriamente, todas estas vías convergen en mecanismos celulares que son característicos del cáncer, tales como la evasión de la apoptosis, la proliferación, la angiogénesis, la resistencia a la quimioterapia y la insensibilidad a las señales de anti-crecimiento [140]. Interesantemente, la mayoría de los mensajeros regulados por los miRNAs con cambio en su expresión interactúan físicamente con muchas de las proteínas que presentaron cambios en su

expresión en los estudios proteómicos realizados en el presente trabajo. Estos resultados son alentadores, ya que es posible hacer una predicción bastante precisa de las vías de señalización alterada, a partir de análisis de proteínas y miRNAs a gran escala. Aunque nuestros resultados revelaron cambios en la expresión de miRNAs miR-145, miR-138 y miR-34a que coinciden con los cambios a nivel de las proteína BAX, VIME y C-Myc en los tumores, se necesitan más estudios para establecer una regulación directa de estos miRNA sobre los cambios de expresión de proteínas.

MiRNAs posiblemente asociados con la progresión tumoral

En este estudio encontramos 22 miRNAs expresados diferencialmente entre los distintos grados tumorales; 12 de ellos se predice mediante DIANA-miRPath v.2 que participa en la biosíntesis de glicosaminoglicanos (condroitina y heparan sulfato). Interesantemente, existen estudios que han demostrado que los proteoglicanos son de suma importancia que ya que pueden regular la actividad de diversas vías de señalización mediadas por ligandos al unir diversas proteínas extracelulares, incluyendo factores de crecimiento y moléculas de adhesión celular. La alteración de las enzimas que participan en la biosíntesis de estas moléculas podría representar un proceso capaz de promover la invasión y/o progresión de GBM [140]. Con base a esto, son necesarios más estudios para dilucidar la participación de estos miRNAs regulan en la biosíntesis de glicosaminoglicanos y la promoción de la progresión y/o invasión de Ast pediátricos. Es importante destacar que la sobre expresión de miR-34c-5p y miR-632 en AstAg podría estar relacionado con la disminución de los niveles de las proteína c-Myc y PRDX6. Curiosamente, miR-632 tiene un solo blanco experimentalmente probado, PRDX6, la cual es una proteína implicada en la regulación del recambio de fosfolípidos. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, muchos de estos miRNAs no se han sido asociados con Ast o cáncer, por lo tanto, el estudio de estas moléculas podrían ser relevantes para determinar su participación en la progresión del cáncer. Asimismo estas moléculas

podían servir como biomarcadores de pronóstico y diagnóstico así como nuevos blancos terapéuticos.

En conjunto, nuestros resultados indican que es posible hacer una predicción bastante exacta de diferentes procesos celulares alterados en los tumores astrocíticos, a partir de las proteínas y miRNAs con cambios de expresión. Se ha sugerido que algunas proteínas y miRNAs que encontramos con cambios de expresión, podrían ser postulados como posibles biomarcadores pronóstico o diagnóstico. El conocimiento de las alteraciones moleculares en Ast pediátricos utilizando metodologías de análisis a gran escala, contribuye de manera significativa a la comprensión de estos tumores pediátricos, abriendo nuevas posibilidades en la búsqueda de biomarcadores y mejores terapias para tratar estas patologías.

Bibliografía

- 1.- Daniel P. Cardinali. 2007. NEUROCIENCIA APLICADA. Sus fundamentos EDICION: 1ª PÁGINAS: 528
- 2.- Kandel, Eric R., Principios de neurociencias. McGraw-Hill / Interamericana de España, 1ª ed páginas 1472.
- 3.- Wang DD, Bordey A. The astrocyte odyssey. Prog Neurobiol. 2008; 86:342-67.
- 4.- Kimelberg HK. Functions of mature mammalian astrocytes: a current view. Neuroscientist 2010;16:79-106.
- 5.- Pereira A Jr, Furlan FA. Astrocytes and human cognition: modeling information integration and modulation of neuronal activity. Prog Neurobiol 2010;92:405-20.
- 6.-Broniscer A, Gajjar A. Supratentorial high-grade astrocytoma and diffuse brainstem glioma: two challenges for the pediatric oncologist. Oncologist 2004; 9:197-206.
- 7.- López-Aguilar E, Sepulveda-Vidosola A.C, Betazos-Cabrera Y, Rocha-Moreno Y.G, Gascon-Lastiri G, Rivera-Marquez H, *et al.* Phase II Study of Metronomic Chemotherapy with Thalidomide Carboplatin-Vincristine-Fluvastatin in Treatment of Brain Stem Tumors in Children. Archives of Medical Reserch 2008;39: 655-662.
- 8.-Ohgaki H, Kleihues P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. J Neuropathol Exp Neurol 2005; 64:479-89.
- 9- Kleihues P, Cavenee WK. Pathology and Genetics.Tumor of the Nervus System. World Health Organization Classification of Tumours. IARCPress Lyon,2000.
- 10.- Grovas A, Fremgen A, Rauck A, Ruymann FB, Hutchinson CL, Winchester DP, *et al.* The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. Cancer 1997; 80:2321-32.
- 11.- Peris-Bonet R, Martínez-García C, Lacour B, Petrovich S, Giner-Ripoll B, Navajas A, *et al.* Childhood central nervous system tumours--incidence and survival in Europe (1978-1997): report from Automated Childhood Cancer Information System project. Eur J Cancer 2006; 42:2064-80.
- 12.-Pong WW, Gutmann DH. The ecology of brain tumors: lessons learned from neurofibromatosis-1. Oncogene 2011; 30:1135-46.
- 13.-Qaddoumi I, Sultan I, Broniscer A. Pediatric low-grade gliomas and the need for new options for therapy: Why and how? Cancer Biol Ther 2009; 8:4-10.

14.-Jänisch W, Schreiber D, Martin H, Gerlach H Diencephalic pilocytic astrocytoma with clinical onset in infancy. Biological behavior and pathomorphological findings in 11 children. Zentralbl Allg Pathol 1985; 130:31-43.

15- Bristol R.E. Low-Grade Glia Tumores: Are They All the Same? Semin Pediatr Neurol 2009; 16:23-6.

16.-Wong K.K, Chang M.Y, Tsang Y.T.M, Perlaky L, Su J, Adesina A, *et al.* Expression Analysis of Juvenile Pilocytic Astrocytomas by Oligonucleotide Microarray Reveals Two Potential Subgroups. Cancer Res 2005; 65:76-84.

17.- Listernick R, Ferner RE, Liu GT, Gutmann DH. Optic pathway gliomas in neurofibromatosis-1: controversies and recommendations. Ann Neurol 2007; 61:189-98.

18.- Bajenaru ML, Zhu Y, Hedrick NM, Donahoe J, Parada LF, Gutmann DH. Astrocyte-specific inactivation of the neurofibromatosis 1 gene (NF1) is insufficient for astrocytoma formation. Mol Cell Biol 2002; 22:5100-13.

19.- Zhu Y, Harada T, Liu L, Lush ME, Guignard F, Harada C, *et al.* Inactivation of NF1 in CNS causes increased glial progenitor proliferation and optic glioma formation. Development 2005; 132:5577-88.

20.-Broniscer A, Baker J. S, West N.A, Fraser M.M, Proko E, Kocak M, *et al.* Clinical and Molecular Characteristics of Malignant Transformation of Low-Grade Glioma in Children. Journal Of Clinical Oncology 2007; 25:682-689.

21.- Heideman L.R, Kuttesch J, Gajjar J. A, Walter W.A, Jenkis J. J, Li Y, Sanford A.R, *et al.* Supratentorial Malignant Gliomas in Childhood. American Cancer Society 1997;80: 497-509.

22.-Park K. C, Jung H. Ji, Park H. S, Jung W. H, and Cho K.B. Multifarious proteomic signatures and regional heterogeneity in glioblastomas. J. Neurooncol 2009; 94:31-39.

23.- Furuta M, Weil J.R, Vortmeyer O. A, Huang S, Lei J, Huang N.T, *et al.* Protein patterns and protein that identify subtypes of glioblastoma multiforme. Oncogen 2004; 23:6806-6814.

- 24.-Stuart ET, Kioussi C, Aguzzi A, Gruss P. PAX5 Expression Correlates with Increasing Malignancy in Human Astrocytomas. Clin. Cancer Res 1995; 1:2007-214.
- 25.- Cenci C, Barzotti R, Galeano F, Corbelli S, Rota R, Massimi L, *et al.* Down-regulation of RNA Editing in Pediatric Astrocytomas. J Biol Chem 2008; 283: 7251-7260.
- 26.-Chang CA, Heirricke H, Orrego E and Sánchez J. Acta Cancerológica 2000; 30:56-64.
- 27.- Hambardzumyan D, Squatrito M, Carbajal E, Holland EC. Glioma formation, cancer stem cells, and akt signaling. Stem Cell Rev 2008; 4:203-10.
- 28.- Jones C, Perryman L, Hargrave D. Pediatric and 535 adult malignant glioma: close relatives or distant cousins? Nat Rev Clin Oncol 2012; 9:400-413.
- 29.- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell 2000; 100:57-70.
- 30.- Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell. 2011; 144:646-74.
- 31.-Li Z, Wang H, Eyler CE, Hjelmeland AB, Rich JN. Turning cancer stem cells inside out: an exploration of glioma stem cell signaling pathways. J Biol Chem 2009;19:16705-9.
- 32.-Franco-Hernández C, Martínez-Glez V, and Rey J.A. Biología molecular de los glioblastomas. Neurocirugía 2007; 18:373-382.
- 33.- Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. Stem Cells 2008; 26:3018-26.
- 34.- Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, Madsen PJ, Slaunwhite E, Choudhari N, *et al.* Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. Proc Natl Acad Sci U S A 2010; 110:5957-62.
- 35.- Kaul A, Chen YH, Emmett RJ, Gianino SM, Gutmann DH. Conditional KIAA1549:BRAF mice reveal brain region- and cell type-specific effects. Genesis 2013;51:708-16.

- 36.- Sievert AJ, Lang SS, Boucher KL, Madsen PJ, Slaunwhite E, Choudhari N *et al.* Paradoxical activation and RAF inhibitor resistance of BRAF protein kinase fusions characterizing pediatric astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013; 110:5957-62.
- 37.- Cykowski MD, Allen RA, Kanaly AC, Fung KM, Marshall R, Perry A, *et al.* The differential diagnosis of pilocytic astrocytoma with atypical features and malignant glioma: an analysis of 16 cases with emphasis on distinguishing molecular features. *J Neurooncol* 2013. [Epub ahead of print].
- 38.- Hawkins C, Walker E, Mohamed N, Zhang C, Jacob K, Shirinian M, *et al.* BRAF-KIAA1549 fusion predicts better clinical outcome in pediatric low-grade astrocytoma. *Clin Cancer Res* 2011; 17:4790-8.
- 39.- Forsheew T, Tatevossian RG, Lawson AR, Ma J, Neale G, Ogunkolade BW, *et al.* Activation of the ERK/MAPK pathway: a signature genetic defect in posterior fossa pilocytic astrocytomas. *J Pathol* 2009;218:172-81.
- 40.-Sintupisut N, Liu PL, Yeang CH. An integrative characterization of recurrent molecular aberrations in glioblastoma genomes. *Nucleic Acids Res* 2013; 41:8803-21.
- 41.- Wu SM, Choo AB, Yap MG, Chan KK. Role of Sonic hedgehog signaling and the expression of its components in human embryonic stem cells. *Stem Cell Res* 2010; 4:38-49.
- 42.-Xin Y, Hao SY, Tian YJ, Zhang JT, Wu Z, Wan H, *et al.* Expression and significance of sonic hedgehog signaling pathway-related components in brainstem and supratentorial astrocytomas. *Chin Med J* 2011; 124:3515-20.
- 43.- Xu Q, Yuan X, Liu G, Black KL, Yu JS. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. *Stem Cells* 2008; 26:3018-26.
- 44.- Fan X, Khaki L, Zhu TS, Soules ME, Talsma CE, Gul N, *et al.* NOTCH pathway blockade depletes CD133-positive glioblastoma cells and inhibits growth of tumor neurospheres and xenografts. *Stem Cells* 2001; 28:5-16.

45.-Wang J, Wakeman TP, Lathia JD, Hjelmeland AB, Wang XF, White RR, *et al.* Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 2010; 28:17-28.

46- Sareddy GR, Panigrahi M, Challa S, Mahadevan A, Babu PP. Activation of Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway in human astrocytomas. *Neurochem Int* 2009; 55:307-17.

47- Sareddy GR, Challa S, Panigrahi M, Babu PP. Wnt/beta-catenin/Tcf signaling pathway activation in malignant progression of rat gliomas induced by transplacental N-ethyl-N-nitrosourea exposure. *Neurochem Res* 2009; 34:1278-88.

48.-Yang Z, Wang Y, Fang J, Chen F, Liu J, Wu J, *et al.* Downregulation of WIF-1 by hypermethylation in astrocytomas. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010;42:418-25.

49.-Piccirillo SG, Vescovi AL. Bone morphogenetic proteins regulate tumorigenicity in human glioblastoma stem cells. *Ernst Schering Found Symp Proc* 2006; 5:59-81.

50.- Piccirillo SG, Reynolds BA, Zanetti N, Lamorte G, Binda E, Broggi G, *et al.* Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* 2006;444:761-5.

51.-Lang FF, Miller DC, Koslow M, Newcomb EW. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J Neurosurg* 1994; 81:427-36.

52.-Gan HK, Kaye AH, Luwor RB. The EGFRvIII variant in glioblastoma multiforme. *J Clin Neurosci* 2009; 16:748-54.

53.-Loew S, Schmidt U, Unterberg A, Halatsch ME. The epidermal growth factor receptor as a therapeutic target in glioblastoma multiforme and other malignant neoplasms. *Anticancer Agents Med Chem* 2009; 9:703-15.

54.-Nakahara Y, Shiraishi T, Okamoto H, Mineta T, Oishi T, Sasaki K, Tabuchi K. Detrended fluctuation analysis of genome-wide copy number profiles of glioblastomas using array-based comparative genomic hybridization. *Neuro Oncol* 2004;6(4):281-9.

55.-Jin W, Huang ES, Bi W, Cote GJ. Exon sequence is required for regulated RNA splicing of the human fibroblast growth factor receptor-1 alpha-exon. *J Biol Chem* 1998; 273:16170-6.

56.-Brastianos PK, Batchelor TT. Vascular endothelial growth factor inhibitors in malignant gliomas. *Target Oncol* 2010; 5:167-74.

57.- Brastianos PK, Batchelor TT. VEGF inhibitors in brain tumors. *Clin Adv Hematol Oncol* 2009; 7:753-60.

58.-Momota H, Narita Y, Matsushita Y, Miyakita Y, Shibui S. p53 abnormality and tumor invasion in patients with malignant astrocytoma. *Brain Tumor Pathol* 2010; 27:95-101.

59.- Nozaki M, Tada M, Kobayashi H, Zhang CL, Sawamura Y, Abe H, *et al.* Roles of the functional loss of p53 and other genes in astrocytoma tumorigenesis and progression. *Neuro Oncol* 1999; 1:124-37.

60.- Franco-Hernández C, Martínez-Glez V, Rey JA. [Biology molecular of glioblastomas]. *Neurocirugia (Astur)* 2007; 18:373-82.

61.- Costanzi-Strauss E, Strauss BE, Naviaux RK, Haas M. Restoration of growth arrest by p16INK4, p21WAF1, pRB, and p53 is dependent on the integrity of the endogenous cell-cycle control pathways in human glioblastoma cell lines. *Exp Cell Res* 1998; 238:51-62.

62.-Eisenman RN. Deconstructing myc. *Genes Dev* 2001; 15:2023-30.

63.-Lutz W, Leon J, Eilers M. Contributions of Myc to tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1602:61-71.

64.- Fang XF, Zhang WY, Zhao N, Yu W, Ding D, Hong X, *et al.* Genome-wide analysis of OCT4 binding sites in glioblastoma cancer cells. *J Zhejiang Univ Sci B* 2011;12:812-9.

- 65.- Liu X, Chen L, Jiang Z, Wang J, Su Z, Li G, *et al.* Malignant behavioral characteristics of CD133(+/-) glioblastoma cells from a Northern Chinese population. *Exp Ther Med* 2013; 5:65-72.
- 66.-de Groot JF, Liu TJ, Fuller G, Yung WK. The excitatory amino acid transporter-2 induces apoptosis and decreases glioma growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2005; 65:1934-40.
- 67.- Münch C, Penndorf A, Schwalenstöcker B, Troost D, Ludolph AC, Ince P, *et al.* Impaired RNA splicing of 5'-regulatory sequences of the astroglial glutamate transporter EAAT2 in human astrocytoma. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2001; 71:675-8.
- 68.-Lauriat TL, McInnes LA. EAAT2 regulation and splicing: relevance to psychiatric and neurological disorders. *Mol Psychiatry* 2007; 12:1065-78.
- 69.-Münch C, Zhu BG, Leven A, Stamm S, Einkörn H, Schwalenstöcker B, *et al.* Differential regulation of 5' splice variants of the glutamate transporter EAAT2 in an in vivo model of chemical hypoxia induced by 3-nitropropionic acid. *J Neurosci Res* 2003; 71:819-25.
- 70.-de Groot JF, Piao Y, Lu L, Fuller GN, Yung WK. Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *J Neurooncol* 2008; 88:121-33.
- 71.- de Groot JF, Piao Y, Lu L, Fuller GN, Yung WK. Knockdown of GluR1 expression by RNA interference inhibits glioma proliferation. *J Neurooncol* 2008; 88:121-33.
- 72.- Piao Y, Lu L, de Groot J. AMPA receptors promote perivascular glioma invasion via beta1 integrin-dependent adhesion to the extracellular matrix. *Neuro Oncol* 2009; 11:260-73.
- 73.-Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, *et al.* Cancer Genome Atlas Research Network. 2010. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010; 17:510-22.
- 74.-Schlegel J, Güneysu S, Mennel HD. Expression of the genes of methyl-binding domain proteins in human gliomas. *Oncol Rep* 2002; 9:393-5.

75.-Nakao M, Matsui S, Yamamoto S, Okumura K, Shirakawa M, Fujita N. Regulation of transcription and chromatin by methyl-CpG binding protein MBD1. *Brain Dev* 2001; 23 Suppl 1:S174-6.

76.-Groenendijk FH, Taal W, Dubbink HJ, Haarloo CR, Kouwenhoven MC, van den Bent MJ, *et al.* MGMT promoter hypermethylation is a frequent, early, and consistent event in astrocytoma progression, and not correlated with TP53 mutation. *J Neurooncol* 2010;101:405-17.

77.-Ochsenbein AF, Schubert AD, Vassella E, Mariani L. Quantitative analysis of O(6)-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter methylation in patients with low-grade gliomas. *J Neurooncol* 2011; 103:343-51.

78.-He J, Qiao JB, Zhu H.. p14 (ARF) promoter region methylation as a marker for gliomas diagnosis. *J Proteome Res* 2013;12:3353-61

79.-Yang Z, Wang Y, Fang J, Chen F, Liu J, Wu J, *et al.* Downregulation of WIF-1 by hypermethylation in astrocytomas. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2010;42:418-25.

80.-Novakova J, Slaby O, Vyzula R, Michalek J. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386:1-5.

81.-Chan J.A, Krichevsky A.M, Kosik K.S. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res* 2005; 65:6029-33.

82.- Conti A, Aguenouz M, La Torre D, Tomasello CS, Cardali F, Angileri F, *et al.* miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. *J Neurooncol* 2009;93:325-32.

83.-Gabriely G, Wurdinger T, Kesari S, Esau C.C, Burchard J, Linsley P.S, *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol* 2008; 28:5369-80.

88.-Papagiannakopoulos T, Shapiro A, Kosik KS. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res* 2008; 68:8164-72.

89.- Shi L, Cheng Z, Zhang J, Li R, Zhao P, Fu Z, You Y, 2008. hsa-mir-181a and hsa-mir-181b function as tumor suppressors in human glioma cells. *Brain Res* 2008; 1236:185-93.

90.-Kefas B, Godlewski J, Comeau L, Li Y, Abounader R, Hawkinson M, *et al.* MicroRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res* 2008; 68:3566-72.

- 91.-Watanabe K, Tachibana O, Sata K, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 1996 Jul;6(3):217-23; discussion 23-4.
- 92.- Sempere L.F, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, Dmitrovsky E, Ambros V. Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brainexpressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 2004; 5(3):R13.
- 93.- Godlewski J, Nowicki M.O, Bronisz A, Williams S, Otsuki A, Nuovo G, *et al.* Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res* 2008; 68:9125-30.
- 94.- Zhang Y, Chao T, Li R, Liu W, Chen Y, Yan , *et al.* X MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J Mol Med (Berl)* 2009; 87:43-51.
- 95.-Silber J, Lim DA, Petritsch C, Persson AI, Maunakea AK, Yu M, Vandenberg SR, Ginzinger DG, James CD, Costello JF, Bergers G, Weiss WA, Alvarez-Buylla A, Hodgson JG. 2008.miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med* 2008;6:14.
- 96.-Nelson D, Cox M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. Tercera edición, 2000 Ediciones Omega. 1-1152.
- 97.-Encarnación G. S. Genómica y Genómica funcional en Microbiología Rev. *Latinoamerican Microbiol* 2006; 48:131-113.
- 98.-Görg A, Weiss W, Dunn MJ. Current two dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics* 2004; 4:3665-3685.
- 99.- Liu R, Wang K, Yuan K, Wei Y, Huang C. Integrative oncoproteomics strategies for anticancer drug discovery. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7:411-429.
- 100.- Jain KK. Innovations, challenges and future prospects of oncoproteomics. *Mol Oncol* 2008; 2:153-60.
- 101.- Cho CS W. Contribution of oncoproteomics to cancer biomarker discovery. *Molecular Cancer* 2007; 6: 1-13
- 102.- Chabner B. Advances and challenges in the use of biomarkers in clinical trials. *Clin Adv Hematol Oncol* 2008; 6:42-3.

- 103.- Celis JE, Moreira JM. Challenges and opportunities in oncoproteomics. *Mol Oncol.* 2010; 4:459-60.
- 104.- Auman JT, McLeod HL. Now's the time to find biomarkers on purpose. *Ann Oncol* 2010; 21:193-4.
- 105.- Macdonald F, Ford CHJ, Casson AG. *Molecular Biology of Cancer.* 2004. New York: Bios Scientific Publishers. 263.
- 106.- Li G, Xiao Z, Liu J, Li C, Li F, Chen Z. Cancer: A proteomic disease. *Sci China Life Sci* 2011; 54:403-408.
- 107.- Jemal A. Cáncer Statistics. *Cancer J Clin.* 2010; 5:1-24.
- 108.-Colditz AG, Sellers AT, Trapido E. Epidemiology—identifying the causes and preventability of cancer? *Nature Reviews* 2005; 6:75-83.
- 109.- Yamasaki T, Seki N, Yamada Y, Yoshino H, Hidaka H, Chiyomaru T, et al. Tumor suppressive microRNA 138 contributes to cell migration and invasion through its targeting of vimentin in renal cell carcinoma. *Int J Oncol* 2012;41:805.
- 110.- Chen S, Zhao H, Deng J, Liao P, Xu Z, Cheng Y
Comparative proteomics of glioma stem cells and differentiated tumor cells identifies S100A9 as a potential therapeutic target. *J Cell Biochem.* 2013;114:2795-808.
- 111.- Teng CC, Kuo HC, Sze CI. Quantitative proteomic analysis of the inhibitory effects of CIL-102 on viability and invasiveness in human glioma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2013;272:579-90.
- 112.- Maruo T, Ichikawa T, Kanzaki H, Inoue S, Kurozumi K, Onishi M, Yoshida K, Kambara H, Ouchida M, Shimizu K, Tamaru S, Chiocca EA, Date I. Proteomics-based analysis of invasion-related proteins in malignant gliomas. *Neuropathology.* 2013;33:264-75.
- 113.- Furuta M, Weil RJ, Vortmeyer AO, Huang S, Lei J, Huang TN, Lee YS, Bhowmick DA, Lubensky IA, Oldfield EH, Zhuang Z. Protein patterns and proteins that identify subtypes of glioblastoma multiforme. *Oncogene.* 2004 Sep 2;23(40):6806-14.

- 114.-Anagnostopoulos AK, Dimas KS, Papathanassiou C, Braoudaki M, Anastasiadou E, Vougas K, et al. Proteomics studies of childhood pilocytic astrocytoma. *J Proteome Res*
- 115.- Van Steendam K, Tilleman K, De Ceuleneer M, De Keyser F, Elewaut D, Deforce D. Citrullinated vimentin as an important antigen in immune complexes from synovial an important antigen in immune complexes from synovial fluid of rheumatoid arthritis patients with antibodies against citrullinated proteins. *Arthritis Res Ther* 2010;12:R132.
- 116.- Jang B, Jeon YC, Choi JK, Park M, Kim JI, Ishigami A, et al. A. Ishigami, et al. Peptidylarginine deiminase modulates the physiological roles of enolase via citrullination: links between altered multifunction of enolase and neurodegenerative diseases. *Biochem J* 2012;445:183–92.
- 117.- Okunaga T, Urata Y, Goto S, Matsuo T, Mizota S, Tsutsumi K, et al. Calreticulin, a molecular chaperone in the endoplasmic reticulum, modulates radiosensitivity of human glioblastoma U251MG cells. *Cancer Res* 2006;66:8662–71.
- 118.- Ortiz-Muñoz G, Houard X, Martín-Ventura JL, Ishida BY, Loyau S, Rossignol P, et al. HDL antielastase activity prevents smooth muscle cell anoikis, a potential new antiatherogenic property. *FASEB J* 2009;23:3129–39.
- 119.- Orr AW, Elzie CA, Kucik DF, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin signaling through the calreticulin/LDL receptor-related protein co-complex stimulates random and directed cell migration. *J Cell Sci* 2003;16:2917–27.
- 120.- Panaretakis T, Kepp O, Brockmeier U, Tesniere A, Bjorklund AC, Chapman DC, et al. Mechanisms of pre-apoptotic calreticulin exposure in immunogenic cell death. *EMBO J* 2009;28:578–90.
- 121.- Sorokina EM, Feinstein SI, Zhou S, Fisher AB. Intracellular targeting of peroxiredoxin 6 to lysosomal organelles requires MAPK activity and binding to 14-3-3 ϵ . *Am J Physiol Cell Physiol* 2011;300:C1430–41.
- 122.- Ko BS. Overexpression of 14-3-3 ϵ predicts tumour metastasis and poor survival in hepatocellular carcinoma. *Histopathology* 2011;58:705–11.
- 123.- Che XH, Chen H, Xu ZM, Shang C, Sun KL, Fu WN. 14-3-3 ϵ contributes to tumour suppression in laryngeal carcinoma by affecting apoptosis and invasion. *BMC Cancer* 2010;10:306.
- 124.- Liou JY, Ghelani D, Yeh S, Wu KK. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce colorectal cancer cell apoptosis by suppressing 14-3-3 ϵ . *Cancer Res* 2007;67:3185–91.

125.- Cao L, Cao W, Zhang W, Lin H, Yang X, Zhen H, et al. Identification of 14-3-3 protein isoforms in human astrocytoma by immunohistochemistry. *Neurosci Lett* 2008;432:94–9.

126.- Chen CH, Chuang SM, Yang MF, Liao JW, Yu SL, Chen JJ. A Novel Function of YWHAZ/ β -catenin axis in promoting epithelial-mesenchymal transition and lung cancer metastasis. *Mol Cancer Res* 2012;10:1319–31.

127.- Liao CJ, Wu TI, Huang YH, Chang TC, Wang CS, Tsai MM, et al. Glucose-regulated protein 58 modulates cell invasiveness and serves as a prognostic marker for cervical cancer. *Cancer Sci* 2011;102:2255–63.

128.- Pallero MA, Elzie CA, Chen J, Mosher DF, Murphy-Ullrich JE. Thrombospondin 1 binding to calreticulin-LRP1 signals resistance to anoikis. *FASEB J* 2008;22:3968–79.

129.- Sachdeva M, et al. p53 represses c-Myc through induction of the tumor suppressor miR-145. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 3207-12.

130 Takaoka Y, et al. Forced Expression of miR-143 Represses ERK5/c-Myc and p68/p72

131.- Speranza M.C, et al. NEDD9, a novel target of miR-145, increases the invasiveness of glioblastoma. *Oncotarget* 2012; 3: 723-734.

132.- Rao SA, Santosh V, Somasundaram K. Genome-wide expression profiling identifies 631 deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod Pathol* 2010; 23: 1404-17.

133.- Wu X, et al. Identification of a 4-microRNA signature for clear cell renal cell carcinoma metastasis and prognosis. *PLoS One* 2012; 7: e35661.

134.- Smith A.L, et al. The miR-106b-25 cluster targets Smad7, activates TGF- β signaling, and induces EMT and tumor initiating cell characteristics downstream of Six1 in human breast cancer. *Oncogene* 2012; 31: 5162-5171.

135.- Valera VA, Walter BA, Linehan WM, Merino MJ. 637 Regulatory Effects of microRNA-92(miR-92) on VHL Gene Expression and the Hypoxic Activation of miR-210 in Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *J Cancer* 2011; 2: 515-526.

136.- Yang S, et al. A predicted miR-27a-mediated network identifies a signature of glioma. *Oncol* 2012; 28: 1249-1256.

137.- Yu X, Zhang W, Ning Q, Luo, X. MicroRNA-34a inhibits human brain glioma cell growth by down-regulation of Notch1. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2012; 32:370-374.

138.- Jiang J, et al. Tumor microRNA-335 expression is associated with poor prognosis in human glioma. Med Oncol 2012; 29: 3472-3477.

139,. Pritchard C.C, et al. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. Cancer Prev Res (Phila) 2012; 5: 492-497.

140.- Phillips JJ. Novel therapeutic targets in the brain tumor microenvironment. Oncotarget 2012; 3:3568-3575.

141.- Higareda-Almaraz JC, Enríquez-Gasca MR, Hernández-Ortiz M, Resendis-Antonio O, Encarnación-Guevara S. Proteomic patterns of cervical cancer lines, a network perspective. BMC Syst Biol 2009; 5:96.