



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Medicina

**Estudio de alteraciones cromosómicas
estructurales y patrón de metilación
global en endimomas.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(Biología Experimental)

P R E S E N T A

Felipe de Jesús Arguijo Pérez

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. Julio Diego Arenas Aranda.

COMITÉ TUTOR: Dr. Fabio Abdel Salamanca Gómez, Dra. María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Dra. Sandra Gómez Arroyo y Dra. Susana Helena Kofman Epstein.

MÉXICO, D.F.

MARZO, 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de enero de 2011, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **ARGUIJO PÉREZ FELIPE DE JESÚS** con número de cuenta **402069061** con la tesis titulada **“ESTUDIO DE ALTERACIONES CROMOSÓMICAS ESTRUCTURALES Y PATRÓN DE METILACIÓN GLOBAL DE EPENDIMOMAS.”**, realizada bajo la dirección del : **DR. DIEGO JULIO ARENAS ARANDA**

Presidente:	DRA.	SUSANA HELENA KOFMAN EPSTEIN
Vocal:	DRA.	SANDRA GÓMEZ ARROYO
Secretario:	DR.	DIEGO JULIO ARENAS ARANDA
Suplente:	DR.	FABIO ABDEL SALAMANCA GÓMEZ
Suplente:	DRA.	MARIA EUGENIA GONSEBATT BONAPARTE

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

Atentamente
“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”
Cd. Universitaria, D.F., a 24 de febrero de 2011

M. del Coro Arizmendi
Dra. María del Coro Arizmendi Arriaga
Coordinadora del Programa

Agradecimientos.

Al personal administrativo del posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la ayuda aportada hacia el presente trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo otorgado al proyecto de investigación titulado “**Estudio de alteraciones cromosómicas estructurales y patrón de metilación global en ependimomas**” y haber proporcionado la beca al número de CVU: 226719.

Al Dr. Julio Diego Arenas Aranda, Tutor principal del proyecto de Tesis de grado.

Al comité tutorial conformado por los doctores Fabio Adbel Salamanca Gómez, María Eugenia Gonsebatt Bonaparte, Sandra Gómez Arroyo y Susana Helena Kofman Epstein por la ardua revisión del manuscrito de tesis.

Agradecimientos personales.

A mis hermanos de sangre Carlos Aurelio Arguijo Pérez y Lupita Arguijo Pérez por hacerme reír, aguantarme y ayudarme en todo momento, por confiar en mí y regalarme su compañía durante toda su vida, los amo.

A mi familia, mi tío Carlos Argijo, Jorge Arguijo y a mi abuelita Lupita que tanto admiro, gracias por su apoyo incondicional los amo y adoro.

A mi hermano del alma Israel Goytia Sil por las pláticas, convivencias, ocurrencias, reflexiones, risas, ayuda, y apoyo dado durante estos seis años de amistad.

A mis amigos principalmente a Angel Ruiz, a mi primo “el lobo” (Eduardo Pérez), Roy “D-mon”, Saúl, al “bb” Vizuet, al “Charly bb”, Angel Ongay, Renato, Alejandra Roblez, Adriana Aceves, Lizbeth Tafolla, Mayra Salinas, Diana Coyol, a la Lic. Anel por el apoyo, comprensión, pláticas y convivencias compartidas a lo largo del desarrollo de dicho proyecto.

A mis amigos de laboratorio Susana Osorio, Silvia Schutz, Claudia, Etzael, Xchel, Abraham, Fabiola, la Doctora Carolina Barrientos, el Doctor Normand García y el Doctor Socrates Abidez por las risas regaladas y convivencias tenidas y por haber.

A Erika, Armando y la señora Lilia Jiménez personal del posgrado de Ciencias Biológicas por la ayuda, asesoría y consejos recibidos durante el desarrollo del proyecto, gracias.

Dedicatoria.

Mi tesis y el trabajo realizado durante estos años la dedico con todo mi amor y cariño:

A mi familia principalmente a mis padres Felipe de Jesús Arguijo Morales y Felicitas Pérez Reytez que me dieron la vida y han estado conmigo en todo momento. Gracias por todo papá y mamá por darme una carrera para mí futuro y por creer en mí, aunque hemos pasado momentos difíciles siempre han estado apoyándome y brindándome todo su amor, por todo esto les agradezco de todo corazón que estén conmigo.

A mi hija Fatima Arleth Arguijo Rico que aunque estoy alejado físicamente de ella no he dejado de pensar ni un solo momento en ti, eres el motor de lo que hago, la fuerza de mi vida y el anhelo de mi corazón, te amo y te adoro hija con todas mis fuerzas de mi alma.

A mi novia Fiordaliso Carolina Román Carraro, por amarme tanto, por el apoyo demostrado durante tanto tiempo de mi vida, por la ayuda recibida a este trabajo, por estimular músculos de mi cuerpo (algunos que no conocía jajaja) te amo con locura neni y me encantas.

Índice.

	Pag.
1. Introducción	1
1.1. Epigenética y metilación del DNA.	1
1.2. Metilación del DNA y su papel en la carcinogénesis.	2
1.3. Etiología del Cáncer.	4
1.4. El cáncer en los niños.	6
1.5. Tumores del Sistema Nervioso Central (TSNC) en niños.	7
1.6. Ependimomas.	8
1.7. Técnicas para determinar alteraciones cromosómicas y metilación del DNA.	12
2. Antecedentes.	17
3. Justificación.	19
4. Objetivos.	20
4.1. Objetivo general.	20
4.2. Objetivos particulares.	20
5. Metodología.	21
5.1. Recolección de las muestras.	22
5.2. Extracción del DNA del tejido por proteinasa K (técnica orgánica de fenol-cloroformo modificada).	22
5.3. Cuantificación e integridad del DNA extraído.	23

	Pag.
5.4. Preparación de la CGH.	23
5.4.1. Marcaje con <i>“Nick Translation Kit”</i>	23
5.4.2. Preparación de la sonda (mezcla de sondas de referencia y del paciente).	24
5.4.3. Hibridación de las sondas sobre las laminillas con cromosomas en metafase.	25
5.4.4. Lavado de las laminillas hibridadas.	25
5.4.5. Visualización de la hibridación.	26
5.4.6. Interpretación y Análisis.	26
5.5. Elaboración del AIMS.	27
5.6. Control para la reacción del <i>“Nick Transltion Kit”</i> .	28
5.7. Relación de los datos obtenidos por medio de CGH con los datos histológicos.	28
6. Resultados.	29
7. Discusión.	51
8. Conclusiones.	58
9. Referencias.	59
Anexo I. CGH convencional.	67
Anexo II. CGH-AIMS.	76

Resumen.

En México el cáncer en edad pediátrica ocupa la segunda causa de mortalidad y detrás de las leucemias, los Tumores del Sistema Nervioso Central (TSNC) son los más frecuentes. Dentro de los TSNC los ependimomas ocupan un 10%, sin embargo los estudios de biología molecular sobre éstos, son nulos en nuestro país.

La identificación del cáncer como un trastorno genético y epigenético da la posibilidad de clasificar los tumores de acuerdo a alteraciones citogénéticas y ayudar a que el médico decida la mejor forma de tratamiento para los pacientes que presentan estas enfermedades, consecuentemente planteamos la necesidad del estudio molecular de los ependimomas.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue detectar alteraciones cromosómicas estructurales como: ganancias y pérdidas, así como el patrón de metilación global de ependimomas mediante Hibridación Genómica Comparativa (CGH) y Amplificación de Sitios Intermetilados (AIMS).

Se utilizaron nueve muestras de ependimomas proporcionadas por el departamento de Oncología del Hospital de Pediatría del CMNS XXI, las cuales se analizaron con CGH mediante un "software" para identificar pérdidas y ganancias, a tres de éstas se les realizó una PCR para amplificar sitios intermetilado e hibridar los productos de PCR por CGH en laminillas con cromosomas metafásicos (técnica de AIMS-CGH) para observar el patrón de metilación.

Los resultados obtenidos revelaron alteraciones en los cromosomas 1, 3, 6, 12, 14, 15, 19, 21 y 22 principalmente, las regiones cromosómicas con el mayor

porcentaje de anomalías fueron la 14q32.3, 21p13, 1q12, 3q29, 6p25, 15p13, 19p13.3, 22p13 y 22p 13.3.

Las muestras que se les realizó AIMS no mostraron alteraciones en el grado de metilación, a excepción de las regiones 3p14 y 5q35 que presentaron una hipometilación y 18q21.1 y 18q21.2 con hipermetilación, en estos locus se encontraron genes como MBD2 y el oncogen LOC100421737, que pueden estar relacionados al desarrollo de la neoplasia.

Abstract.

In Mexico cancer at pediatric age occupy the second cause of death and Tumors Central Nervous System (TCNS) is the most frequency malignity just below of Leukemias. Among the TCNS, the ependymomas occupy a 10%. However molecular studies of these diseases are inexist in our country.

The identification of cancer as a genetic disorder and epigenetic gives the possibility to classify tumors according to cytogenetic alterations and help the medical decide the best form of treatment for patients with these tumors, we question the need for molecular study ependymomas.

Therefore the aim of this study was to detect structural chromosomal abnormalities such as gains and losses and the global methylation pattern of ependymomas by Comparative Genomic Hybridization (CGH) and amplification Intermetilados Sites (AIMS).

Nine samples were used for ependymomas provided by the Department of Oncology, Hospital of Pediatrics XXI MNC's, which were analyzed by CGH software to identify gains and losses, three of these samples underwent PCR to amplify sites intermetilado and hybridize the PCR products by CGH on slides with metaphase chromosomes (AIMS-CGH technique) to observe the pattern of methylation.

The results showed abnormalities on chromosomes 1, 3, 6, 12, 14, 15, 19, 21 and 22 mainly, chromosomal regions with the highest percentage of abnormalities were 14q32.3, 21p13, 1q12, 3q29, 6p25, 15p13, 19p13.3, 22p13 and 22p 13.3.

While the samples which underwent AIMS showed no alterations in the degree of methylation, except for 3p14 and 5q35 regions that showed a 18q21.1 and 18q21.2 and hypomethylation with hypermethylation, at these loci were found genes as MBD2 and oncogene LOC100421737, who may be related to the development of neoplasia.

1. Introducción

1.1. Epigenética y metilación del DNA.

La epigenética es una rama de la genética que estudia la regulación de la información genética, que contribuye a explicar la diversidad morfológica y funcional de las células con un mismo genoma y depende del llamado componente epigenético, es decir no consiste en la secuencia de nucleótidos de la molécula de DNA, sino más bien de las formas que presente esta molécula (en el caso del DNA metilado o no metilado) o algunas proteínas que se asocian a éste. Un mecanismo epigenético muy importante para la regulación de la expresión genética es la metilación del DNA. Es un proceso que no permite la transcripción de secuencias que se encuentran metiladas¹.

En la mayoría de vertebrados una parte de los residuos de citosina existentes en el DNA se encuentran metilados, en humanos es aproximadamente 3%. Esta metilación aparece casi exclusivamente en las secuencia dinucleotídica CG, en posición 5'. Esta secuencia es especialmente abundante en regiones promotoras de los genes, dando lugar a las islas CpG. Por tanto, los genes que se transcriben activamente en ciertos tejidos poseen islas CpG sin metilar o poco metiladas (hipometilados), mientras en los tejidos donde el gen no se expresa se encuentran metiladas^{2,3}.

Como manifestación de esta regulación por metilación, cada tejido presenta un patrón característico de metilación del DNA en sus células, éste se consigue y conserva durante el desarrollo embrionario mediante tres procesos sucesivos desmetilación global, metilación *de novo* y metilación de mantenimiento⁴.

La alteración en el patrón de metilación es una de las causas (aunque no la única) del desbalance en la expresión genética y da como resultado en muchos de los casos el descontrol en el ciclo celular; la metilación del DNA entonces se reconoce como un mecanismo clave en la regulación de la expresión génica y su modificación está asociada al desarrollo de una gran variedad de neoplasias².

La metilación del DNA es inducida por grupos de enzimas conocidas como DNA metil transferasas que unen covalentemente un grupo metilo (CH₃-) al carbono 5 de la base citosina⁵.

1.2. Metilación del DNA y su papel en la carcinogénesis.

El cáncer es uno de los procesos patológicos en los que se está estudiando intensamente la participación de la metilación en DNA. Los fenómenos epigenéticos, como la metilación de citosinas, favorecen la aparición de mutaciones. El desbalance en el patrón de metilación del DNA se ha observado particularmente en cánceres esporádicos. Los cambios en la metilación que con mayor frecuencia se han detectado en células cancerosas^{6,7}, incluye la pérdida de estas secuencias normalmente metiladas (hipometilación) y la metilación aberrante de secuencias usualmente no metiladas (hipermetilación), localizada especialmente en islas CpG, ambas asociadas con la malignidad⁷.

La hipermetilación se refiere a la adición de un grupo metilo al anillo de las citocinas precedidas por guanina para formar 5-metilcitosina, en las islas CpG están asociadas a replicación retardada, cromatina condensada e inhibición al inicio de la transcripción, además está fuertemente relacionado con el silenciamiento de genes⁸, una vez establecida pasa a las células hijas durante la replicación por la actividad de la DNA metiltransferasa, conservando así el patrón general de metilación de las islas CpG⁹. Esta hipermetilación aberrante parece contribuir significativamente a la malignidad del fenotipo neoplásico¹⁰.

Un decremento en la metilación de DNA (hipometilación) es muy frecuente también en cánceres humanos, sin embargo aún no se conoce bien. En experimentos realizados en donde se involucran inhibidores de la metilación de DNA “in vivo”, “in vitro” y Dnmt1 en ratones knockout¹¹ se determinó la importancia de la hipometilación en la oncogénesis, se encontró que una alta frecuencia de DNA hipometilado se encuentra asociado a cáncer, la naturaleza de las secuencias afectadas y la conclusión de que el cáncer vinculado con DNA hipometilado pueda producirse sin una asociación con el cáncer relacionado en DNA hipermetilado son consistentes con una función independiente de ciertas secuencias de DNA en la formación del cáncer o la progresión del tumor. Por ejemplo las alteraciones en el grado de metilación de algunas secuencias del genoma se han encontrado en cánceres como el de mama¹².

Los genes silenciados por metilación pueden ser un mecanismo importante en la carcinogénesis debido a que éstos normalmente están involucrados en la supresión del tumor y pueden ser reprimidos. La inactivación de la expresión de los genes por metilación de sus regiones promotoras, se ha observado en líneas celulares de cáncer y tumores humanos. Por ejemplo, las proteínas receptoras de estrógenos están presentes en las células epiteliales normales del ovario pero están ausentes en el cáncer de ovario¹³.

La hipermetilación de los genes promotores que codifican para el receptor α de estrógeno se ha observado en tres de cuatro líneas celulares humanas de ovario que carecen de proteínas receptoras de estrógeno¹³. Esto indica que la hipermetilación puede ser responsable de este fenotipo en tumores de ovario.

Otro caso es el gen de susceptibilidad al cáncer de mama, el BRCA1, está frecuentemente mutado en forma recesiva en el cáncer de mama hereditario. Así, la pérdida de la función del producto del gen sugiere que normalmente actúa para suprimir el cáncer de mama. La mutación de éste es muy poco frecuente en cáncer de mama no hereditario. Sin embargo, la hipermetilación interesantemente

está asociada con la inactivación del BRCA1 en cáncer de mama no hereditario y por lo tanto ésta puede ser otra vía asociada a la pérdida de la función³⁹.

También se ha encontrado metilación de algunos genes blanco como son el retinoblastoma (Rb), inhibidores del ciclo celular como *p16* y *INK4a*, proteínas asociadas a la apoptosis como *DAPK* y *APC* en genes receptores de estrógenos¹⁴.

En la región cromosómica 11q se presentan con frecuencia pérdidas alélicas relacionadas a cánceres humanos. Estudios realizados con la técnica de Hibridación Genómica Comparativa encontraron alteraciones principalmente en el cromosoma 11 en tumores de mama.

1.3. Etiología del Cáncer.

El cáncer es un grupo grande y heterogéneo de enfermedades, con este término se agrupan más de 100 formas de padecimientos diferentes, lo que suele significar que existen grandes diferencias entre los carcinomas de distintos órganos, como la mama o el colon. También es cierto que hay una variedad significativa entre los tumores que se asientan en el mismo órgano de diferentes pacientes y que existe una importante heterogeneidad fenotípica entre las células de un mismo carcinoma. Aunque cada cáncer tiene características únicas, los procesos básicos que los originan son muy similares¹⁵.

El proceso de carcinogénesis comprende una serie de alteraciones genéticas y/o epigenéticas que son acumuladas en la célula. Entre los cambios genéticos podemos mencionar la presencia de mutaciones en genes clave que participan en la regulación del ciclo y crecimiento celular promoviendo un desarrollo anormal.

Por otro lado como ya se ha mencionado, la metilación del DNA es uno de los procesos epigenéticos asociados con el origen de algunas neoplasias humanas^{6,7}.

Estas alteraciones pueden ser de origen somático o de línea germinal. Lo común del cáncer es que se trata de enfermedades en las que se produce una proliferación inadecuada y, en el último de los casos, incontrolada de células. Las células normales sólo se dividen cuando reciben las instrucciones adecuadas que les envían otras células vecinas, tal colaboración permanente asegura que cada tejido u órgano mantenga el tamaño y la arquitectura ordenada a las necesidades del cuerpo, sin embargo las células cancerosas vulneran ese esquema. Ignoran los controles normales de proliferación y siguen sus propias instrucciones internas de división, e incluso gozan de una propiedad más perniciosa: son capaces de emigrar del sitio donde se producen ¹⁶.

La carcinogénesis se concibe entonces como una enfermedad con múltiples fases, en el que suceden una serie de alteraciones genéticas y epigenéticas en el interior de la célula. La transformación maligna de una célula acontece por acumulación de mutaciones en algunos genes específicos (protooncogenes y genes supresores de tumores) además del descontrol de los mecanismos por los cuales la información genética es regulada y/o la combinación de ambas causas. La pérdida de control del crecimiento celular es el resultado de estas alteraciones que mediante los procesos de promoción y regresión, conducen a la malignización de las células; se origina en un largo cause de selección y variación¹⁷.

La variación es el resultado de la tendencia de las células tumorales a desarrollar cambios sobre todo epigenéticos, mientras que la selección proviene de las variadas condiciones microambientales a las que se ven sometidas las células durante el crecimiento tumoral. Así, el crecimiento del tumor y su desarrollo son actividades celulares y tisulares.

1.4. El cáncer en los niños.

En lo que concierne al cáncer en la infancia, este representa entre 0.5 y 5.7 % del total de las neoplasias reportadas. El cáncer en la edad pediátrica ocupa la segunda causa de mortalidad en los países industrializados. Sin embargo en la República Mexicana en el año de 1977 ocupaba el cuarto lugar de mortalidad entre los 5 a 14 años de edad únicamente antecedida por padecimientos gastrointestinales, procesos infecciosos y congénitos. No fue sino hasta 1996 en el que se reporta un aumento en la frecuencia de estas enfermedades; en 2003 se presentó como la segunda causa de muerte en México entre los 5 a 14 años de edad únicamente antecedido por accidentes¹⁵.

La incidencia del cáncer en pediatría muestra un aumento en el periodo de 1975 a 1995 en la República Mexicana¹⁸. Se estima que la incidencia de cáncer infantil en México (0 a 18 años de edad) es de 120 nuevos casos por millón de habitantes por año.

Las neoplasias que ocurren en la infancia difieren de las formas principales de aparición en el adulto. En la infancia hay predominio de neoplasias no epiteliales (leucemias, linfomas y sarcomas) y en la etapa adulta de las epiteliales (carcinomas). Por ello, se infiere que las causas del cáncer en la infancia son diferentes a las de los adultos.

Indiscutiblemente que las neoplasias más frecuentes en los niños siguen siendo la leucemia aguda seguida de neoplasias del sistema nervioso central y de linfomas¹⁹.

1.5. Tumores del Sistema Nervioso Central (TSNC) en niños.

Los TSNC ocupan, tras las leucemias, el segundo lugar en frecuencia entre las neoplasias del niño y adolescente, con una incidencia de 2,5 pacientes por 100,000 menores de 15 años por año. La media de edad en el momento del diagnóstico es de 6 años, con un pico de incidencia a los 3 años y existe una predisposición mayor en los varones¹⁵.

A pesar de su elevada incidencia, los estudios genéticos, epidemiológicos y patológicos son escasos en comparación a los de otros tumores pediátricos, probablemente debido a la gran dispersión de estos pacientes a la hora de ser tratados y principalmente a la diversidad histológica que abarca este grupo de tumores²⁰.

Los factores más relacionados con el desarrollo de tumores cerebrales son las radiaciones ionizantes. También se encuentran los carcinogénicos químicos, como nitrosaminas, nitrosureas, hidrocarburos policíclicos, hidracinas y triacenos, que han demostrado una capacidad de inducción tumoral en tejidos cerebrales. A la vez se ha relacionado con estados de inmunodeficiencia, tanto congénitos (síndrome de Wiskott-Aldrich, ataxia telangiectasia), como adquiridos (inmunodepresión en pacientes sometidos a trasplantes renales o cardíacos, y SIDA) con el desarrollo de tumores cerebrales primitivos²¹.

Existen varios tipos de TSNC y su gran diversidad histológica hace complejo cualquier intento de clasificación.

La clasificación más reciente para los TSNC es la proporcionada por la Organización Mundial de Salud (OMS) en 2000 que se muestra a continuación (Tabla I).

Tabla I. Clasificación de los TSNC por la OMS (2000).

Tumores gliales
1. Astrocitoma astrocítico
Astrocitoma anaplásico
Tumor subependimal de células gigantes
Glioma gigantocelular
2. Tumores oligodendrogliales
Oligodendroglioma
Oligodendroglioma anaplásico
3. Tumores ependimales
Ependimoma
Ependimoma anaplásico
Ependimoma mixopapilar
4. Tumor de plexos coroides
Papiloma de plexos coroides
Tumor anaplásico de plexos coroides
5. Glioma mixto
6. Glioblastoma multiforme
Tumores neuronales
1. Gangliocitoma
2. Ganglioglioma
3. Ganglioglioma anaplásico
Tumores neuroectodérmicos primitivos (TNEP)
1. TNEP
2. TNEP con diferenciación astrocítica, ependimal, neuronal
3. Meduloepitelioma

1.6. Ependimomas.

Los ependimomas constituyen un importante grupo dentro de los tumores cerebrales, ocupan el tercer lugar de frecuencia. De manera general se trata de tumores bien circunscritos, de superficie granulosa, de color rojo grisáceo y consistencia firme (figura 2); usualmente son menos fibrilares y vasculares que los meduloblastomas, y a menudo la superficie aparece jaspeada, con áreas rojas y

grises ²². Representa entre 8% y 15% de los casos en la mayoría de los artículos publicados ²³.

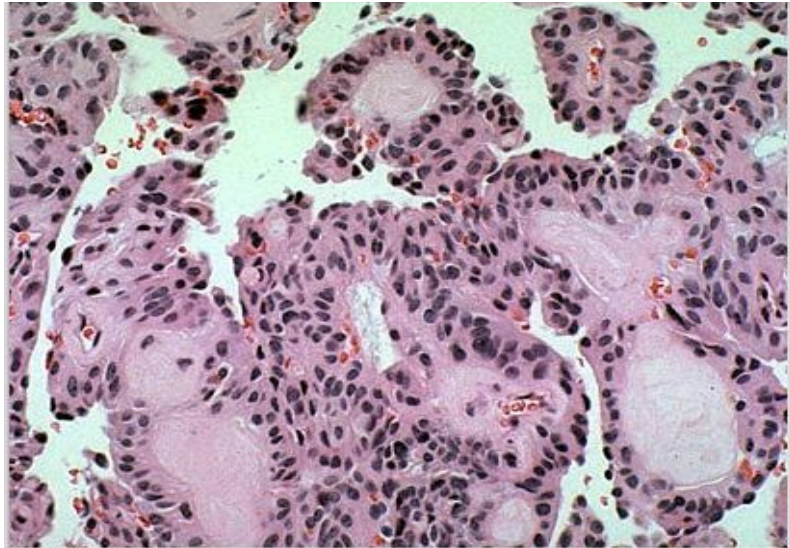


Figura 1. Corte histológico de tejido neoplásico (ependimoma clásico).

Los ependimomas derivan de las células del epéndimo, y en consecuencia tienen la capacidad de originarse en cualquier lugar del sistema ventricular o del canal espinal y el *filum terminale*, aunque el sitio más común es en la fosa posterior, en el IV ventrículo (figura 3). El 60% de los tumores intracraneanos son infratentoriales y el 40% supratentoriales ²⁴.

Los niños tienen la incidencia más elevada de ependimomas con edad de presentación más frecuente en menores de 5 años (50% de los casos), y los ependimomas del neuroeje que son raramente encontrados en niños menores de 12 años ²³.

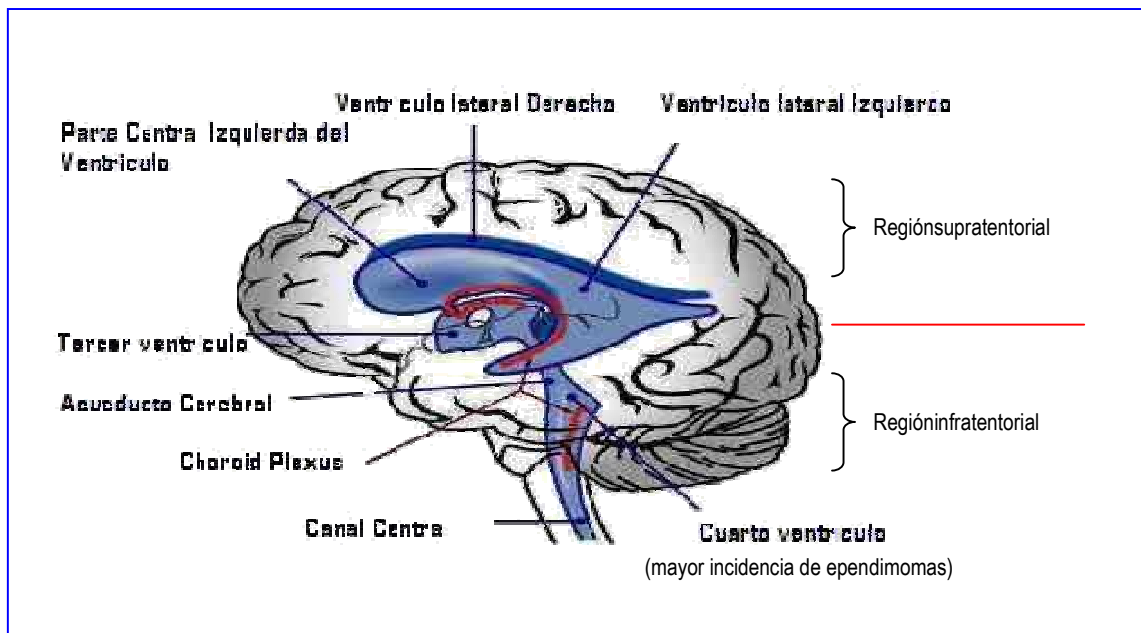


Figura 2. Anatomía del Sistema Ventricular. Se muestra en la parte inferior del lado derecho el cuarto ventrículo en la región infratentorial (donde se presentan con mayor incidencia los ependimomas).

La agresividad biológica se clasifica en grados de malignidad como grado I, subependimoma (intraventricular y frecuentemente sintomático) y ependimoma mixopapilar que frecuentemente ocurre en la cauda equina. Los ependimomas grado II, que tiene un grado de variantes histopatológicas, muestran zonas evidentes de un fenotipo celular ependimario (por formación de rosetas ependimarias y algunas veces en canales)²³.

El sistema de clasificación actual y más frecuentemente utilizado por la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2000) reconoce dos variantes principales en niños:

Ependimomas mixopapilar o clásico (grado II) que son tumores que crecen típicamente en el *filum terminale* y cono medular, con crecimiento lento y que pueden alcanzar un gran tamaño. Afectan más a varones que a mujeres (2:1).

Los ependimomas anaplásicos (grado III) tienen más características de anaplasia y aparecen mitóticamente más activos que los ependimomas clásicos. Suelen ser intramedulares. Sin embargo, a pesar de numerosos estudios la relación entre grado histológico y agresividad de tumor permanece incierta²³.

Por otra parte, los estudios citogenéticos revelan numerosas aberraciones cromosómicas en los ependimomas. En particular la incidencia de un 30 a 50% de aberraciones involucradas con el cromosoma 22, incluyendo monosomía 22 así como deleciones de 22q²⁵.

Recientemente se ha demostrado que dichos tumores disponen de diversos patrones de comportamiento clínico y anormalidades cromosómicas, dependiendo de su localización, lo que sugiere que son una colección de diferentes enfermedades desde el punto de vista molecular²⁶.

Existen estudios que apoyan la creencia de que la clasificación de los ependimomas basadas en sus características citogenéticas puede ayudar a la identificación útil de un marcador pronóstico y proporcionar pistas para el entendimiento del desarrollo de estos tumores. Además hay evidencias de que los ependimomas intracraneales y de la médula espinal podrán ser subdivididos en diversos tumores²⁷.

1.7. Técnicas para determinar alteraciones cromosómicas y metilación del DNA.

Una de las técnicas de citogenética más útiles para identificar cambios cromosómicos en neoplasias es la llamada Hibridación Genómica Comparativa (CGH por sus siglas en inglés). Los métodos de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) por lo general solo pueden interpretar algunas secuencias de manera simultánea en cariotipos de los tumores sólidos²⁸.

El CGH está diseñado para detectar alteraciones cromosómicas como amplificaciones y pérdidas de material genómico, el cual consiste en hibridar simultáneamente DNA de referencia tumoral y no tumoral marcados con fluoroforos rojo y verde, respectivamente (figura 3) en laminillas con cromosomas en metafase²⁹.

A pesar de su gran utilidad como herramienta en citogenética molecular, tiene la limitante de una resolución de 10-20 Mb lo cual no proporciona una información cuantitativa a cerca de las mutaciones de genes específicos. Sin embargo, se pueden visualizar regiones cromosómicas emparentadas a genes relacionados con distintos tumores neoplásicos^{28, 29}.

Por otro lado, la CGH es altamente utilizada para la identificación de alteraciones cromosómicas en una amplia variedad de tumores cerebrales. Evita algunas de las limitaciones asociadas con la citogenética convencional, no requiere de muestras de tumores frescos y se pueden analizar pequeñas muestras de tumor de manera exitosa. Por lo anterior, es una poderosa metodología para la descripción citogenética de las células tumorales con fines de pronóstico³⁰.

como microarreglos de expresión, microarreglos para evaluar islas CpG, y “ChIP-on-chip”. Algunas de estas técnicas son bastante caras o están patentadas, sin embargo hay dos métodos: “quantitative methylation-specific PCR”, por sus siglas en inglés QMSP (PCR metilación específica cuantitativa) y pirosecuenciación que son altamente sensibles, cuantitativos, robustos, susceptible a amplio uso y de un costo menor^{31,32,33}.

Tabla II. Métodos para detección de metilación en DNA.

Método	Rendimiento	Material	Aplicación	Limitaciones
Metilación específica PCR (MSP)	Relativamente alto para muestras; bajo para genes	DNA de pacientes, DNA de líneas celulares, fluidos corporales (esputo, sangre, orina)	Análisis para nuevos marcadores de metilación, analizando relativamente gran número de muestras para conocer marcadores.	Cualitativo y permite falsos positivos.
MSP cuantitativo (Taqman, sybr-green)	Relativamente alto para muestras, dificultad para establecer cada gen. Requiere estandarización empírica	DNA de pacientes, DNA de líneas celulares, fluidos corporales (esputo, sangre, orina)	Análisis cuantitativo de DNA de pacientes, correlación con parámetros clínicos	Requiere optimización substancial y está limitado a secuencias blanco.
Pirosecuenciación	Moderado para muestras y genes, alto rendimiento para secuenciar	DNA de pacientes, DNA de líneas celulares, fluidos corporales (esputo, sangre, orina)	Análisis cuantitativo de DNA de pacientes, correlación con parámetros clínicos, análisis de más sitios CpG que MSP	Costo elevado y requiere equipo dedicado para esta técnica.
Microarreglos de expresión después de los perfiles de inversión de la metilación del DNA	Bajo para muestras, alto para genes	Lineas celulares	Descubrimiento de nuevos marcadores	Tasa grande de errores tipo I y tipo II
Restricción señalada escaneo genómico	Bajo para muestras, alto para genes	Lineas celulares	Descubrimiento de nuevos marcadores	Cobertura limitada (librerías de restricción), no hay correlación con la expresión
ChIP-on-chip	Bajo para muestras, alto para genes	Lineas celulares, potencialmente en material tumoral	Descubrimiento de nuevos marcadores	Nuevo, sesgos desconocidos, no hay correlación con expresión.

Se han empleado otras técnicas, que se utilizan para el análisis del patrón global de metilación como: amplificación de sitios intermetilados (AIMS)-PCR, así como CGH, la primera de estas técnicas ha sido evaluada por su reproducibilidad, sensibilidad y ha sido empleada para el análisis de metilación diferencial, se basa en cortar sitios intermetilados con una digestión inicial de una endonucleasa sensible a metilación Sma I cortando extremos romos, una segunda digestión con una enzima que es un isoesquizómero que corta dejando extremos pegajosos (Figura 4) . Estos fragmentos de DNA son ligados con dos adaptadores y amplificados por PCR, usando iniciadores específicos que hibridan a la secuencia adaptadora y al sitio de restricción^{34,35}.

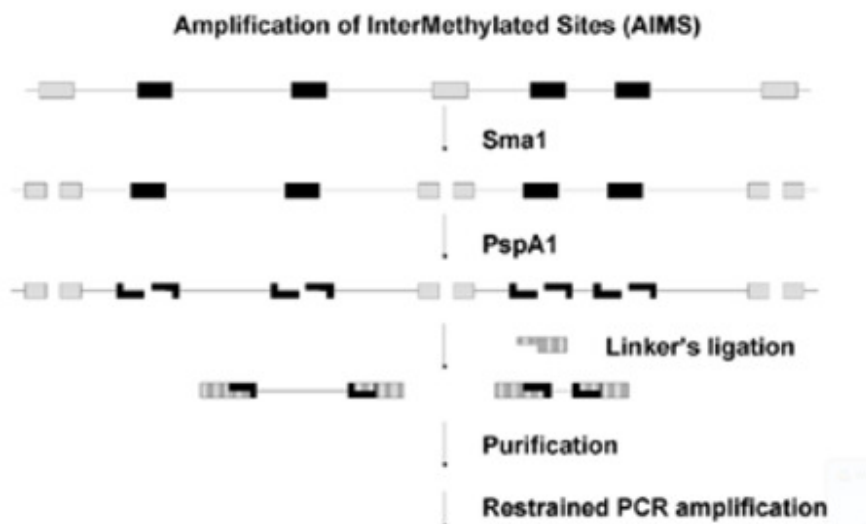


Figura 4. Diagrama de la técnica de amplificación de sitios intermetilados (AIMS).

En la técnica de hibridación genómica comparativa (CGH) se hibridan los productos de AIMS obtenidos de células tumorales y no tumorales en cantidades equimolares, sobre cromosomas en metafase. El producto de AIMS obtenido de la neoplasia se marca con "*Spectrum Green*" y el AIMS obtenido del DNA control con "*Spectrum Red*". Se miden las intensidades de ambas fluorescencias en cada

cromosoma mediante un sistema digital de análisis de imagen. En condiciones de normalidad se obtienen intensidades similares en el DNA problema y en el DNA control en una proporción de 1:1, en esta técnica acoplada al realizar un mapeo de los cromosomas, los cambios en el patrón de metilación dado por la presencia de señales verde o roja que indican los eventos de hipermetilación e hipometilación, los valores que determinan estos eventos está establecido una hipermetilación en valores por arriba de 1.20 e hipometilación por debajo de 0.80, cuando se realiza el análisis en el software y se revela una coloración amarilla hay una distribución muy similar de metilación.

2. Antecedentes.

En observaciones realizadas por Kramer *et al.*³⁶ en 23 casos de pacientes pediátricos con ependimomas intracraneales supratentoriales y de la fosa posterior; encontraron una región del cromosoma 6q la cual se piensa que puede estar involucrada en el desarrollo de los ependimomas en los niños.

Estudiando el gen supresor de tumor localizado en 22q11, Graus *et al.*³⁷, observaron que en 60% de los casos estudiados este gen estaba alterado, provocando una neurofibromatosis tipo 2.

Para detectar anomalías cromosómicas en los ependimomas Cartel *et al.*³⁸ realizaron un estudio con CGH, concluyendo que estas neoplasias del SNC muestran un perfil más frecuente en niños que en los adultos y que los ependimomas clásicos y anaplásicos con ganancia de 1q tienden a ocurrir en la fosa posterior de niños y son más agresivos.

En un estudio retrospectivo realizado en Praga con 31 pacientes pediátricos con ependimomas intracraneales, Zamecnik *et al.*³⁹ estudiaron las características de inmunohistoquímica e histológicas y estado de ploidía estimado por citometría de flujo. Concluyeron que la inmunopositividad del gen *p53* y/o *MIB-1 LI* es >5% (después de resección parcial) o *MIB-1 LI* es >15% (después de resección completa) fueron los indicadores más fuertes de agresividad del tumor y pobre pronóstico de la enfermedad, con disminución de la supervivencia libre de enfermedad y supervivencia global a 7 años.

Gilbertson demostró por CGH²⁶ que los ependimomas disponen de diversos patrones de comportamiento clínico y anomalías cromosómicas, dependiendo de su localización al describir las alteraciones moleculares en los ependimomas pediátricos comparados con los de los adultos

Lo anterior fue confirmado por Gilhuis *et al.*⁴⁰ quienes observaron que los ependimomas mixopapilares a nivel genético eran muy diferentes a los ependimomas cerebrales y espinales (grado II, OMS) y los ependimomas anaplásicos cerebrales (grado III, OMS).

Frigola *et al.*⁴¹ observaron en 20 muestras de carcinomas colorectales el patrón de metilación global ocupando la técnica de amplificación de sitios intermetilados (AIMS), mostrando el patrón diferencial de metilación entre las muestras tumorales.

En la línea celular HCT-116 de cáncer colorectal, Paz *et al.*³⁴ interrumpieron la actividad enzimática de las metiltransferasas DNMT1 y DNMTb3, observaron por medio de AIMS la disminución de la hipermetilación en islas CpG teniendo como consecuencia una activación de genes contiguos.

En 2005, Fraga³⁵ y su equipo de trabajo estudiaron a 80 gemelos monocigotos utilizando AIMS y CGH para observar los patrones de metilación demostrando que existen diferencias en la metilación entre gemelo monocigóticos y que además estas variaciones epigenéticas aumentan con la edad.

3. Justificación.

A pesar de los estudios moleculares realizados sobre los ependimomas (en la población mexicana nulos) no se tiene bien definida la relación entre el grado histológico y la agresividad del tumor. Se sabe que los ependimomas de grado II de malignidad son diferentes de los del grado III con base al porcentaje mitótico y al bajo nivel de polimorfismo nuclear. Sin embargo, las líneas base entre grado II y III permanece sin ser definida. Por otro lado, se piensa que los ependimomas son una colección de diferentes enfermedades moleculares y existen estudios que apoyan la creencia de que una nueva clasificación basada en sus características citogenéticas pueden ayudar a la identificación útil de un marcador pronóstico y a la vez proporcionar pistas para el entendimiento del desarrollo de estas neoplasias. Nuevas metodologías al momento están siendo diseñadas para permitir un análisis detallado del genoma y epigenoma de los distintos tumores, para posteriormente integrar la información obtenida por estas metodologías a los datos histológicos.

Con base en los antecedentes y lo anteriormente dicho, planteamos la necesidad del estudio de los ependimomas a nivel molecular en la población pediátrica mexicana de 9 muestras de pacientes del Departamento de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMNS XXI en México D.F por medio de Hibridación Genética Comparativa (CGH).

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Detectar alteraciones cromosómicas estructurales (ganancias y pérdidas), así como el patrón de metilación global de ependimomas mediante Hibridación Genómica Comparativa (CGH) acoplado a AIMS.

4.2. Objetivos particulares.

- Identificar si existen relaciones entre los diferentes tipos de ependimomas (clasificación histológica), las alteraciones genéticas y los patrones de metilación que se presenten.
- Observar las regiones cromosómicas con ganancias, pérdidas y alteraciones en el grado de metilación y verificar si se encuentran asociadas a genes involucrados en el ciclo celular o en el desarrollo tumoral.
- Si ése fuera el caso, determinar si dichos genes están asociados al mismo tipo de ependimoma.

5. Metodología.

Para cumplir con los objetivos planteados en el presente trabajo se realizó la siguiente metodología:

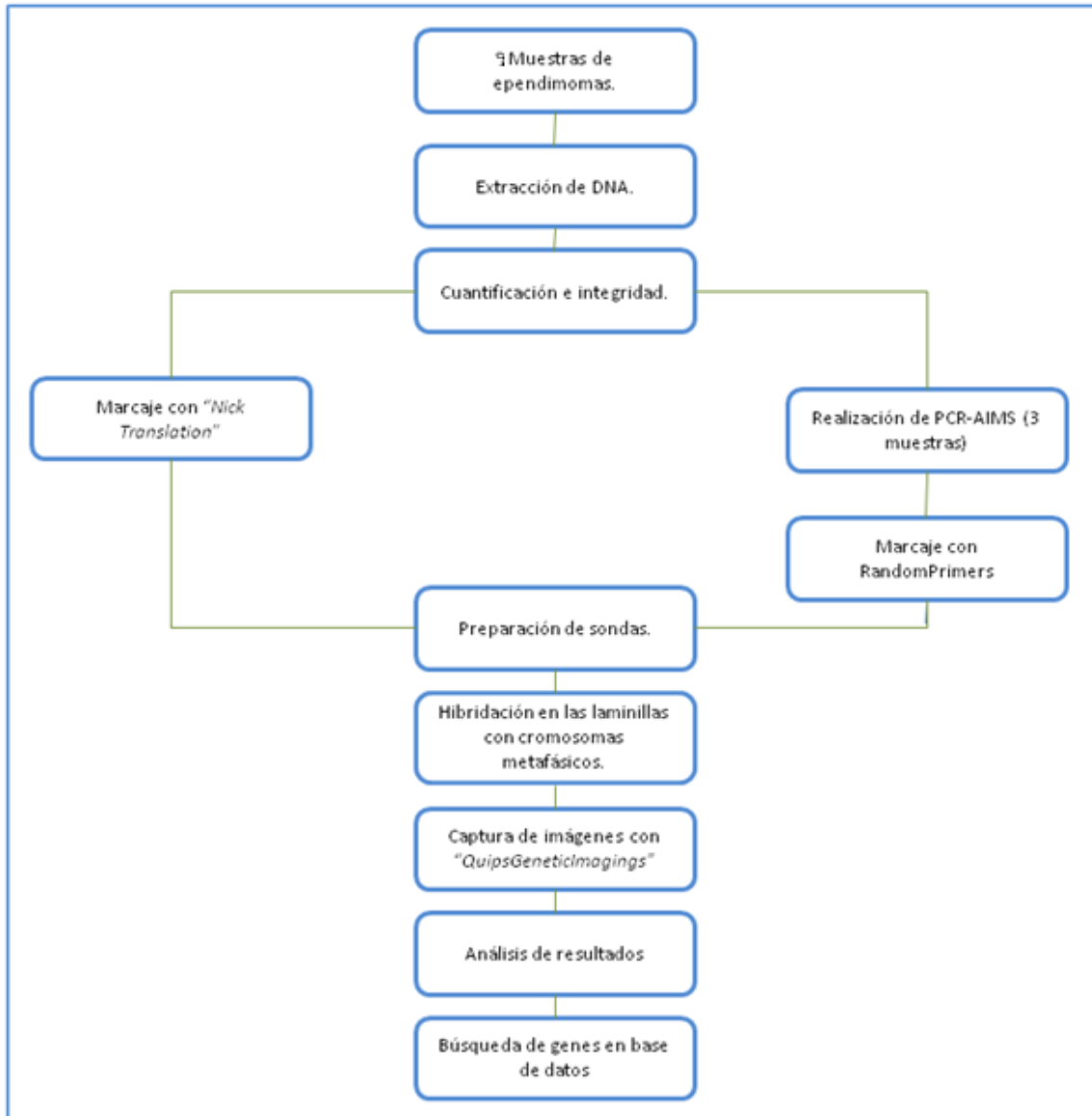


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología

5.1. Recolección de las muestras.

Se obtuvieron 9 muestras de ependimomas que fueron proporcionadas por el Departamento de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI. Estas fueron recolectadas de distintos pacientes entre los años de 2009 y 2010 en un estudio retrospectivo; las biopsias de los ependimomas fueron clasificadas por sus características histopatológicas por el Departamento de Patología del hospital.

5.2. Extracción del DNA del tejido por proteinasa K (técnica orgánica de fenol-cloroformo modificada).

Se tomaron 50 mg de tejido tumoral y se colocaron en un tubo eppendorf. Se añadieron 500 µl de amortiguador de lisis (con proteinasa K, 16.5 mg/ml), e incubó a 52° C toda la noche hasta disolver por completo todo el tejido. Se agregó 500 µl de fenol-cloroformo-isopropanol en una proporción de 25:24:1, respectivamente y se mezcló con vortex. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 10 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf agregándole un volumen igual de cloroformo, se volvió a mezclar por vortex y nuevamente se centrifugó 12,000 rpm durante 5 min. Se recogió la fase superior del sobrenadante cuidadosamente y se depositó en una columna microcon con membrana de hemicelulosa y se centrifugó a 6,000 rpm hasta que todo el sobrenadante traspasó la membrana y se depositó en el fondo del tubo. Después se lavó la membrana (donde se concentró el DNA) de 2 a 3 veces con agua destilada libre de nucleasas para limpiarla de cualquier disolvente que aun pudiera encontrarse en ella. Finalmente se obtuvo el DNA invirtiendo la columna y se le agregaron de

30 a 50 μl de agua destilada libre de nucleasas (para resuspender el DNA), centrifugando durante 5 min.

5.3. Cuantificación e integridad del DNA extraído.

Posteriormente se analizó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% en amortiguador TBE 1X (Tris base 0.089 M, ácido bórico 0.089 M y EDTA, pH 8, 0.002 M) durante 40 minutos a 100 volts. Se cargaron 2 μl de cada una de las muestras de DNA con 1 μl de azul bromoxifeno y se usó bromuro de etidio (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) como revelador de las bandas de DNA en un transluminador de luz UV de onda corta y se utilizó Alphamager como sistema de computo para tomar las imágenes. Se utilizó un marcador de peso molecular de DNA (1 Kb “Plus” DNA “Ladder”) para calcular el peso del DNA extraído. La cuantificación del DNA genómico se realizó por medio de espectrofotometría a 260 nm de absorbancia en luz UV para obtener la concentración del mismo (asumiendo que una densidad óptica equivale a 50 $\mu\text{l}/\text{ml}$), y a 280 nm en luz UV para establecer su pureza con la relación 260/280.

5.4. Preparación de la CGH.

5.4.1. Marcaje con “Nick Translation Kit”.

Se colocó un tubo eppendorf (por cada una de las muestra de DNA) en hielo permitiendo que el tubo se enfriara, al tubo se le adicionaron 25 μl de agua libre de nucleasas, 3 μg de DNA genómico extraído (con los μl que eran necesarios, con relación a la concentración de cada DNA muestra) 2.5 μl a 0.2 mM de “Spectrum Green” dUTP (para el DNA de cada paciente) o “Spectrum Red” dUTP (para el

DNA control), 5 µl a 0.1 mM de dTTP, 10 µl de dNTP, 5µl de amortiguador "*nick translation*" 10x, 2.5 µl de la enzima "*nick translation*", se mezcló brevemente por vortex e inmediatamente después se incubó 50 min en el caso del "*Spectrum Red*" dUTP y 15 minutos en el caso del "*Spectrum Green*" dUTP a 15 °C (iniciando así la reacción). Se calentaron los tubos por baño María a 90 °C durante 10 min (parando así la reacción), posteriormente se colocó en hielo y en la oscuridad.

5.4.2. Preparación de la sonda (mezcla de sondas de referencia y del paciente).

Se realizó una mezcla para cada tubo de DNA marcado con "*nick translación*" agregando a cada uno: 10 µl (200 ng) de "*Spectrum Green*" (etiquetado con "*nick translation*"), 10 µl (200 ng) del DNA genómico total de referencia con "*Spectrum Red*", 10 µl (10 µg) de human Cot 1-1, 2.1 µl de acetato de sodio 3 M, 52.5 µl de etanol al 100% para precipitar el DNA, se mezcló en vortex brevemente y se depositó sobre hielo seco durante 15 min al término de los cuales se centrifugó a 12,000 rpm por 30 min a 4 °C para obtener la pastilla DNA, se removió el sobrenadante y se dejó secar esta por 15 min a temperatura ambiente. Se resuspendió la pastilla en 3 µl de agua libre de nucleasas y 7 µl de amortiguador de hibridación para CGH (del "*Kit*" para CGH 32-801023 de "*Vysis*"), después se desnaturalizó la mezcla por calentamiento en baño de agua a 73 °C.

5.4.3. Hibridación de las sondas sobre las laminillas con cromosomas en metafase.

Se utilizaron laminillas con cromosomas metafásicos de individuos sanos de sexo masculino, de la marca "Vysys" ("*Normal metaphase CGH target slides*" con el número de catalogo 32-804023).

Se marcó el área de hibridación sobre las laminillas usando un lápiz con punta de diamante, se sumergieron en una solución desnaturalizante (49 ml de formamida, 7 ml de SSC 20X, y 14 ml de agua purificada mezclados) durante 5 min (se aseguró que la temperatura de la solución desnaturalizante fuera de 72-73 °C). Se deshidrataron las laminillas por dos minutos en etanol al 70%, seguido por dos minutos en etanol al 85% y dos minutos en etanol al 100%, posteriormente se colocaron las laminillas a 50 °C para permitir que el etanol se evaporara, y se agregó 10 µl de la mezcla de sonda desnaturalizada a las laminillas en metafase, se colocó un porta objetos y se sellaron con cemento de goma; las laminillas se pusieron dentro de una cámara húmeda en una incubadora a 37 °C durante 72 horas para permitir su hibridación.

5.4.4. Lavado de las laminillas hibridadas.

Se retiró el sello de cemento de goma a cada laminilla y se colocaron en una solución de lavado (0.4 x SSC / 0.3 % NP-40) a una temperatura de 75 °C, se agitaron las laminillas por algunos segundos y se dejaron reposar en esta solución durante 2 min. Luego se cambiaron a una nueva solución de lavado a temperatura ambiente y se agitaron nuevamente por 3 a 5 segundos dejándolas

reposar por un minuto, se sacó cada laminilla y sobre éstas, se realizó un goteo de agua libre de nucleasas, finalmente se dejaron secar en la oscuridad a 50 °C.

5.4.5. Visualización de la hibridación.

Para visualizar la hibridación se aplicaron 15 µl de DAPI II (diclorhidrato de 4',6-diamino-2-fenilindol) sobre cada metafase y se colocó un cubreobjetos a cada una de las áreas de hibridación y se selló con cemento de goma. Se almacenaron a – 20 °C para su posterior uso.

Las laminillas se visualizaron con el microscopio de fluorescencia, teniendo cuidado de no exponer las laminillas a la luz por un tiempo prolongado. Con el “*software Quips Genetic Imaging*” se seleccionaron de 15 a 20 metafases por paciente, se capturaron las imágenes con diferentes filtros, permitiendo así ver los dos fluoróforos por separado (“*Spectrum Green*” y “*Spectrum Red*”) la contratinción (DAPI II) y los tres colores simultáneamente.

Se clasificaron los cromosomas de cada una de las metafases de acuerdo al patrón de bandeo presente en ellos (con DAPI II se observa un patrón parecido al bandeo GTG).

5.4.6. Interpretación y Análisis.

Se conjuntaron los datos de 15 a 20 metafases capturadas para cada paciente, realizándose por medio del “*software*” un promedio de la proporción de la hibridación entre las dos sondas marcadas con “*Spectrum Green*” (DNA del paciente) y “*Spectrum Red*” (DNA de referencia). Esto se basa en una proporción de los colores verde/rojo, con valores en un intervalo menor a 1.20 y mayor a 0.80

para lo normal; una proporción mayor a 1.20 para ganancias de material cromosómico (predominio del verde sobre el rojo) y una proporción menor de 0.75 para pérdidas del material cromosómico (predominio del rojo sobre el verde).

5.5. Elaboración del AIMS.

De las nueve muestras de DNA que se extrajeron, tres se ocuparon para la realización del AIMS. Se trataron con dos enzimas de restricción; el primer corte se efectuó con 4 µg de DNA y 1 µl (20 U) de la enzima Sma I (esta enzima es metilasa sensible, por lo tanto corta regiones no metiladas) durante 6 h a una temperatura de 25 °C. Después del primer corte de restricción se realizó un segundo corte con 4 U de la enzima Xma I (la cual corta sitios metilados) durante 3 h a 37 °C para obtener extremos cohesivos, posteriormente se les adicionó 2 nmol de los adaptadores(oligonucleótidos) MCF y el *blue* (con las secuencias 5'-CCGGTCAGAGCTTTGCGAAT-3' y 5'- ATTCGCAAAGCTCTGA- 3', respectivamente) a 65 °C durante 2 minutos, inmediatamente se incubó por una hora a temperatura ambiente, transcurrido el tiempo se les adicionó T4 DNA ligasa durante 12 hrs a 16°C. El producto ligado se amplificó con un par de "*primers*" (Blue I-CCGGG-CGCG, Blue II-CCGGG-CAAC)⁴¹.

Para la amplificación se usaron 1 µg del DNA cortado y ligado anteriormente llevándolo a un volumen final de 25 µl, empleando 2 U de *Taq* polimerasa, 1.1 µM de cada primer, 125 µM de cada dNTP's y amortiguador para PCR (Tris-HCl 10 mM, pH 8.0, KCl 50 mM, MgCl₂1.5 mM).

Estos productos de PCR se utilizaron para el marcaje con el "RadPrime DNA labeling System" y la elaboración de un CGH para observar el patrón de metilación, usando el "*Spectrum Red*" para ver las regiones hipometiladas y el "*Spectrum Green*" para observar las hipermetiladas.

5.6. Control para la reacción del “Nick Transltion Kit”.

Se ocupó como control positivo 3 µl de DNA control “*Spectrum Green MPE 600*” (No. de catalogo 32-800227) para el CGH convencional, que fue sometido a las mismas condiciones de marcaje e hibidación de las muestras de DNA extraído de los ependimomas.

5.7. Relación de los datos obtenidos por medio de CGH con los datos histológicos.

Se relacionaron los datos obtenidos por la técnica de CGH con los datos proporcionados por el Departamento de Oncología Pediátrica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI como son: localización del tumor, edad del paciente y clasificación histológica. Por último se realizó la búsqueda de genes asociados a las alteraciones cromosómicas e hipo e hipermetilación en la siguiente dirección electrónica: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview> para acceder a la base de datos del NCBI.

6. Resultados.

En el presente trabajo se incluyeron 9 pacientes. La tabla III indica características como: edad, año de diagnóstico (Dx), sitio de localización del tumor e histología (datos proporcionados por el Departamento de Oncología del Hospital de Pediatría del CMSXXI) así como el número de paciente, y el nombre asignado en el laboratorio.

Tabla III. Características clínicas de los pacientes y año de colecta del tumor.

No. DE MUESTRA	No. DE PACIENTE	EDAD	SEXO	AÑO DE COLECTA	SITIO	HISTOLOGIA
1	CSD	14 años	M	2010	Fosa posterior	Anaplásico
2	ERR	2 años 6 meses	F	2009	Supratentorial	Anaplásico
3	VCP	13 años	M	2009	Supratentorial	Anaplásico
4	MRS	11 años	F	2009	Infratentorial	Celular clásico
5	ACV	3 meses	F	2010	Supratentorial	Anaplásico
6	GHD	4 años	F	2010	Fosa posterior	Anaplásico
7	GSC	1 año 8 meses	F	2010	Fosa posterior	Anaplásico
8	GCD	6 años	F	2009	Supratentorial	Anaplásico
9	CHJ	8 años	M	2010	Fosa posterior	Celular clásico

La edad del total de los pacientes se situó entre los 3 meses a los 14 años con una media de 6 años. El porcentaje por género se muestra en la figura 6.

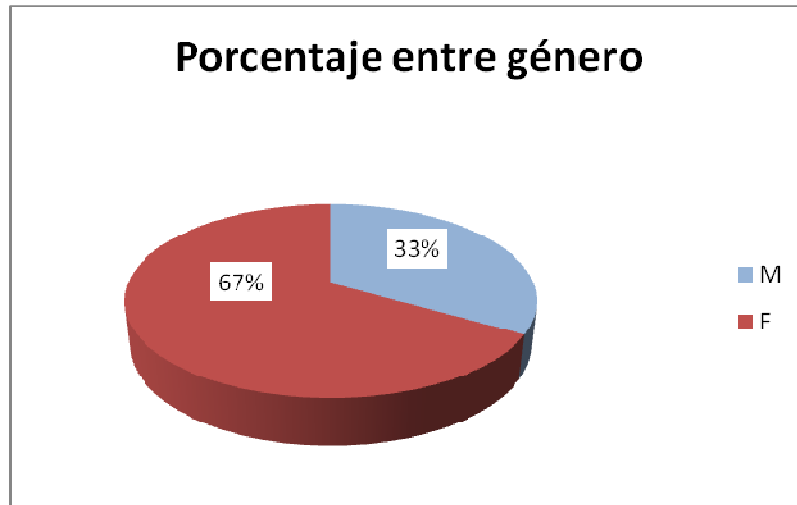


Figura 6. Proporción de pacientes por género.

La mayoría de los pacientes (45%) desarrollaron el tumor en la fosa posterior, siendo el sexo femenino el que presentó la mayor frecuencia de estos. Los ependimomas localizados en la zona supratentorial representaron también el 45% (figura 7).

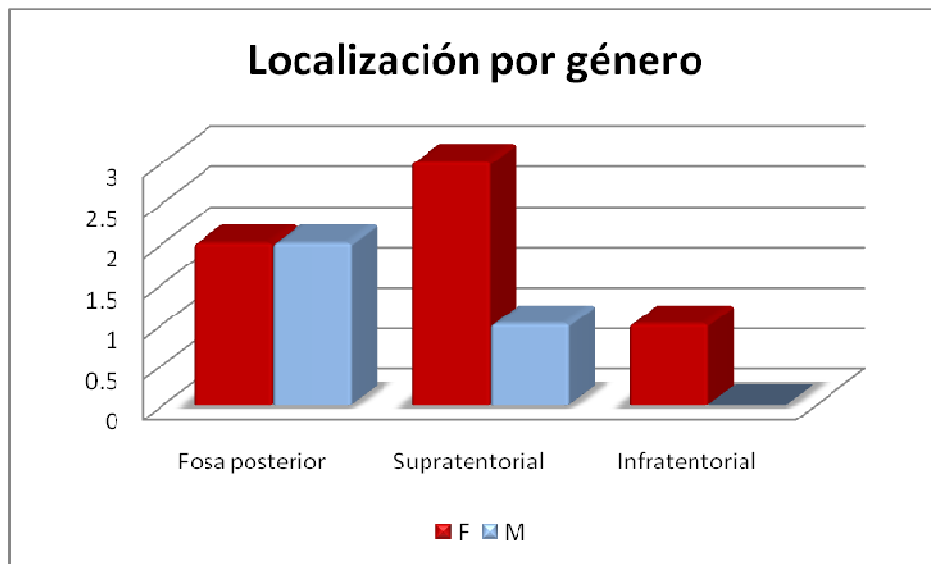


Figura 7. Localización del ependimoma, número de pacientes que lo presenta y género.

En cuanto a la clasificación histológica, se observó que el ependimoma anaplásico fue el más frecuente con 7 casos (de los cuales 5 se presentaron en pacientes de sexo femenino y 2 en pacientes de sexo masculino) lo que representa el 77% del total y el ependimoma celular clásico con 2 casos con el 23% (de sexo masculino). La figura 8 muestra el número de pacientes que presenta cada tipo de ependimoma.

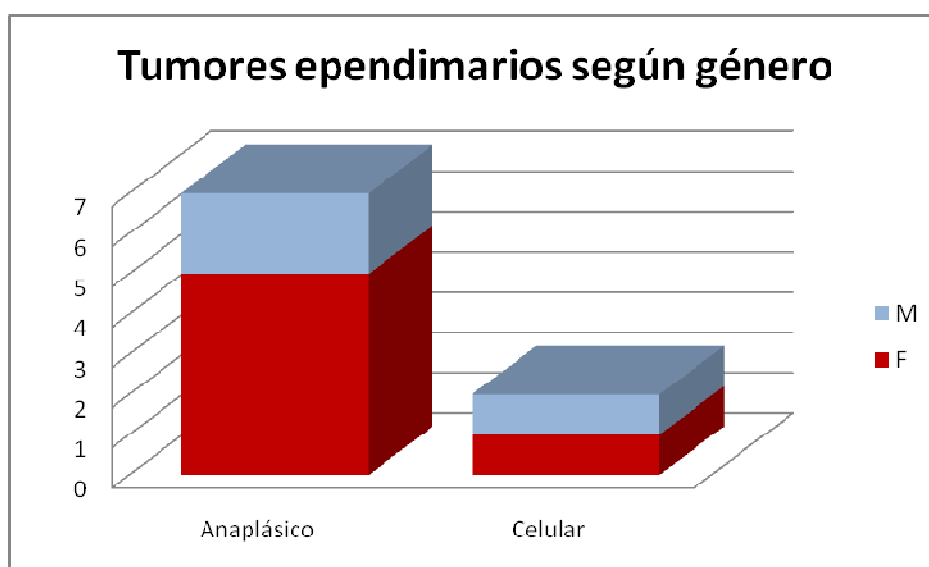


Figura 8. Tipo de tumor (clasificación histológica) y número de pacientes que lo presentan por género.

En la figura 9 se puede observar la integridad del DNA extraído de las muestras de ependimomas y el tamaño de los fragmentos de DNA (peso molecular en pares de bases) que fue obtenido al interpolar las muestras de DNA con un marcador de peso molecular (1 Kb DNA "Ladder" de Invitrogen).

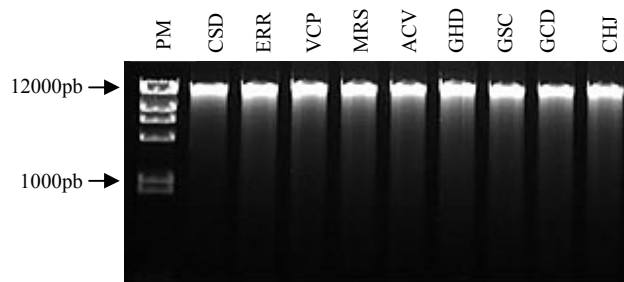


Figura 9. Integridad del DNA extraído de las 9 muestras de ependimomas.

La concentración del DNA obtenido de los ependimomas, la pureza, así como el año de colecta de las muestras tumorales se indica en la tabla IV.

Tabla IV. Concentración y pureza del DNA extraído de las muestras tumorales.

No. de paciente	Año de colecta	Concentración $\mu\text{g/ml}$	Pureza
** CSD	2010	2020.7	1.64
* GHD	2010	471.2	1.60
* ERR	2009	6968.2	1.56
* MRS	2009	1844.7	1.74
* ACV	2010	744.2	1.52
** VCP	2009	2678.7	1.60
* GSC	2010	2042.6	1.62
*GCD	2009	756.8	1.77
** CHJ	2010	1098	1.63

* Muestras utilizadas para el análisis con CGH

**Muestra utilizada para análisis con CGH y AIMS-CGH.

Como se indica en la tabla IV la muestra tumoral de la que se extrajo la menor cantidad de DNA fue la GHD que presentó 471.2 $\mu\text{g/ml}$, la muestra con mayor concentración fue la del paciente ERR con 6968.2 $\mu\text{g/ml}$. Por último la media de la pureza del DNA obtenido fue de 1.67. Tanto la integridad del DNA como el peso molecular (figura 19) y la concentración y pureza (Tabla IV) estuvieron dentro de

los valores requeridos para realizar el CGH. El DNA de los pacientes marcados con un asterisco (ERR, MRS, ACV, GHD, GSC y GCD) fueron utilizados para realizar el CGH convencional y los marcados con doble asterisco (CSD, VCP y CHJ) además de CGH se les realizó CGH-AIMS. De estas nueve muestras, seis fueron de niñas y tres de varones.

La figura 10 muestra la estandarización de el marcaje con "*Nick traslation*" con el DNA del paciente ERR (marcado con "*Spectrum Green*") y del DNA control (marcado con "*Spectrum Red*"). También se observa en el primer carril (de izquierda a derecha) el marcador de peso molecular de 100 pares de bases, en el segundo carril el DNA normal (DNA control) sin marcar y en el tercer carril el DNA del paciente ERR sin marcar; los carriles 2 y 3 muestran los DNA que se marcarían posteriormente. En la imagen (figura 11) se puede observar que al mismo tiempo de que la enzima adhiere los fluoróforos al DNA también lo corta en fragmentos de menor peso. El tamaño de los fragmentos obtenidos al cortar el DNA (de los pacientes y control) con la enzima de "*Nick traslation*" se observa en los carriles 4 y 5. Estos fragmentos deberían ser lo más parecido posible (entre el DNA control y los DNA de los pacientes) en cuanto al tamaño y en cuanto al peso molecular, para ser hibridados.

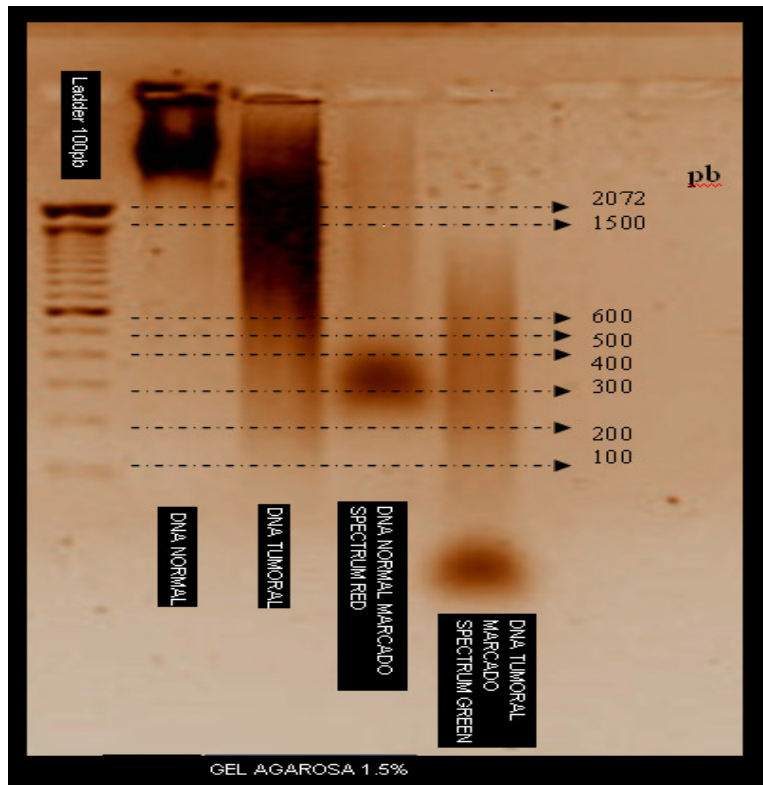


Figura 10. Marcaje con “Nick translation”.

La figura 11 se enseña la micrografía, de una metafase hibridada con el DNA del paciente CSD y con el DNA del control, tomada con el microscopio de fluorescencia que contiene filtros tricromáticos permitiendo demostrar los dos fluoróforos (verde y rojo) y la contratinción (en azul). Al combinar los dos fluoróforos se ve la imagen con un color compuesto (verde opaco) y finalmente se observa la metafase con un patrón de bandas GTG con el cual se clasifican los cromosomas por su patrón de bandeo. Se seleccionaron de 15 a 20 metafases por paciente para el análisis. Las metafases deben tener la menor cantidad de grumos posibles (los grumos se presentan cuando los fragmentos obtenidos al realizar el marcado de las sondas son muy grandes) y deben de tener un revelado no opaco lo más uniformemente visible.

La imagen compuesta es la que el “*software Quips Genetic Imaging*” utiliza para realizar el análisis de la hibridación mediante los píxeles que detecta, obtiene las pérdidas y ganancias en cada región; un predominio del verde sobre el rojo da como resultado una ganancia y un predominio del rojo sobre el verde es una pérdida.

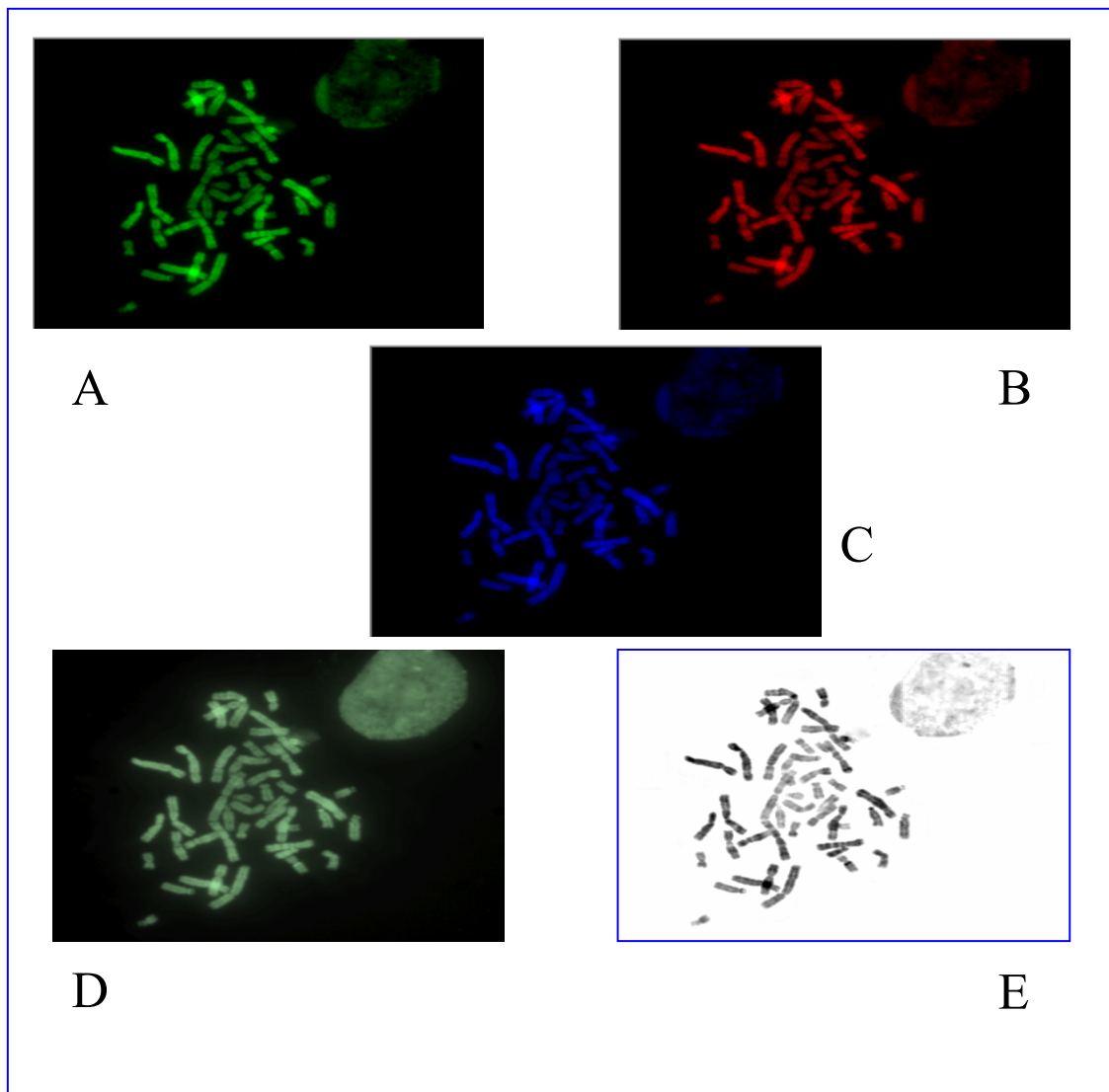


Figura 11. Micrografía con distintos filtros de una metafase hibridada, del paciente CSD obtenida mediante CGH. A: Spectrum Green (DNA del paciente). B: Spectrum Red (DNA control). C: Con DAPI II. D: Imagen compuesta. E: Patrón de bandas GTG.

En la figura 12 se presenta el cariotipo efectuado a una de las metafases hibridadas, en distintos colores (verde, rojo, azul, compuesto y patrón GTG). Se toma como referencia el patrón de bandas GTG para realizar el cariotipo. Cada par cromosómico analizado tiene un promedio de cromosomas seleccionados (14 a 16), por lo que en la mayoría de las metafases escogidas es muy difícil ver la dotación diploide completa. En la metafase presentada en la figura 12 solo se observan 38 cromosomas seleccionados.

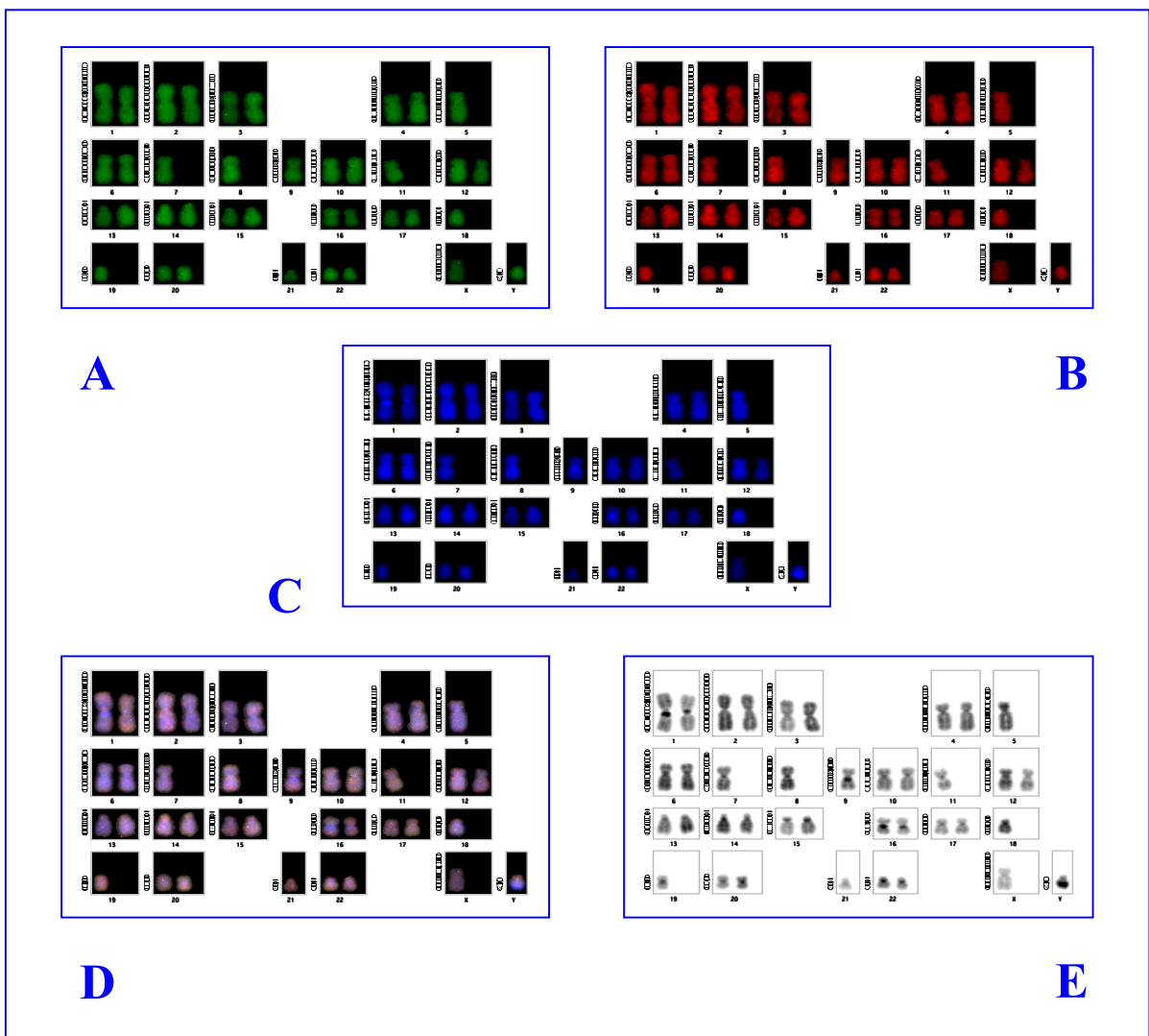


Figura 12. Cariogramas de una metafase hibridada del paciente. A: Hibridación con “*Spectrum Green*”. **B:** Hibridación con “*Spectrum Red*”. **C:** Con DAPI II. **D:** Imagen compuesta. **E:** Patrón de bandeado tipo GTG.

Las figuras 13 y 14 muestran la proporción del total de cromosomas analizados indicando el número de cromosoma (clasificación al realizarse el cariotipo) y el total de cromosomas empleados para cada uno de ellos; en la figura 14 se especifica cada uno de los cromosomas con una línea de color rosa, mientras que en la figura 15 solo se muestra el promedio de los cromosomas utilizados (14 a 16 para cada cromosoma) con una línea azul.

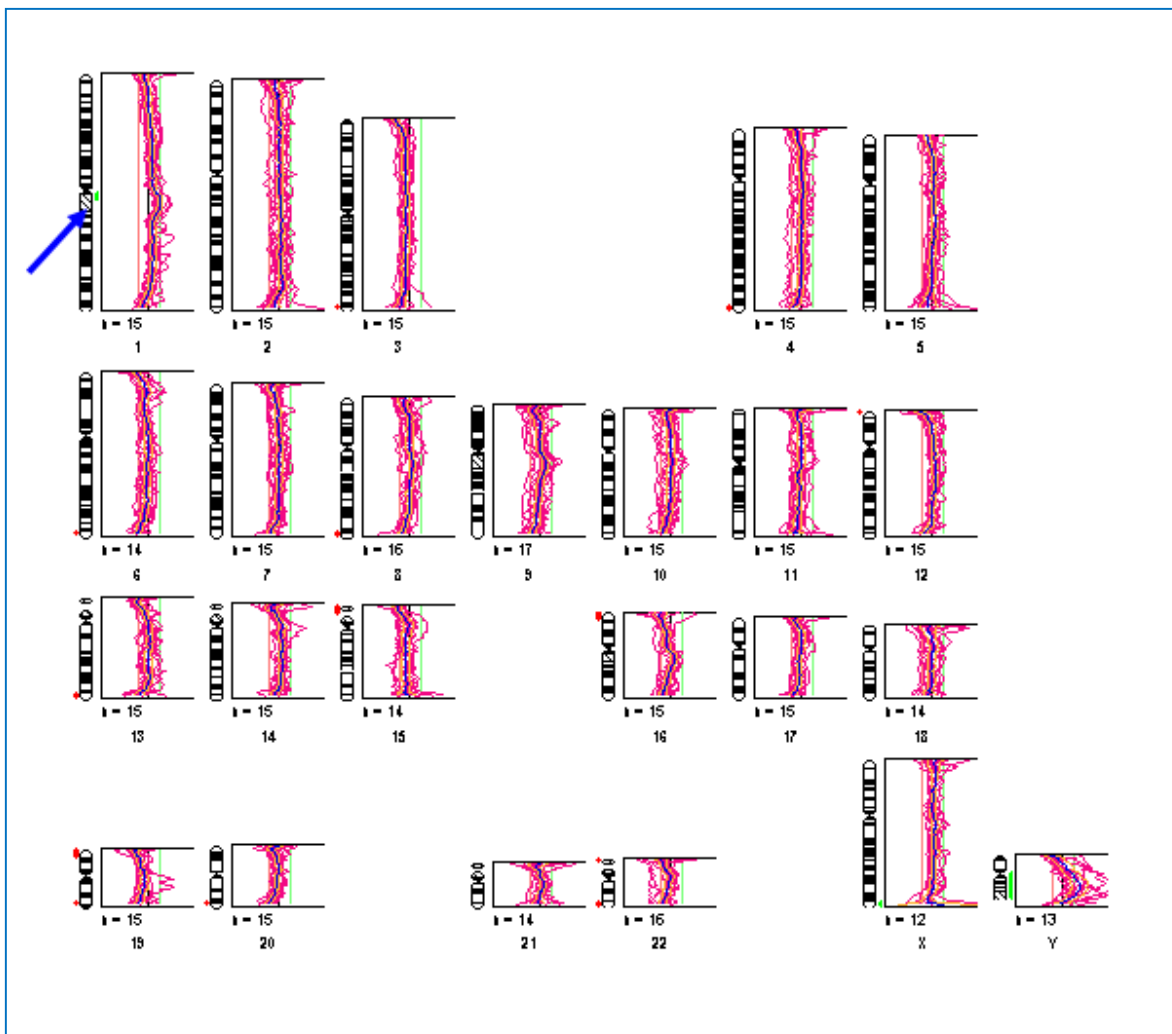


Figura 13. Análisis de la proporción de hibridación para cada uno de los cromosomas. Las barras a la derecha del cromosoma indican niveles altos de amplificación (verde: relación paciente/control > 1.2). Barras a la izquierda indican pérdidas (rojo: relación paciente/control < 0.8). Las líneas rosas corresponden a valores para cada metafase analizada. n: Numero total de cromosomas analizados para ese cromosoma. La flecha azul indica una alteración (ganancia) interesante.

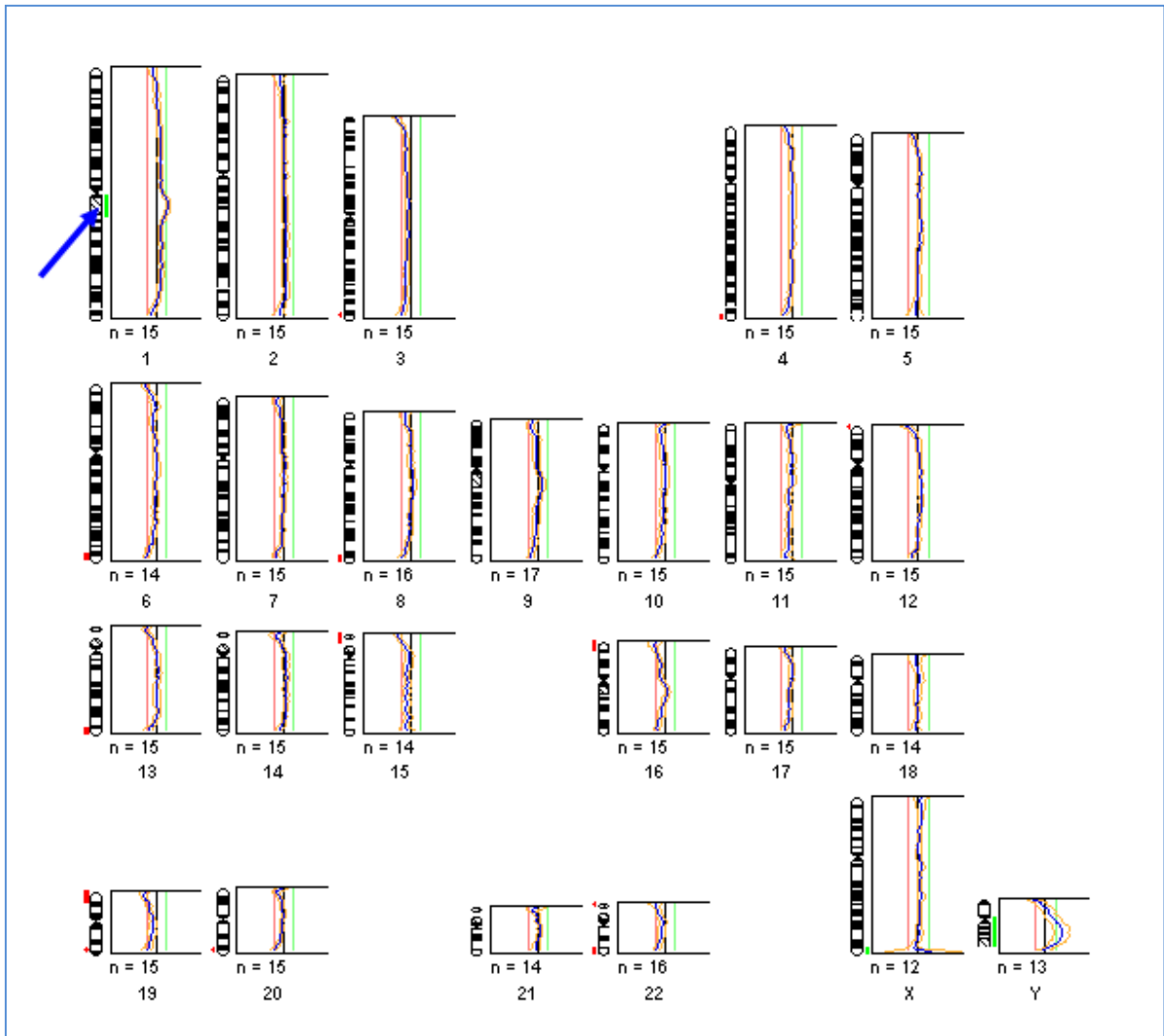


Figura 14. Promedio total para cada par de cromosomas analizados por “software Quips Genetic Imaging”. Las barras a la derecha del cromosoma indican niveles altos de amplificación (verde: relación paciente/control > 1.2). Barras a la izquierda indican pérdidas (rojo: relación paciente/control < 0.8). Si la media tiende hacia la izquierda el software representa con una pérdida (banda color rojo del lado izquierdo), si la media tiende hacia la derecha la representa como una ganancia (banda color verde del lado derecho).

En la figura 15 se muestra el control positivo de DNA el “Spectrum Green” MPE 600. Este verifica el desarrollo de la reacción de “Nick Translation Kit”. El MPE 600 es extraído de una línea celular de cáncer de mama inmortal, de la cual, se conocen las alteraciones confirmadas por el análisis de CGH. Las alteraciones mostradas en nuestro control son las descritas por Vysis (pequeña deleción cerca de la parte terminal del brazo corto del cromosoma 1, ganancia en 1q; pérdida en el brazo corto del cromosoma 9 y deleción distal sobre el brazo largo del cromosoma 11).

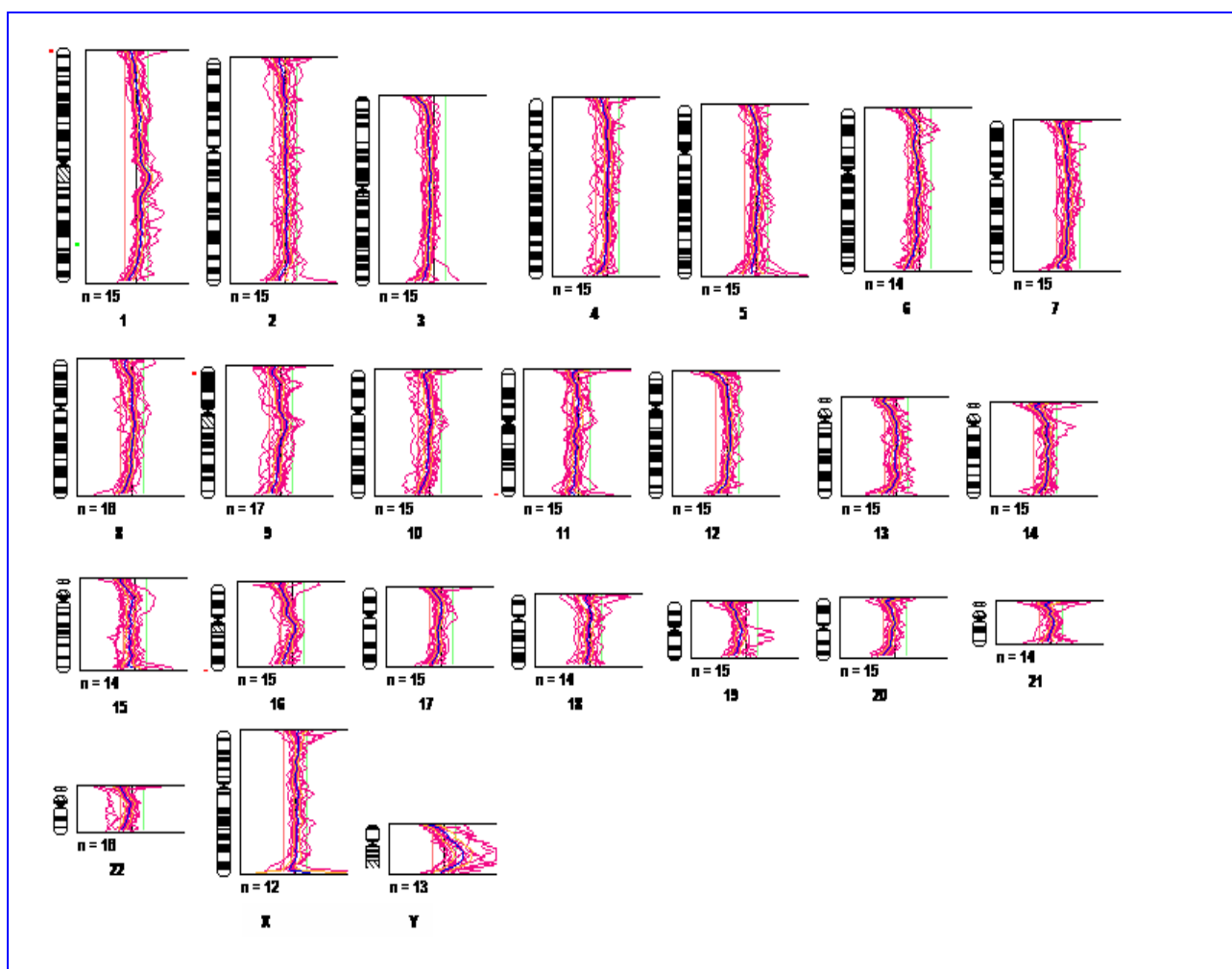


Figura 15. Control positivo de DNA MPE 600 para la reacción del “Nick Translation”.

En tabla V se muestra el total de las alteraciones cromosómicas encontradas en éste trabajo. El único paciente que no presentó alteraciones en el estudio con CGH fue el CHJ. Mientras que los pacientes GHD y GCD mostrarán la mayor cantidad de alteraciones con 10 y 15, respectivamente. Esto representa el 39.68% del total de anomalías.

Tabla V. Regiones cromosómicas con alteración presentes en cada paciente.

Nombre asignado	HISTOLOGÍA	LOCALIZACIÓN DEL TUMOR	REGIÓN CROMOSÓMICA CON ALTERACIÓN	
			GANANCIAS	PÉRDIDAS
ACV	Anaplásico	Supratentorial		14q32.3; 20p13;21q22.3; 22q13.3
ERR	Anaplásico	Supratentorial	1q12;9q12; 21p13; 22p13	
GCD	Anaplásico	Supratentorial	1p11-1q11;3q25.3-3q26.1; 5p11-5q11.1-5q11.2; 9q12 9q13; 15p11.1-15q11.1; 16q11.1-16q11.2-16q12.1	16p13.3; 17p13,17q25; 20q13.3; 22q13.3
CSD	Anaplásico	Fosa posterior	14q32.3	
GSC	Anaplásico	Fosa posterior	8p23.3; 12p13.3	3q29; 11p15.5; 12p13.3,12q24.33; 14q32.3; 19p13.3,19q13.3,19q13.4; 21p13-21p12; Xq27-Xq28
GHD	Anaplásico	Supratentorial	1q12-1q21.1; 15q26.3; Xq28	3q29; 4q35;6q27; 8q24.3; 10q26.3; 12p13.3; 13q34; 15p13-15p12; 16p13.3; 19p13.3-19p13.2, 19q13.4; 20q13.3; 22p13,22q13.3; Xq28
CHJ	Celular clásico	Fosa posterior		
MRS	Celular clásico	Infratentorial	1p36.3; 2q37.3; 6p25; 17p13,17q25; 21p13	3q29
VCP	Anaplásico	Fosa posterior	5q35.3; 9q34.3; 10p15; 14q32.3; 15q26.3; 18q23.; 21p13; 22p13	13p13, 17q25; 18p11.32

En la figura 16 se resumen las alteraciones cromosómicas encontradas en el presente trabajo, además de indicar con flechas de color azul las más interesantes.

Se observaron 63 alteraciones cromosómicas (Tabla V y figura 16), de las cuales 30 fueron ganancias y 33 fueron pérdidas; el cromosoma que presentó la mayor cantidad de regiones alteradas fue el 22 con siete alteraciones que representan el

8.13% del total, seguido del 21 y 19 (con cinco cada uno), el 15, 14, 12, 3 y 1 (cuatro cada uno) con el 6.97%, después los cromosomas 12, 14 15, 17 y 21 con el 5.81%; 7 y 11 no presentaron ninguna anomalía.

En los cromosomas 1, 2, 5, 7, 9 y 11 no se observaron pérdidas, en tanto en los 7, 11, 13, 17, 19 y 20 no hubo ganancias.

Las regiones cromosómicas con el mayor porcentaje de anomalías fueron la 14q32.3 y la 21p13 con el 4.65% cada una, seguidas de las regiones 1q12, 3q29, 6p25, 15p13, 19p13.3, 22p13 y 22p 13.3 cada una con 3.48%.

Las alteraciones localizadas en regiones teloméricas representan el 79.06% y las localizadas en regiones centroméricas o subcentroméricas tienen el 12.79% del total.

Las regiones que presentaron alteraciones y que son consideradas de interés por su localización en el cromosoma son: 1q12, 3q25.3, 9q12, 12p13.3, 14q32.3, 19p13.2, 19q13.3 y Xq27 que se señalan con flechas azules en la figura 16. Además en la figura 16 se muestra un resumen de las alteraciones encontradas en el estudio.

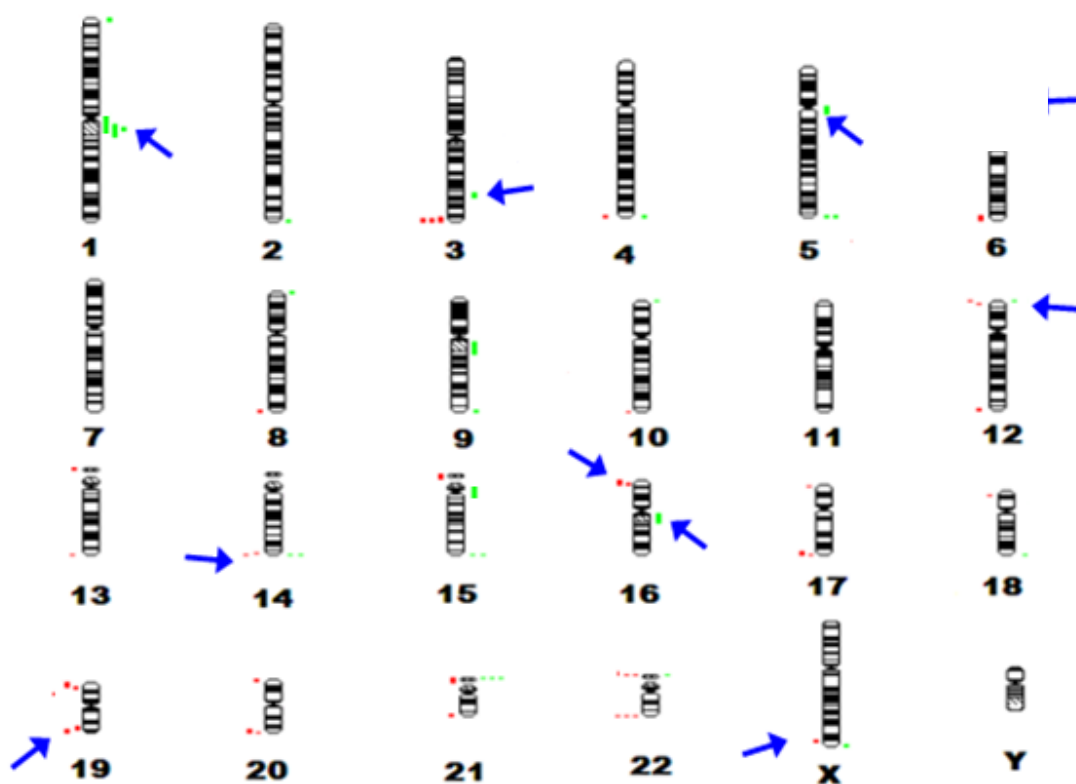


Figura 16. Alteraciones cromosómicas encontradas en el presente estudio. Las barras a la derecha del cromosoma indican niveles altos de amplificación (verde: relación paciente/control > 1.2). Barras a la izquierda indican pérdidas (rojo: relación paciente/control < 0.8). Las flechas azules indican las alteraciones que son de interés por el sitio y cromosoma en donde se localizan.

En la tabla VI se muestran algunas regiones que por su localización, el número de veces que se repitieron y/o por tener algún gen que participe en el ciclo celular o en algún tipo de desarrollo tumoral, resultaron de interés en el presente estudio.

Tabla VI. Regiones cromosómicas alteradas y algunos genes presentes en ellas.

CROMOSOMA	REGIÓN CROMOSOMICA	ALTERACIÓN	GENES
1	1q21 1p11-1p13 1q21 1q21	ganancia ganancia ganancia ganancia	<i>NOTCH2</i> <i>NOTCH2</i> <i>CLK2</i> <i>MCL1</i>
3	3p12-3q11.2 3q25.32 3q25.32	ganancia ganancia ganancia	<i>ILI2A</i> <i>CCNL1</i> <i>MLF1</i>
4	4q34-4q35	ganancia y pérdida	<i>HPGD</i>
6	6p25	ganancia y pérdida	<i>HUS1B</i>
8	8q24.3 8q24.3	pérdida pérdida	<i>LY6E</i> <i>LY6H</i>
9	9q11-9q13	ganancia	<i>PDGFA</i>
11	11p15.5	pérdida	<i>P57</i>
12	12p13.32	ganancia y pérdida	<i>CCND2</i>
13	13q34	pérdida	<i>LOC122258</i>
19	19q13.2 19q13.2 19p13.3 19p13.3 19p13.3 19p13.3 19p13.3 19q13.3	pérdida pérdida pérdida pérdida pérdida pérdida pérdida pérdida	<i>JUNB</i> <i>JUND</i> <i>TNFAIP8L1</i> <i>VAV1</i> <i>NOVA2</i> <i>PTOVI</i> <i>RRAS</i>
21	21q21.3-21q22.1 21q21.3	pérdida pérdida	<i>RIPK4</i> <i>SNFILK</i>
22	22q13.33	pérdida	<i>RABL2B</i>
X	Xq28 Xq27.3 Xq27.3	ganancia y pérdida pérdida pérdida	<i>RAB39B</i> <i>CTAG2</i> <i>MAGEA5</i>

A groso modo algunos de estos genes participan en el ciclo celular, o son factores de crecimiento, colaboran en el desarrollo tumoral, son oncogenes y/o intervienen en algún carcinoma en específico. También se presentan diversos genes que se observan en el desarrollo particularmente en diferenciación o se expresan en el SNC.

Con respecto a los resultados del AIMS se estandarizó los cortes con las enzimas Sma I y Xma I, a las 6 y 3 h respectivamente usando 1µg DNA genómico, los cortes con las enzimas se muestra en la figura 17.

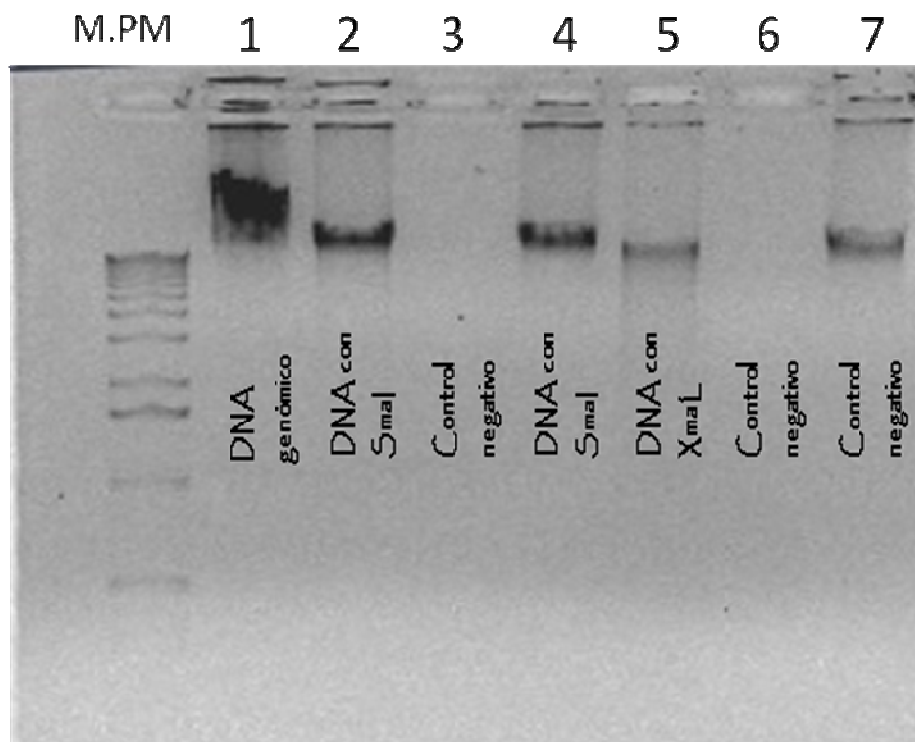


Figura 17. Estandarización de los cortes enzimáticos con Sma I (sensible a metilación) y Xma I. M.PM marcador de peso molecular de 1kb; carril 1 DNA genómico ; carril 2 DNA genómico tratado con enzima Sma I; carril 3 control negativo sin DNA y Sma I; carril 5 DNA genómico tratado con enzima Xma I; carril 6 control negativo sin DNA y Xma I; carril 7 control positivo solo con Xma I en gel de agarosa al 1%.

Mientras tanto la estandarización de la reacción de ligación usando 1µg DNA de fago lambda cortado, la T4 DNA ligasa se observa en la figura 18.

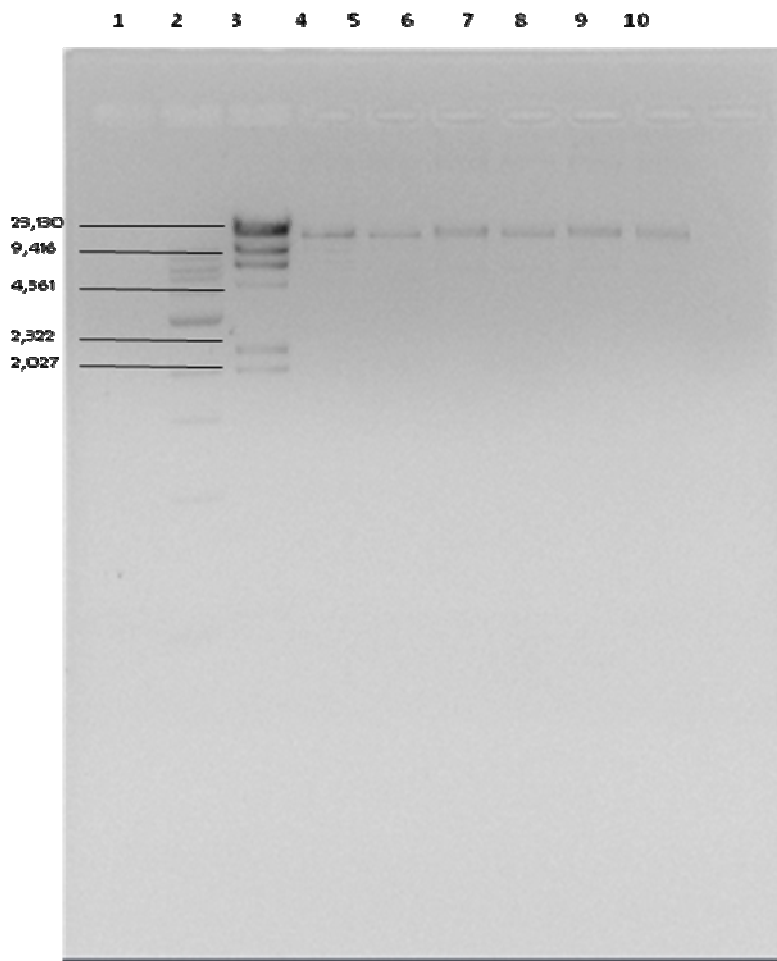


Figura 18. Reacción de ligación con la enzima T4 DNA ligasa, utilizando 1 µg DNA de fago lambda cortado. En el carril 3 se muestra el DNA del fago cortado, la banda superior tiene un peso de 23, 130 pb mientras que la inferior es de 2, 027 pb; del carril cuatro al nueve se observa la ligación del DNA viral con diferentes concentraciones de T4 DNA ligasa que van de 5 µl a 3 µl (4 U por µl).

Se realizó la estandarización de la última fase de la técnica de AIMS que consiste en la amplificación por PCR de los sitios intermetilados que se originan después de los cortes al DNA (de muestras tumorales) con las enzimas Sma I y Xma I. En la figura 20 se muestran la amplificación de las secuencias intermetiladas de los pacientes CSD, VPC y CHJ ocupados para observar el patrón de metilación.

Para que finalmente se marcara con "*Random primer*" estos productos de PCR de los AIMS para realizar el CGH y así poder analizar el patrón de metilación global usando el *softwareQuips Genetic Imaging*.

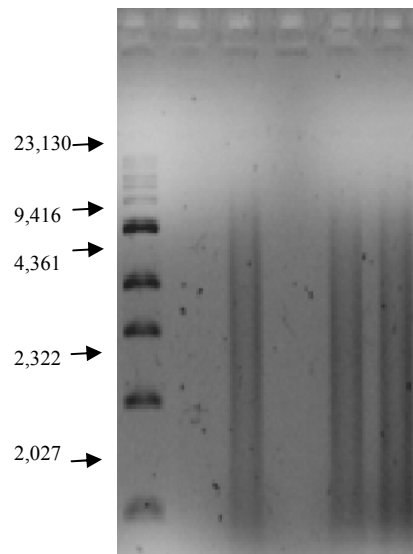


Figura19. Productos amplificados de las secuencias intermetiladas de las muestras. Carril uno marcador de peso molecular (PM), carriles dos, tres y cuatro productos de PCR de AIMS.

Los productos de PCR obtenidos y marcados (por "*random primer*") se hibridaron en cromosomas metafásicos (figura 20)

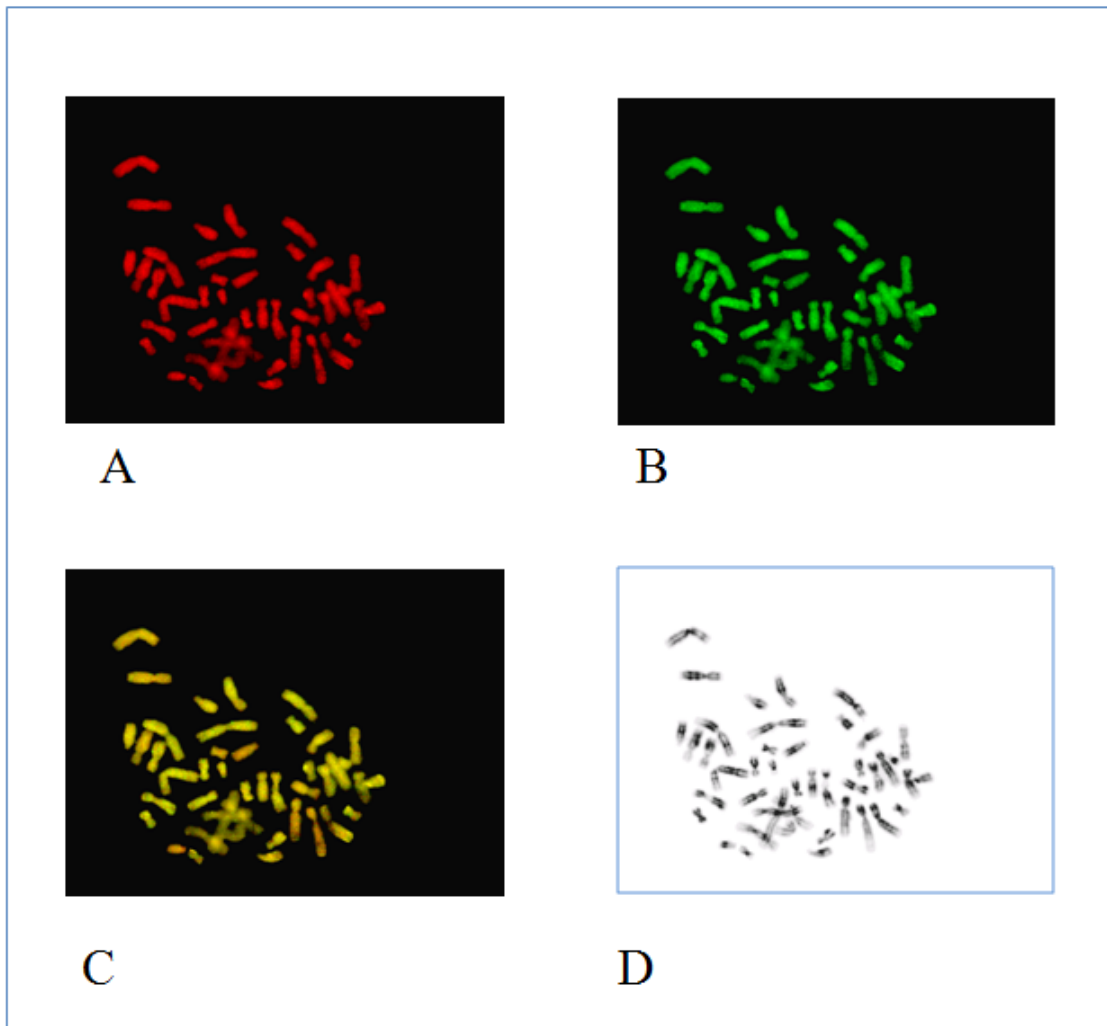


Figura20. Cariogramas de una metafasehibridada con los productos de amplificación de los sitios intermetilados del paciente CHJ.A: Hibridación con “*Spectrum Red*”. B: Hibridación con “*Spectrum Green*”. C: Imagen compuesta. D: Patrón de bandeo tipo GTG.

En la figura 20 se muestra la hibridación en los cromosomas de los productos de AIMS, lo cual permitió observar tres regiones hipometiladas(3p21.33- 3p21.32 y 5q34)y dos hipermetiladas(18q21.1 y 18q21.2) en los pacientes VCP y CSD. En el paciente CHJ no se notó ninguna anomalía (Tabla VII). Mientras tanto en la figura 21 se expone el ideograma cromosómico del paciente VCP y se observan algunas de las alteraciones señaladas en la tabla VII.

6

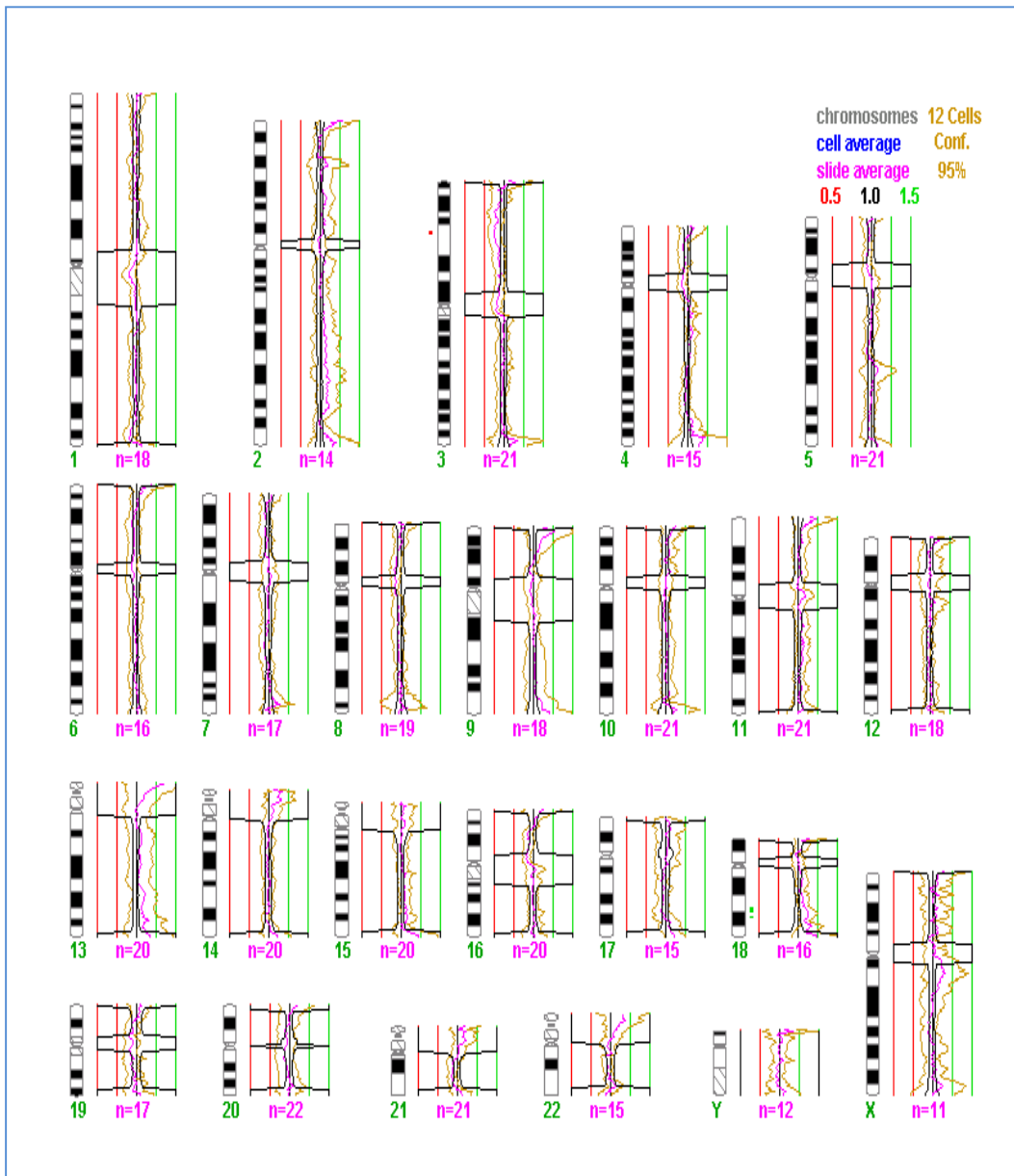


Figura 21. Ideograma cromosómico del paciente VCP. Se observa una región hipometilada en el cromosoma tres y dos regiones hipermetiladas en el cromosoma 18.

Tabla VII. Regiones cromosómicas con hiper e hipo metilación de los tres pacientes.

Nombre del paciente asignado	Localización del tumor	Regiones cromosómicas
VCP	Fosa posterior	3p21.33- 3p21.32, 18q21.1 y 18q21.2
CSD	Fosa posterior	5q34
CHJ	Fosa posterior	-

Por último, se buscaron genes ubicados en las regiones con hiper e hipo metilación, en la base de datos del NCBI (Figura 22).

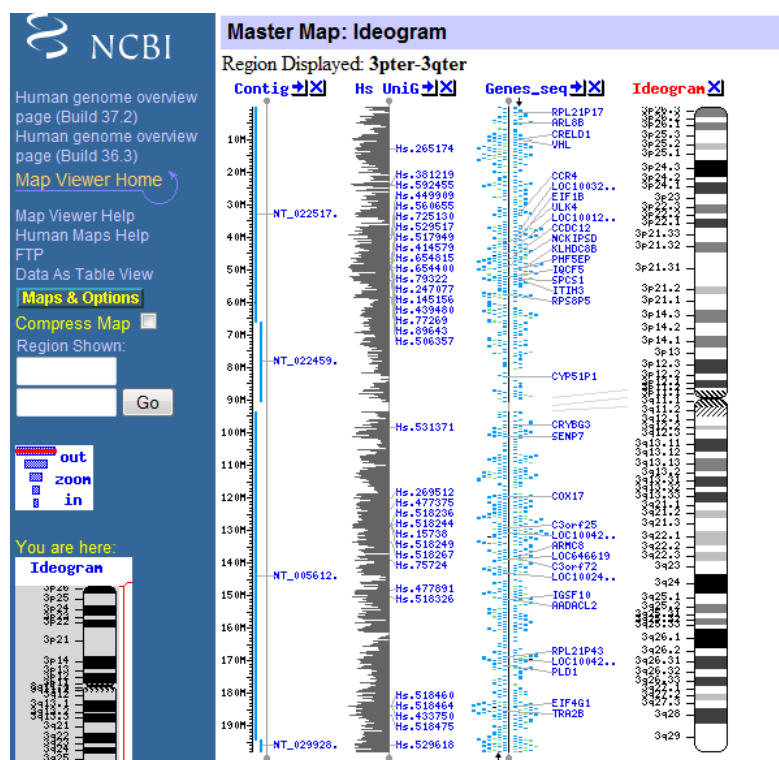


Figura 22. Página web del NCBI donde se realizó la búsqueda de los genes. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview/maps.cgi?taxid=9606&chr=3>)

Las regiones cromosómicas, el grado de metilación y algunos genes que por su actividad y su producto funcional fueron de interés para el presente trabajo, se muestran en la tabla VIII.

Tabla VIII. Regiones cromosómicas, grado de metilación y genes presentes.

CROMOSOMA	REGIÓN CROMOSOMICA	GRADO DE METILACIÓN	GENES
3	3P21.32	Hipometilado	MIR138-1, ZNF660
3	3P21.33	Hipometilado	SNRK, RPL18AP9,
5	5q32	Hipometilado	MIR3142, MIR146A, LOC100420993, CCNG1
18	18q21.1	Hipermetilado	MIR4319, LOXHD1, LOC100421737
18	18q21.2	Hipermetilado	LOC724101, SMAD4, MBD2, MAPK4

7. Discusión.

El tamaño de muestra programado inicialmente en este trabajo, se obtuvo mediante un método de muestreo en el periodo que abarca de agosto del 2007 a julio del 2010 en el Departamento de Oncológica del Hospital de Pediatría del CMN SXXI. Durante este periodo se recopilaron 9 biopsias de endimomas; entre estas 9 pacientes predominó el género femenino en una proporción 3:1, datos que no coinciden con la literatura reportada, donde la frecuencia de endimomas es mayor en los niños que en las niñas; para ambos géneros la edad de mayor incidencia se presenta en menores de 5 años⁴².

En cuanto a la localización de los endimomas la mayoría (45%) se presentó en la fosa posterior. Estos tumores tienen la capacidad de originarse en cualquier lugar del sistema ventricular o del canal espinal, aunque el sitio más común es en la fosa posterior (abarcando el cuarto ventrículo principalmente), seguido del nivel supratentorial, en una relación 2:1. Entre ambas localizaciones abarca el 90%. Los resultados presentados en este trabajo concuerdan con los de Dyer²³.

Cabe señalar que con las características preliminares descriptivas como son la proporción de pacientes por género, localización del tumor y otras de los 9 pacientes estudiados para CGH no fueron representativas acorde a la literatura consultada.

Por otro lado, la extracción y cuantificación del DNA mostró rendimientos lo bastante buenos para realizar la técnica del CGH; que requiere fragmentos de DNA superiores a 200 pb⁴³.

No hubo relación entre el año de recolección de la muestra con los valores de concentración y rendimientos de integridad que presentó el DNA de las muestras.

Después de marcar el DNA de las muestras y del DNA control con "*Nick Translation*", utilizando los DNA con mayor peso molecular (superior a 3000 pb) ya que la enzima de "*Nick Translation*" corta a estos en fragmentos, éstos deben medir entre 200 a 3000 pb para la hibridación posterior; de no estar en este rango, los fragmentos menores a 200 pb son inespecíficos y los mayores a 3000 pb no hibridan en los cromosomas ocasionando grumos⁴³. Los tamaños de los fragmentos del DNA control marcado con "*SpectrumRed*" y los de los DNA muestra marcados con "*Spectrum Green*" fueron similares en cuanto al tamaño. Al mismo tiempo cuando se mezclaron los dos DNA marcados con los dos fluoróforos, se depusieron en la misma concentración y en la misma cantidad equimolecular, para que pudieran competir de igual forma al momento de la hibridación en los cromosomas. La hibridación fue exitosa como se muestra en los resultados (figura 12).

En este estudio, la presencia de alteraciones cromosómicas fueron observadas en todos los cromosomas en los distintos pacientes exceptuando los cromosomas 7 y 11; el número de alteraciones en las copias cromosómicas detectadas por citogenética clásica y CGH en los ependimomas incluyen cromosomas 1, 6, 7, 9, 10, 13, 17, 19 y 22⁴⁷. Estos hallazgos se han confirmado por datos de genética molecular que han identificado pérdidas en 6q, 9p, 10, 11q, 13q, 17p y 19q. Los genes específicos para estas pérdidas y ganancias alélicas son desconocidos, en la mayoría de los casos⁴⁸.

Como se mencionó en los resultados los cromosomas que no presentaron pérdidas (delección) fueron 1, 2, 5, 9 y 11; mientras que en los cromosomas 7, 11, 13, 17, 19 y 20 no se encontraron ganancias (duplicaciones). Las regiones cromosómicas pericéntricas de los cromosomas 1, 9 y 16 presentaron

duplicaciones, esto se debe a la presencia de heterocromatina en estas regiones⁴⁹.

Además se presentaron gran número de alteraciones en las regiones teloméricas que representa el 58% de todas las alteraciones localizadas en el presente trabajo, mientras las encontradas en las regiones centroméricas y subcentroméricas constituyeron el 12%. El diseño del genoma humano, comprende elementos repetitivos que pueden estar dispersos o agrupados. Dentro de los primeros, se encuentran los repetidos de bajo número de copias (LCR por sus siglas en inglés) y los repetidos asociados a telómero (denominados TARs por sus siglas en inglés), entre otros. Los segundos comprenden a los elementos interespaciados largos (LINEs), y los interespaciados cortos (SINEs). Dentro de los LINEs se encuentran los elementos Alu, los cuales representan el 10% del genoma, constituyendo 1 millón de copias. Estos elementos, se localizan principalmente en secuencias con alta densidad génica, en unión de genes y pseudogenes y en secuencias con alto contenido de GC, en donde las sondas pueden hibridar en mayor cantidad al ser regiones inespecíficas^{50, 51, 52,53}.

Estos elementos favorecen los mecanismos más frecuentes en la generación de rearrreglos cromosómicos, procesos alterados durante la recombinación en la meiosis o bien por un mecanismo de reparación anómalo. Estos procesos incluyen a la recombinación homóloga no alélica (NAHR por sus siglas en inglés) y la unión de extremos no homólogos⁵⁴.

En el caso de deleciones que abarcan más de 1 Mb de material genómico, generalmente se generan a partir de NAHR entre repetidos de bajo número de copias (LCR), con homología mayor al 95%^{50, 51, 52, 53}. Las regiones subteloméricas, son ricas en repetidos y tienen una alta densidad génica, estos repetidos tienen una alta homología entre las regiones subteloméricas de diversos

cromosomas no homólogos, hasta el grado de compartir secuencias similares de hasta 100 kb⁵⁴.

Seis de las nueve muestras presentaron ganancias en gran parte del eje del cromosoma Y (Anexo I), sin embargo esto es normal ya que sobre este cromosoma se encuentra una gran región de heterocromatina⁴⁹. Otra de las razones por la que probablemente este fenómeno ocurre, son las regiones homologas entre los cromosomas X y Y. Cabe señalar nuevamente que seis de las nueve muestras utilizadas para el CGH fueron de niñas y las metafases ocupadas en la metodología fueron de varón. Así que el material sobrante de uno de los cromosomas X pudiera estar hibridando sobre el cromosoma Y⁴⁹.

El cromosoma 22 se ha relacionado con los ependimomas; la incidencia de un 30 a 50% de aberraciones involucra al cromosoma 22, incluyendo monosomía y deleciones de 22q²⁵, lo que concuerda perfectamente con los datos reportados en este estudio. Además se observó que los pacientes que presentaron pérdidas en la región 22q13.3 tenían un ependimoma de tipo anaplásico y se localizaba en la zona supratentorial. En esta región cromosómica se localiza el gen *RABL2B* miembro de la familia RAS de oncogenes.

Se encontraron deleciones en las regiones 6q27 y 13q34 y ganancias en la región 1q11-1q21.1 en tumores anaplásicos localizados en la parte supratentorial; los ependimomas clásicos y anaplásicos con ganancia de 1q tienden a ocurrir en la fosa posterior de niños y son más agresivos³⁸. Los resultados mostrados son similares a lo reportado por Korshunov²⁵ quien indica ganancias en 1q y pérdidas en los brazos cortos de los cromosomas 6 y 13, en tumores intracraneales detectadas también por CGH.

Sin embargo, Korshunov reconoció ganancias en el cromosoma 7 en tumores espinales, que nosotros no pudimos corroborar por no contar con tumores de este tipo.

Kramer *et al.*³⁶ encontraron en 23 casos de pacientes pediátricos con ependimomas intracraneales supratentoriales y de fosa posterior, una región del cromosoma 6q la cual puede estar involucrada en el desarrollo y/o progresión de los ependimomas en niños. No obstante nosotros encontramos sólo un paciente con esta región alterada (6q27).

La región con mayor incidencia en nuestro estudio fue la 14q32.3 con 4 repeticiones de las cuales tres se presentaron en tumores localizados en la fosa posterior y sólo uno se encontró en un tumor en la parte supratentorial, los cuatro tumores fueron de tipo anaplásico. En esta región se presenta el gen *ELK2* (*ELK2*, “member of ETS oncogen family pseudogene 1”) miembro de la familia de oncogenes ETS que probablemente pueda estar relacionado con el desarrollo de los ependimomas.

Otra región de interés en este trabajo fue ubicada en el brazo largo del cromosoma 1, la región 1q12 que se mostró en 3 pacientes, no obstante esta zona cromosómica no presenta ningún gen, pero esta región está relacionada con rearrreglos en cáncer humano principalmente la banda de heterocromatina ubicada en esta zona^{55, 56}.

Mientras tanto en el paciente cuyo resultado fue normal, no se puede descartar alguna alteración de menor cantidad de material cromosómico ya que la técnica de CGH tiene una capacidad de resolución limitada; los cambios que impliquen segmentos inferiores a 7-10 Mb no se detectan y segmentos de este tamaño pueden contener miles de genes⁵⁷.

En las regiones cromosómicas con alteraciones encontradas se localizan diversos genes, varios de ellos asociados al desarrollo particularmente en la diferenciación y regulación del ciclo celular; también abarca algunos factores de transcripción como dedos de zinc y figuran cuantiosos marcos de lectura abiertos que si bien, todavía no se sabe su funcionamiento no se puede descartar que pudieran actuar en el desarrollo o en el proceso de carcinogénesis celular.

En este trabajo se sugiere estudiar algunas regiones cromosómicas, así como algunos genes (tabla VII) que son buenos candidatos para el desarrollo de este tipo de tumores por localizarse en regiones reportadas por otros autores, o por repetirse en más de 2 pacientes en este estudio.

En lo que respecta al patrón de metilación global en el presente estudio se utilizaron dos técnicas acopladas CGH y AIMS; el grado de metilación es importante en la regulación de la expresión génica⁵⁷ y por lo tanto en el desarrollo neoplásico.

La técnica de AIMS es un protocolo que se ha desarrollado como una herramienta que permite obtener un patrón de metilación en el análisis de muestra de tumores⁵⁸. Esta metodología aunada al CGH permite observar regiones cromosómicas hipo e hipermetiladas sin embargo su resolución es limitada a megabases y no permite ver metilaciones puntuales en el DNA como pueden ser en promotores⁵⁹. Esto puede ser la causa de que se hayan encontrado pocas alteraciones en el grado de metilación en el presente trabajo.

Sin embargo estas limitantes se pueden resolver al acoplar la amplificación de sitios intermetilados a otras metodologías más resolutivas como CGH-microarrays.

Aunque por otro lado, la aplicación del CGH con los AIMS permite analizar los cambios de la metilación del DNA en el genoma completo detectando hipo e

hipermetilación de regiones subcromosómicas⁵⁹ y así buscar genes involucrados con el ciclo celular y el desarrollo tumoral, que se encuentren dentro de estas zonas cromosómicas; para finalmente presentarlos como posibles candidatos a futuros estudios.

En el presente trabajo se encontraron 5 regiones cromosómicas con cambios de metilación (3q21.32, 3q21.33, 5q34 hipometilada; 18q21.1 y 18q21.2 hipermetiladas). Dentro de estas regiones se buscaron genes que por sus productos pueden ser candidatos para futuros trabajos como son LOC100421737, CCNG1 y MBD2, entre algunos más.

Al margen de los datos obtenidos en el presente trabajo se considera permisible puntualizar y determinar ciertas particularidades relevantes y de alguna forma válidas, para una clasificación tumoral en un marco molecular de la posible actividad neoplásica en células ependimales, al explorar los cambios cromosómicos y patrón de metilación en toda la longitud del genoma y el entendimiento de los mecanismos que rompen la regulación y función normal de la célula. Sin embargo, tomando en cuenta el grado de resolución de las técnicas, para obtener los cambios o variantes reales en la estructura y función genómica y epigenómica, es necesario alternar el CGH y al CGH-AIMS con otros métodos moleculares de estudio analíticos que establezcan con mayor amplitud la interacción de dichas modificaciones, como puede ser los microarreglos, CESH, PCR tiempo real, FISH de algunos genes en específico, detección de SNP, etc; aclarando así, a nivel celular y molecular los mecanismos que dirigen y regulan la transformación oncogénica celular, al mismo tiempo generar un estudio detallado de esos cambios en el pool genético, permitiendo inclusive en función de los datos obtenidos las condiciones idóneas para un diagnóstico.

8. Conclusiones.

Aunque se alcanzaron adecuadamente los objetivos, el número empleado de muestras para el análisis con la técnica de CGH no es representativo del total de la población que presenta este tipo de tumor en México. Sin embargo, también es cierto que constituye un número importante para el estudio molecular prospectivo de los ependimomas y observar de manera global las asociaciones que existen entre la clasificación de este tipo de neoplasia (clasificación histo-patológica) y las regiones que resultaron alteradas.

La mayoría de las regiones que presentaron alteraciones cromosómicas estuvieron asociadas con una gran diversidad de genes, sin embargo se tomaron en cuenta los asociados con la metilación de las regiones CpG (MBD2), el oncogen LOC100421737, con el desarrollo del ciclo celular, regulación postranscripcional, traducción de proteína y desarrollo embrionario; por lo cual son fuertes candidatos para ser estudiados en trabajos posteriores.

En ninguna de las muestras analizadas no hubo coincidencia entre las regiones cromosómicas con pérdidas y ganancias y las que tuvieron cambios en el patrón de metilación.

Los resultados mostrados en esta tesis empleando una población Mexicana, concuerdan en lo general con los estudios citados.

Por último, hasta el momento no se ha encontrado ningún gen dentro de las regiones afectadas asociado con este tipo de carcinoma, lo que sugiere que se necesitan mucho más trabajos referentes a esta enfermedad para entender por completo su mecanismo de desarrollo, pero principalmente para realizar un diagnóstico oportuno.

9. Referencias.

- 1.-Worn J, Guldborg P. (2002) DNA metylation: an epigenetic pathway to cáncer and a promising target for anticancer therapy. *Journal of oral pathology*.31: 443-449.
2. - Wajed S A, Laird P W. and DeMeester T R. (2001) DNA methylation: an alternative pathway to cancer. *Annals of surgery*; 234:10-20.
- 3.-Hanahan D, Weinberg R A. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell*; 100:57-70.
4. - Esteller M. (2007) Cancer epigenomic: DNA methylomes and histone-modification maps. *Nature publishing group*, 8:286-287.
- 5.- Kafri T, Ariel M, Branders M, Shemer R. *et al.* (1992) Developmental pattern of genespecific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*; 6: 705-714.
- 6.- Bird A. (2002) DNA methylation patterns ans epigenetic memory. *Genes Dev*; 16:6-21.
- 7.- Paulsen M, Ferguson-smith A C. (2001) DNA methylation in genomic imprinting, development, and disease. *J Pathol*; 195:97-110.
- 8,. Birgisdottir V, Srefansson O A. *et al.* (2006) Epigenetic silencing and deletion of the BCRA1 gene in sporadic breast cancer. *Breast Cancer Research*; 8: 1-10.
- 9.- Herman J G, Baylin S B. (2003) Gene sinlencing in cancer association with promoter hypermethylation. *N Engl. J Med*; 349:2042-2054.

- 10.- Bea Y K, Brown A, Garret E, Boruman D, et al. (2004) Hypermetylation in hystologically distinct classes on breast cancer. *Cli Cancer Res*; 10:5998-6005.
- 11.- Ehrlinch M. (2000) DNA hypermetilation and cancer. Ehrlinch M, ed DNA alterations in Cancer Genetic and Epigenetic Changes Natick: Bio Techniques Books, Eaton Publishing: 273-291.
- 12.- Szyf M. (2003) DNA methylation and Cancer Theraphy. Ehrlinch M and Jiang G ed DNA Hypo-vs-Hypermethylation in Cancer. Academic/Plenum Publisher USA: 31-41.
- 13.- O' Doherty A M, Church S W, Rusell S E H, Nelson J. and Hickey I. (2002) Methylation status of estrogen receptor- a gene promoter sequences in human ovarian epithelial cel lines. *Br J Cancer*; 86: 282-284.
- 14.- Allinen A. (2002) DNA damage response genes and chromosome 11q21-q24 candidate tumor suppressor genes in breast cancer. Department of Clinical Genetic, University of Oulu, P. O. Box 5000, FIN
- 15.- Rivera L R. (2003) Oncología pediátrica: conceptos básicos y clínicos. Ed. Intersistemas. Mex: 1-12, 15-32, 103-132.
- 16.- Weinberg A R. (1996) Así se produce el cáncer. *Inv. and science*: 9(4) 10-17.
- 17.-Darnell J, Lodish H, Baltimor D. (2003) *Molecular cell Biology*.4^a ed. Ed Oxford Scientific American Books: USA. 1027-1072.

- 18.- Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. (2000) Morbilidad, regionalización 1993-1996 y mortalidad tendencias 1985-1998: México: Secretaría de Salud, Dirección General de Epidemiología.
- 19.-Adullaev F I, Rivera L R, Roitenbeurd B V, Espinosa J. (2001) Mortality pattern in childhood cancer in Mexico. Arch Med Res: 31:526.
- 20.-Eiser C. Children with Cancer: The Quality of life. Ed. LEA. Inglant. Lon. 122-126.
- 21.- Sierrasesúmaga L, Calvo F, Villa E I, Cañadell J. (1993) Oncología Pediátrica Ed. Interamericana. Esp. Mad. 406-407.
- 22.- Salas M M. (1983) Las neoplasias en los niños." Ediciones Medicas del Hospital Infantil de México: 240-251.
- 23.-Dyer S, Prebble E, Davison V. (2002) Genomic imbalances in pediatric intracranial ependymomas define clinically relevant groups. Am J Pathol: 161(6): 2133-2141.
- 24.- Muñoz H A, Del Moral R E, Uberos F J. (2001) Oncología Infantil. Ed Formación Alcala. Esp. Mad. 2001: 271-290.
- 25.-Korshunov A, Neben K, Wrobel G. (2003) Gene expression patterns in ependymomas correlate with tumor location, grade, and patient age. Am J Pathol: 163: 1721-27.
- 26.- Gilbertson R J, Taylor M D, Poppleton H, Fuller C, Su X *et al.*(2005) Distinct origins and subtypes of ependymoma revealed by genomic profiling of human and mouse tissues. Twentieth Schweisguth prize, Vancouver: Société

27.- Yuichi H, Kenneth A, Andrew B. (2001) Chromosomal abnormalities subdivide ependymal tumors into clinically relevant groups. *Am J Pathol*: 158: 1137- 1143.

28.- Gray J, Collins C (2000). Genome changes and gene expression in human solid tumors." *Carcinogenesis*: 21: 443-452.

29.- Kallioniemi A, Kallioniemi O, Sudar D, Rutovitz D, Gray J, Waldman F, Pinkel D. (1992) Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumor. *Science*: 258: 818-821.

30.- Grill J, Avet-Loiseau H, Lellouch-Tubiana. (2002) Comparative genomic hybridization detects specific cytogenetic abnormalities in pediatric ependymomas and choroid plexus papillomas. *Cancer Genet Cytogenet*: 136: 121-125.

31.- Curtis C D, Gorggins M. (2005) DNA methylation analysis in human cancer. *Methods Mol Med*; 103:123-136.

32.- Costello J F, Smiraglia D J, Plass C. (2002) Restriction landmark genome scanning *Methods*; 27:144-149.

33.- Shames D S, Minna J D, Gazdar A F. (2007) Methods for detecting DNA methylation in the tumors: From bench to bedside. *Cancer letters*; 251:187-198.

34.- Paz M F, Wei S, Cigudosa J C, Rodríguez-Perales S, Peinado M A, Huang T.H. and Esteller M. (2003) Genetic unmasking of epigenetically silenced tumor suppressor genes in colo cancer cells deficient in DNA methyltransferases. *Hum Mol Genet*; 12: 2209-2219.

35.- Fraga M F, Ballestar E, Paz M F, Ropero S, Setien F, Ballestar M L, Heine-Suñer D, Cigudosa J C, Urioste M, Benitez J, Boix-Chornet M, Sanchez-Aguilera A, Ling C, Carlsson E, Poulsen P, Vaag A, Stephan Z, Spector T D, Wu Y Z, Plass C, Esteller M. (2005) Epigenetical differences arise during the lifetime of monozygotic twins. *Proc Natl Acad Sci*; 102: 1604-1609

36.- Kramer D L, Wentz E L, Parmiter A H, Biegel J A. (1997) Molecular cytogenetic studies of pediatric ependymomas: #666. *J Pediatr Hematol Oncol*: 18: 460.

37.- Debiec- Rychter M, Biernat W, Zakrzewski K. (2003) Loss of chromosome 22 and proliferative potential in ependymomas. *Folia Neuropathol*: 41: 191-5.

38.- Carter M, Nicholson J, Ross F, Crolla J. (2002) Genetic abnormalities detected in ependymomas by comparative genomic hybridisation. *British J of Cancer*: 86: 929- 939.

39.- Zamecnik J, Snuderl M, Eckschlager T. (2003) "Pediatric intracranial ependymomas: prognostic relevance of histological, immunohistochemical, and flow cytometric factors". *Mod Pthol*: 16: 980-91.

40.- Gilhuis HJ, van der Laak J, Wesseling P. (2004) Inverse correlation between genetic aberrations and malignancy grade in ependymal tumors: a paradox. *J Neurooncol*: 66(1-2): 111-6.

41.- Frigola J, Ribas M, Risques R A, Peinado M A. (2002) Methylome profiling of cancer cells by amplification of intermethylated sites (AIMS). *Nucleic Acids Res*; 30: 28.

- 42.- Coulon R A, Hill K. (1977) "Intracranial ependimomas in childrens". Childs Brain: 3: 154-68.
- 43.-Kallioniemi A, Kallioniemi O-P, Citro G. (1995) Identification of gain and losses of DNA sequences in primary bladder cancer by comparative genomic hybridization. Genes Chrom Cancer: 12:213-219.
- 44.-Kingsbury A E, Foster O J, Nisbet A P, Cairns N, Bray L, Eve D J, Lees A J, Marsden C D. (1995) Tissue pH as an indicator of mRNA preservation in human post-mortem brain. Brain Res Mol Brain Res: 28:311–318
- 45.- Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. (1998)TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement critical evaluation and improvement. J Histochem Cytochem: 46:327–334.
- 46.- Lamszus K, Lachenmayer L, Heinemann U, Kluwe L. (2001)Molecular genetic alterations on chromosomes 11 and 22 in ependymomas. Int J Cancer: 91: 803-8.
- 47.- Weirich G, Hornauer M A, Bruning T, Hofler H and Brauch H. (1997) Fixed archival tissue. Purify DNA and primers for good PCR yield! Mol Biotechnol: 8: 299-301.
- 48.-Kallioniemi O-P, Kallioniemi A, Piper J. (1994) Optimizing comparative genomic hybridization for analysis of DNA sce copy number changes in solid tumors. Genes Chrom Cancer: 10: 231-243.
- 49.-Sharp J. (2006) Discovery of previously unidentified genomic disorders from the duplication architecture of the human genome. Nat genet: 38: 1038-1042.

50.- Inoue K. (2002) Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annu Rev Genomic Human Genet*: 43: 199-242.

51.-Shaw C. (2004) Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorder: the genomic basis of disease. *Hum Mol Genet*: 13: 57-64.

52. - Shaffer L. (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in Humans. *Ann Rev*: 34: 297-329.

53.- Palacios R M, Arenas A D. (2006) Detección de re-arreglos crípticos e pacientes con retraso mental y del desarrollo mediante pruebas de citogenética molecular". Tesis de especialidad de Genética Médica.

54.- Surralles J, Darroudi F, Natarajan A T. (1997) Low level of DNA repairs in human Chromosome 1 heterochromatin. *Gene Chromosomes Cancer*: 20: 173-184.

55.-The castogenic response of the 1q12 heterochromatic region to DNA cross-linking agents is independent of the Fanconi anaemia pathway. *Carcinogenesis*: 23: 1267-1271.

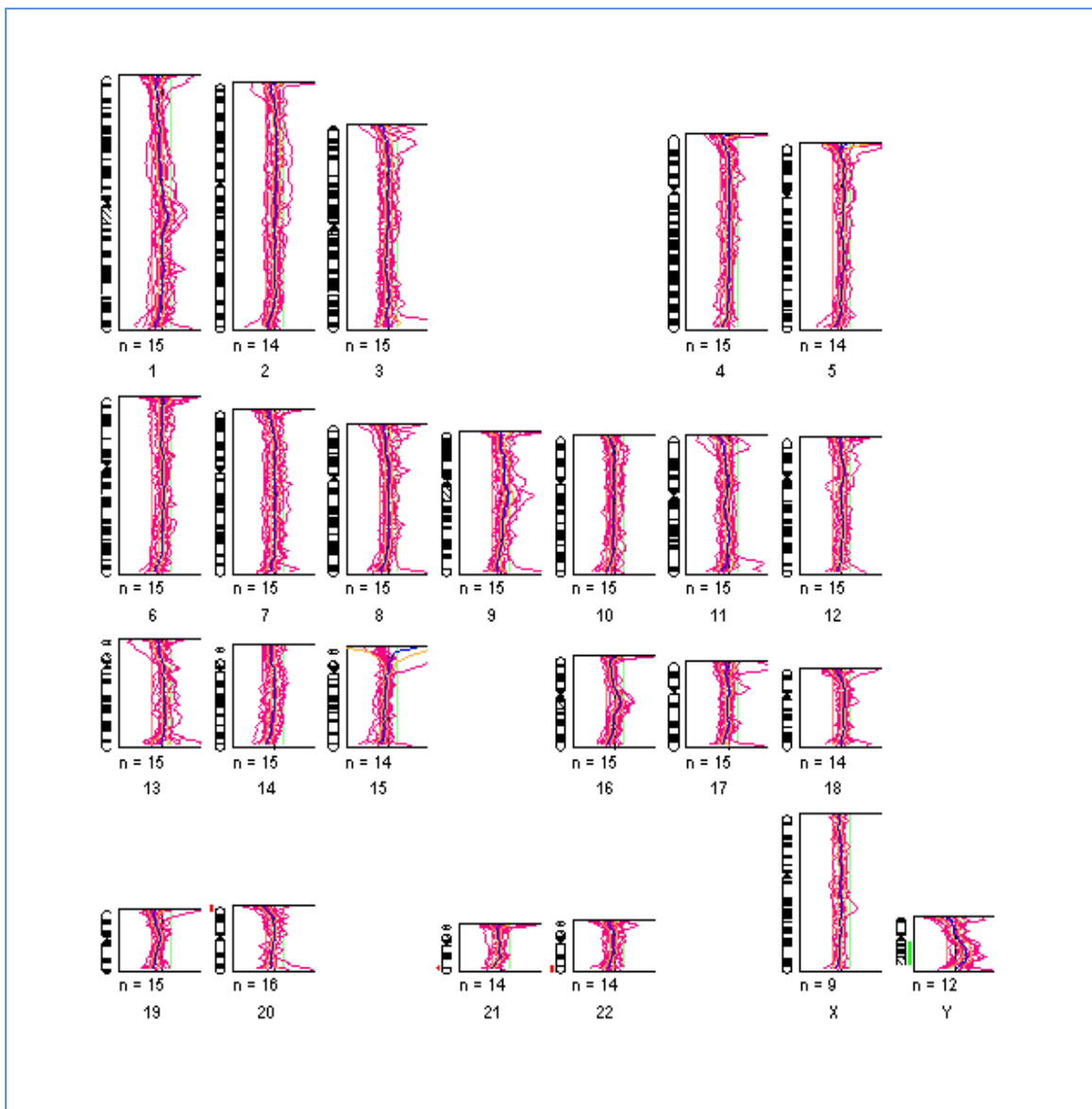
56. - Cigudosa J C. (2004) The microarray revolution in biomedical research: types of platforms, uses and perspectives in oncology. *An. Sist. Sanlt. Navar*: 27: 11-20.

57. - Lair P W. (2003) The power and he promise of DNA methylation markers. *Nat Rev Cancer*: 3: 253-266.

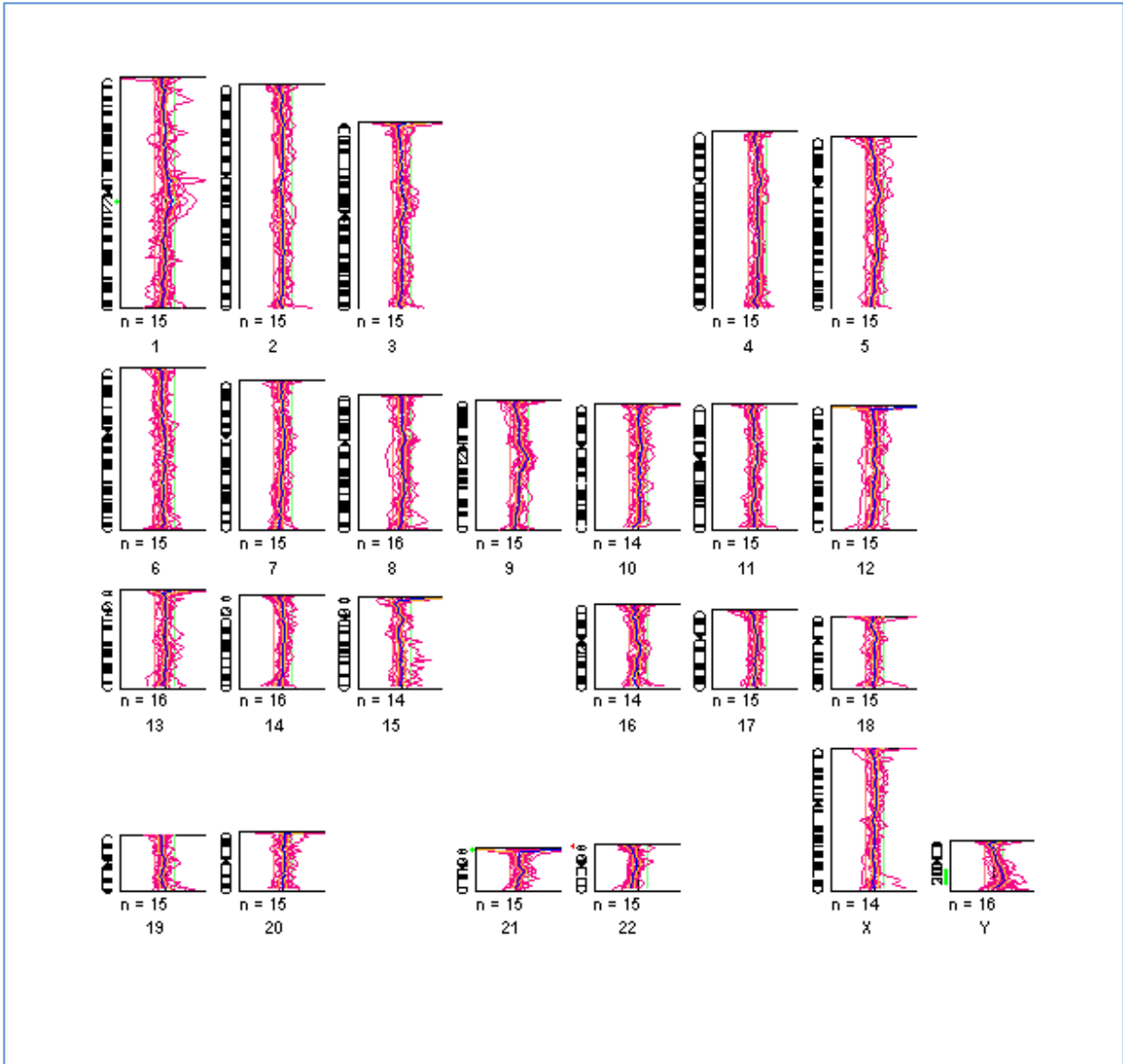
58. - Sadikovic B, Haines T R, Butcher D T, Rodenhiser D I. (2004) Chemically induced DNA hypometilation in breast carcinoma cell dedcted by the amplification of intermetilated sites. *Breast Cancer Research*: 6: 329-336.

59.- Wallker M J, Rapley R.(2008) Molecular Biomethods. InWang P-H *et al.* Comparative Genomic Hibridation in clinical and medical research. Human Press Ed: 213-225.

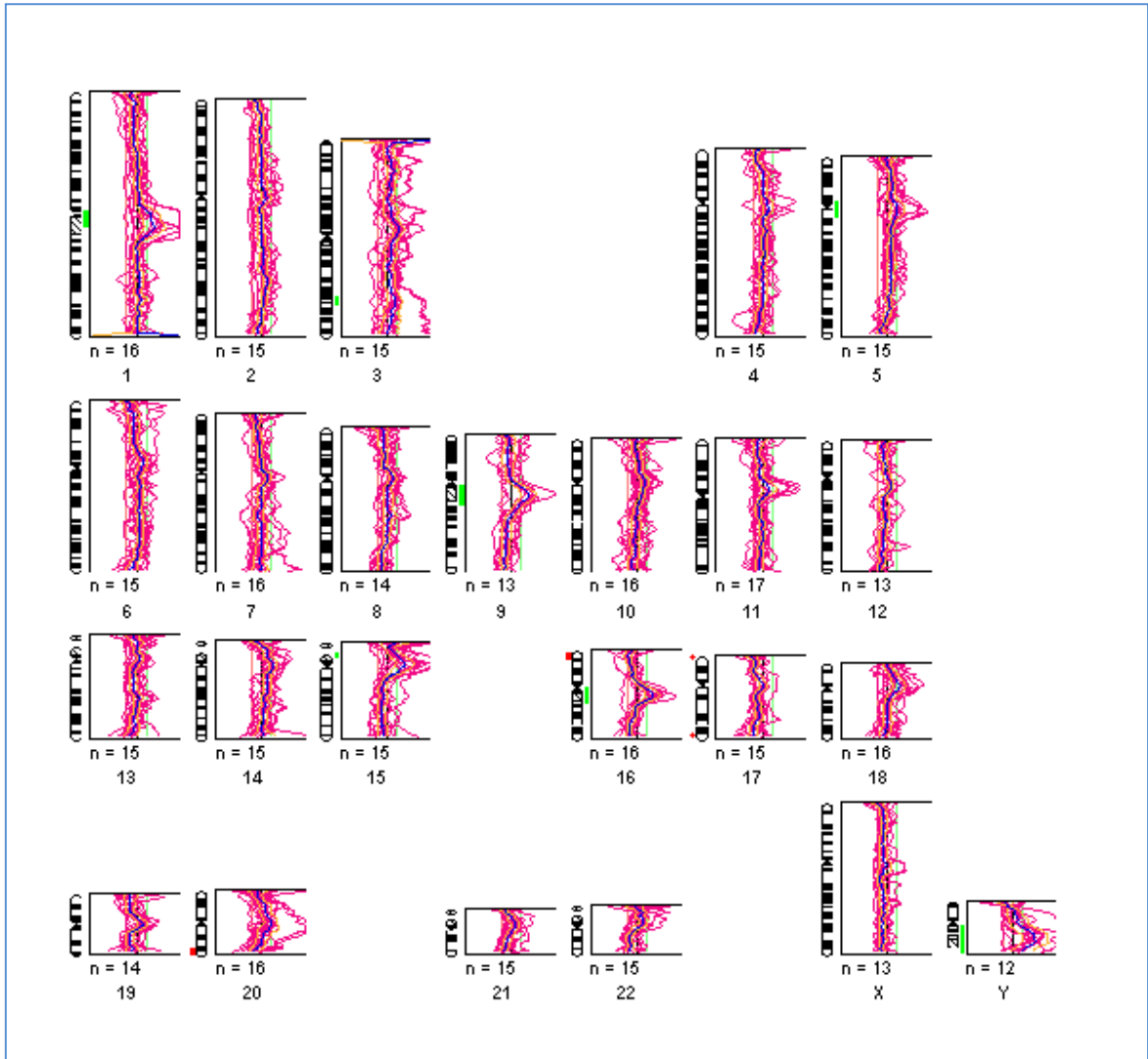
Anexo I. CGH convencional.



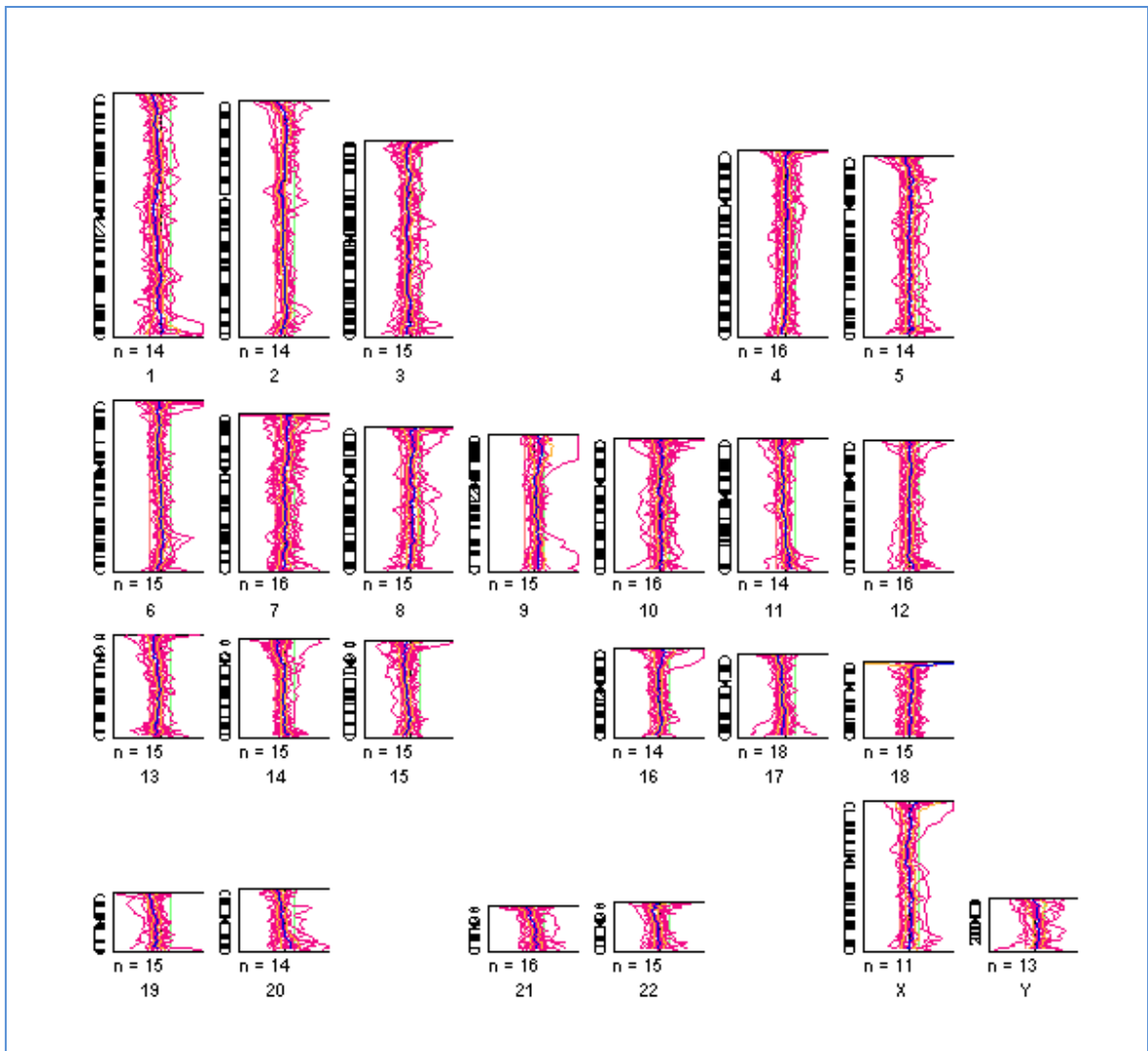
Cariograma del paciente ACV. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “software *Quips Genetic Imaging*”.



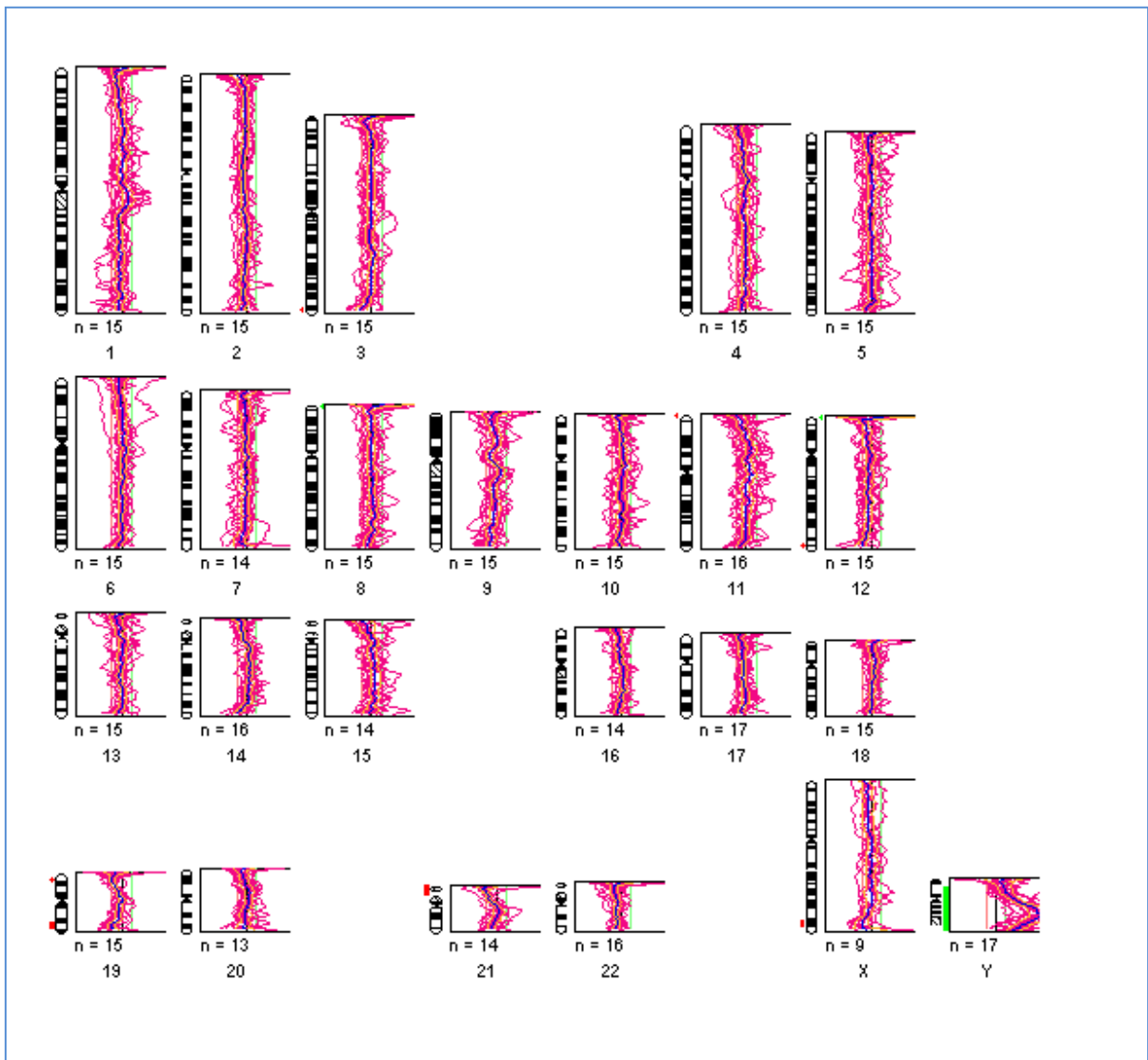
Cariograma del paciente ERR. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “software *Quips Genetic Imaging*”.



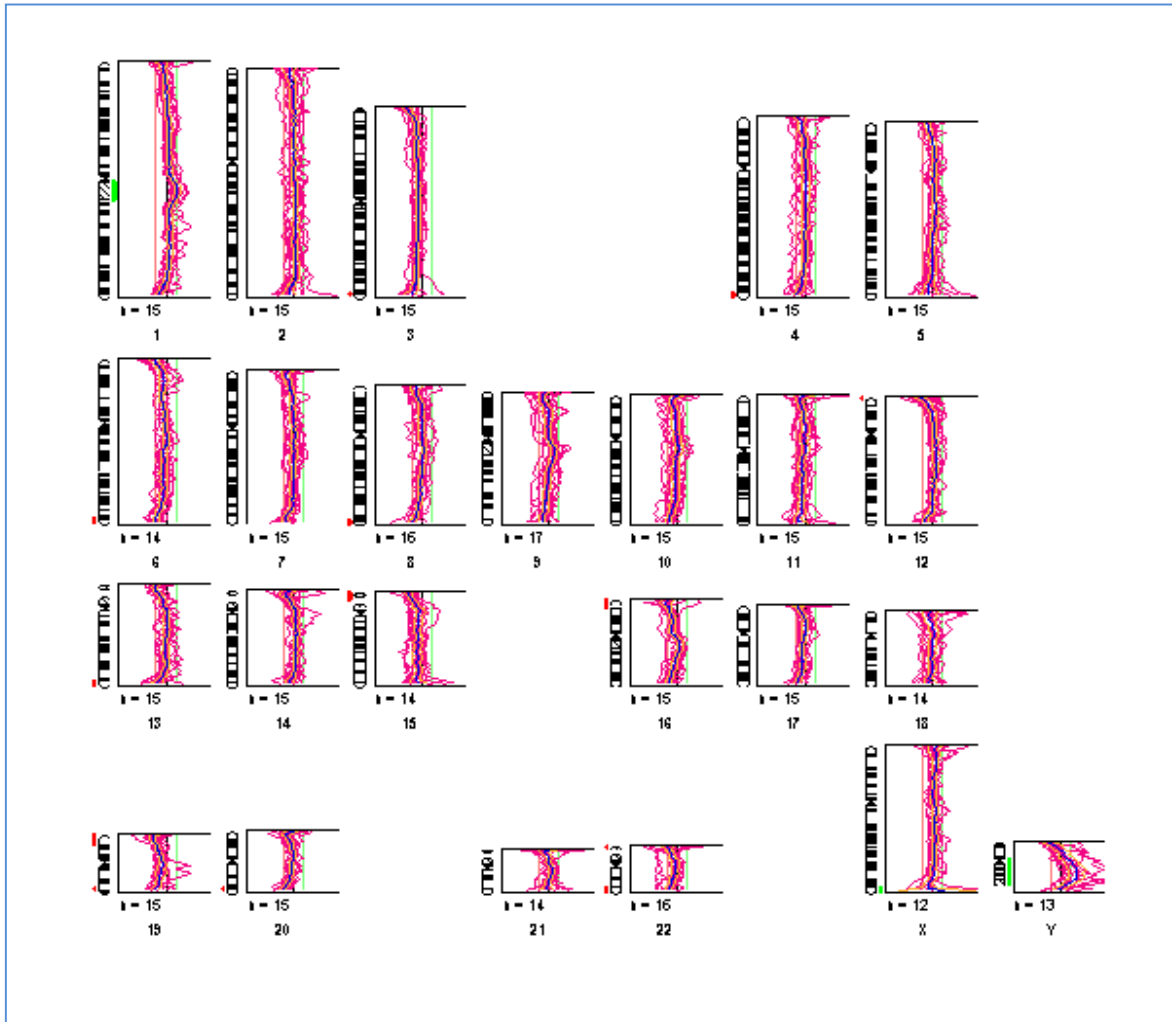
Cariograma del paciente GCD. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “*software Quips Genetic Imaging*”.



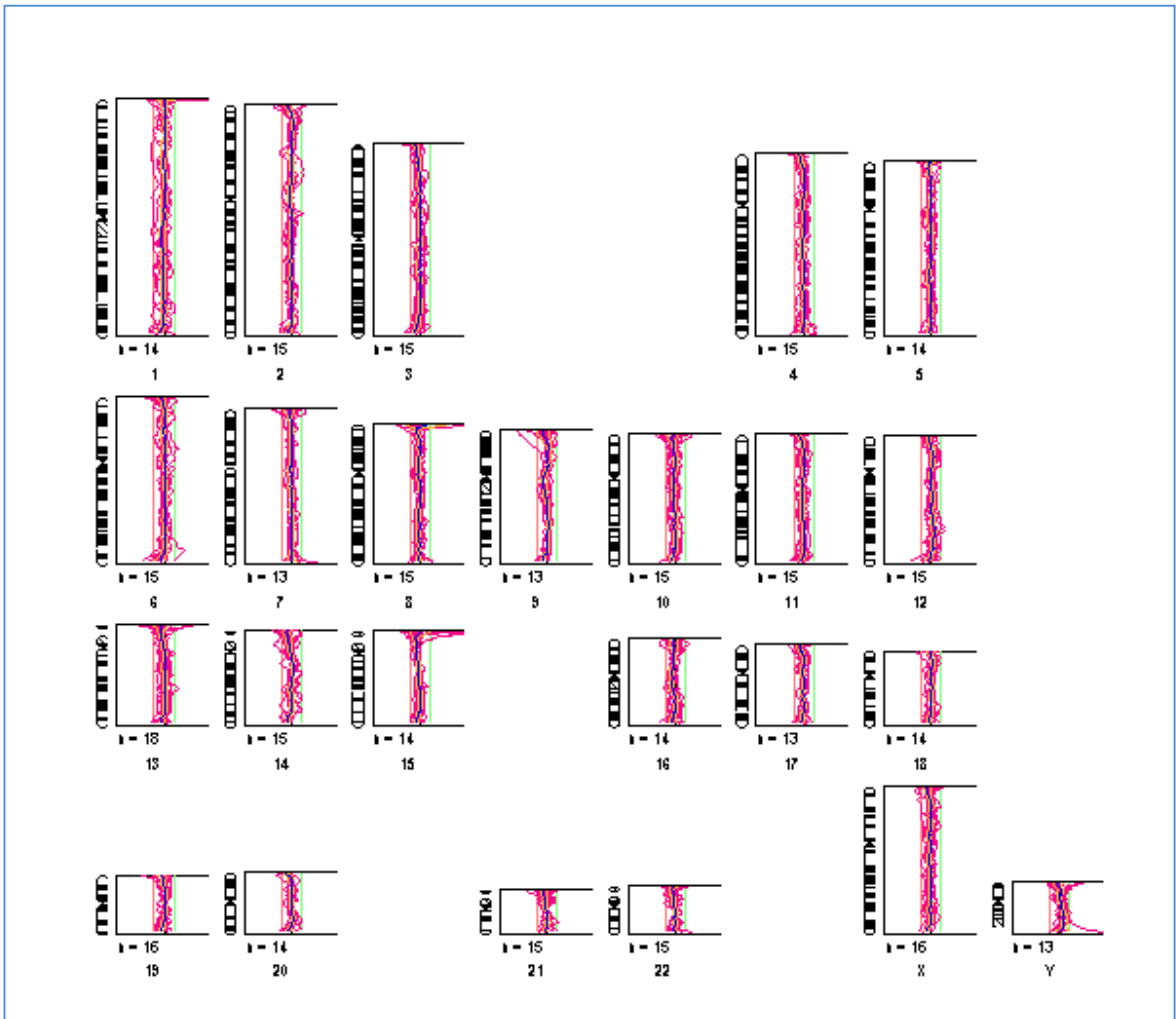
Cariograma del paciente CSD. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “software *Quips Genetic Imaging*”.



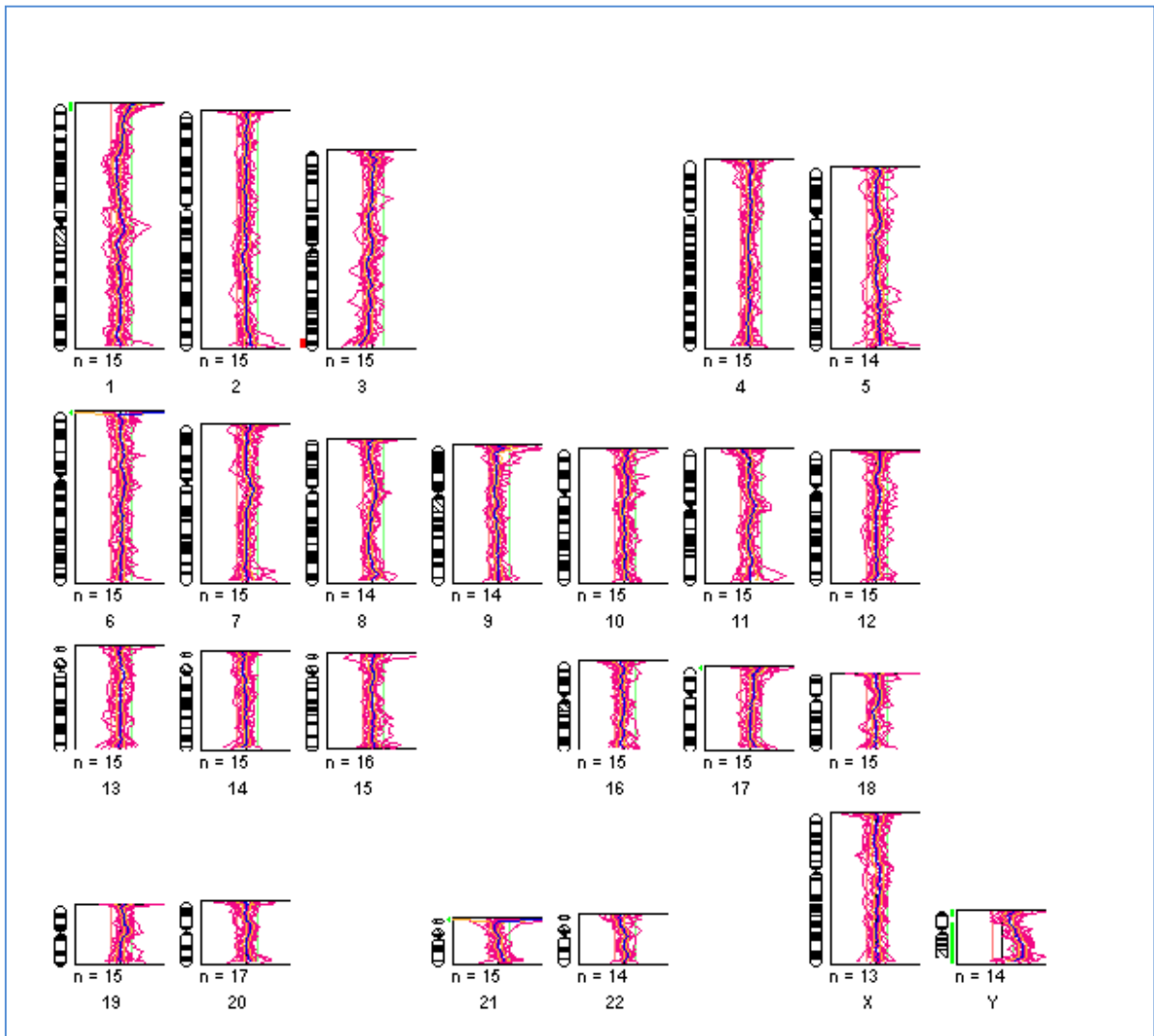
Cariograma del paciente GSC. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “*software Quips Genetic Imaging*”.



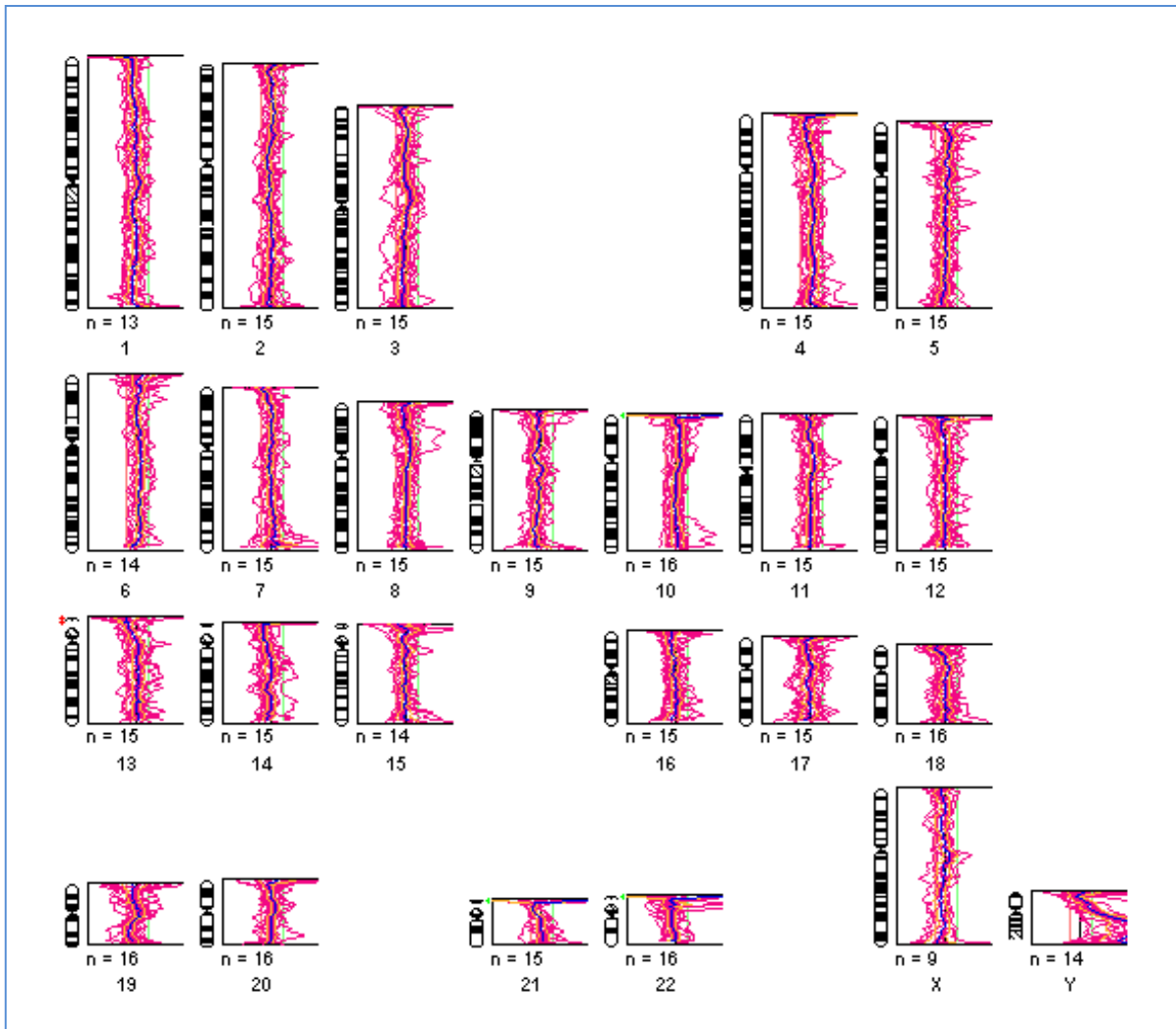
Cariograma del paciente GHD. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “software Quips Genetic Imaging”.



Cariograma del paciente CHJ. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “software Quips Genetic Imaging”.

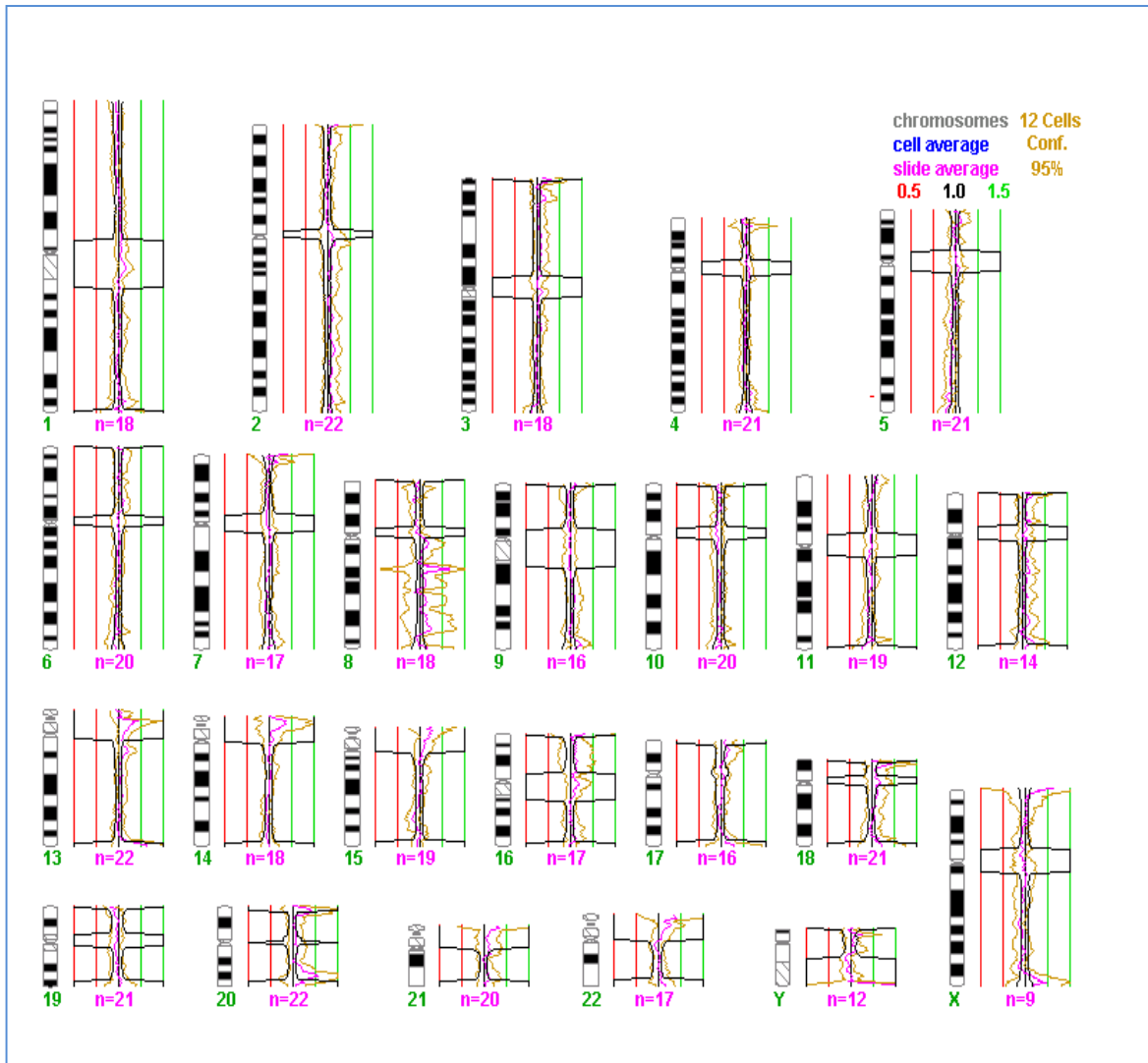


Cariograma del paciente MRS. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “*software Quips Genetic Imaging*”.



Cariograma del paciente VCP. Resultados obtenidos al hacer el análisis mediante el “software Quips Genetic Imaging”.

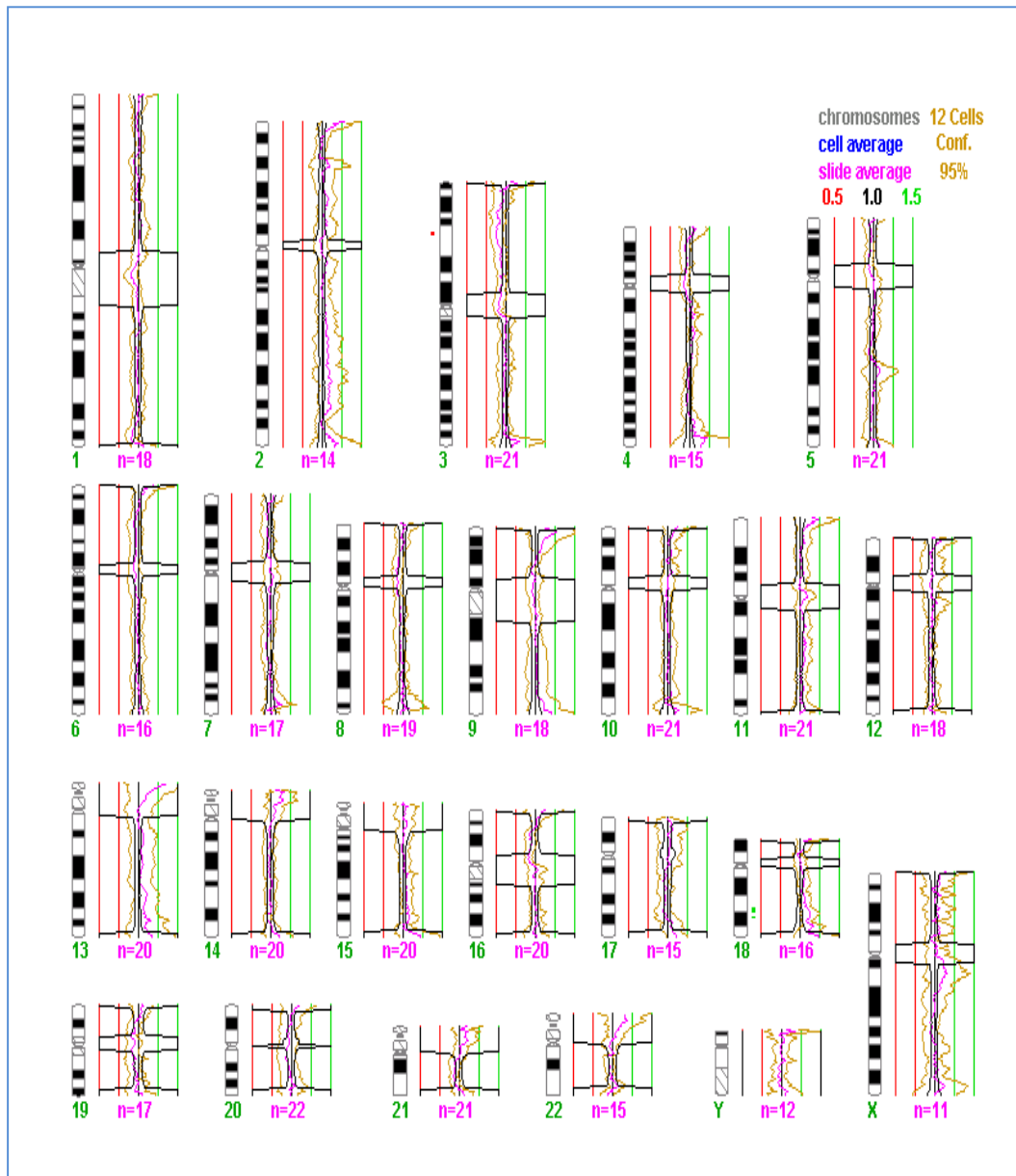
Anexo II.
CGH-AIMS.



Cariograma del patrón de metilación del paciente CSD. Se observa una región hipometilada en el cromosoma cinco.



Cariograma del patró global de metilació del pacient CHJ.



Cariograma del patrón de metilación del paciente VCP. Se observa una región hipometilada en el cromosoma tres y dos regiones hipermetiladas en el cromosoma 18.