



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR DE
GLÍA (GFAP) DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
DISTINTOS TIPOS DE TUMORES CEREBRALES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

TAYDE GABRIELA SERRANO CANO

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“CUANTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA ÁCIDA FIBRILAR DE
GLÍA (GFAP) DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
DISTINTOS TIPOS DE TUMORES CEREBRALES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

TAYDE GABRIELA SERRANO CANO

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODALES

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES
DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA
SINODAL

Dra. MINERVA RAMOS GÓMEZ
SINODAL

Dra. KARINA ALETHYA ACEVEDO WHITEHOUSE
SINODAL

Agradecimientos especiales al Hospital General de México, en particular al Dr. Aguado del servicio de Neurocirugía. Al laboratorio de bioquímica de hormonas del Instituto de Neurobiología de la UNAM Campus Juriquilla, en especial a la Dra. Maricela Luna Muñoz y la M. en C. Martha Carranza Salas. A la Universidad Autónoma de Querétaro y al FOFI-UAQ-2014.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Talina por permitirme ser parte de un proyecto súper interesante, por recordarme lo divertido que llega a ser la investigación en un laboratorio, por siempre brindarme su tiempo, apoyo y conocimiento para lograr terminar esta tesis.

A mis sinodales, Dra. Laura Berumen, Dra. Minerva Ramos y Dra. Karina Acevedo por aceptar ser parte de mi comité y darme su tiempo a lo largo del proceso.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Paulina Malagón, Adrián Chávez y Edgar Rodríguez, por hacer las horas eternas de trabajo divertidas, por enseñarme cada día cosas nuevas (la mayoría nada útiles para la vida), por el apoyo en los momentos de debilidad escribiendo esta tesis, por los momentos fuera del laboratorio y las largas conversaciones en What's.

A mis amigas Rachel Ocaña, Valeria Caltzontzin, Paulina Malagón, Rubí Núñez y Fernanda Córdoba porque hicieron cada día de la carrera entretenido e increíble, por presionarme para hacer mi mayor esfuerzo, por los viajes, las salidas, por siempre estar ahí.

A mi hermano, Paco Serrano por siempre estar presente y hacerme reír cuando más lo necesitaba, por entenderme y preocuparse por su hermana mayor.

A mis papás, Laura Cano y Francisco Serrano, por llevar 22 años aguantándome casi sin queja alguna, por ser mi pilar, sin su apoyo constante no estaría por convertirme en una Ingeniero en Biotecnología, por haberme dado su confianza de que lo lograría y sobre todo por sus sacrificios constantes que me permitieron llegar a este momento.

“Cada día sabemos más y entendemos menos” Albert Einstein.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Sistema nervioso	1
1.2 Tumores del sistema nervioso	3
1.3 Glioblastoma	8
1.4 Diagnóstico de tumores cerebrales	8
1.5 Biomarcadores en gliomas	12
1.6 GFAP	14
2. HIPÓTESIS	18
3. OBJETIVOS	19
3.1 General	19
3.2 Específicos	19
4. METODOLOGÍA	20
4.1 Muestra poblacional	20
4.2 Recolección de la muestra	22
4.3 Extracción de proteínas totales	22
4.4 Cuantificación de proteínas totales	22
4.5 Electroforesis de proteínas	23
4.6 ELISA	24
4.7 Electroforesis bidimensional	25
5. RESULTADOS	27
5.1 Cuantificación de proteínas totales en suero	27
5.2 Electroforesis de proteínas	28
5.3 Cuantificación de GFAP por ELISA	30

5.4 Análisis del tejido tumoral	32
5.5 Electroforesis bidimensional	33
6. DISCUSIÓN	35
7. CONCLUSIONES	40
8. REFERENCIAS	41
ANEXOS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Clasificación y funciones de las células gliales en el SNC	2
2	Datos clínicos de los astrocitomas	8
3	Tinciones histológicas	11
4	Isoformas de la GFAP humana	15
5	Diagnóstico de los participantes	21
6	Curva estándar para cuantificación proteica	23
7	Composición de geles para SDS-PAGE	23
8	Programa para isoelectroenfoque	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Clasificación estructural de las neuronas	1
2	Principales características fisiológicas de una célula tumoral	3
3	Histología del oligodendroglioma	6
4	Histología de los astrocitomas	7
5	Resonancia magnética de GBM	10
6	Marcadores moleculares en diagnóstico de gliomas	12
7	Estructura tridimensional de GFAP	14
8	Isoformas por corte y empalme de la GFAP humana	16
9	Funciones atribuidas a GFAP	17
10	Curva estándar de BSA	27
11	Concentración de proteínas totales (PT) en suero	28
12	Electroforesis de proteínas de suero	29
13	Densitometría de geles de proteína	30
14	Curva estándar representativa para GFAP del ELISA	31
15	Cuantificación de GFAP sérico determinado por ELISA	32
16	Electroforesis de proteínas del extracto proteico tumoral	33
17	Electroforesis bidimensional del extracto proteico tumoral del paciente diagnosticado con AM	34

RESUMEN

El cáncer es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como la principal causa de mortalidad a nivel mundial. De los más de 200 tipos de cáncer, el 3% se asocia al sistema nervioso. De acuerdo a la OMS, los tumores se clasifican en un sistema de graduación del I al IV basados en su tipo celular, malignidad y pronosis, dónde el grado I presenta una mejor expectativa de vida y grado IV la peor. Actualmente el diagnóstico de los tumores cerebrales se realiza por análisis de imagenología, histopatología e historia clínica, sin embargo, en la búsqueda de nuevas herramientas diagnósticas y pronósticas, los biomarcadores séricos son una alternativa al diagnóstico tradicional presentando ventajas como una mínima invasividad en la toma de muestra, la posibilidad de un diagnóstico temprano y el seguimiento del tratamiento. GFAP es una proteína del citoesqueleto de astrocitos maduros con potencial de biomarcador, cuya presencia en suero es condicionante a estados patológicos con necrosis astrocítica, siendo detectable a causa de una desestabilización de la barrera hematoencefálica derivando en la pérdida de su integridad. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar el potencial de GFAP como biomarcador sérico diferencial de astrocitomas utilizando como herramienta el enzimoimmunoensayo de adsorción (ELISA). Los resultados obtenidos muestran que, en pacientes del Hospital General de México diagnosticados con distintas graduaciones de astrocitomas, GFAP es un biomarcador diferencial específico del Grado IV dado que no es detectable en suero en astrocitomas de menor graduación.

1. ANTECEDENTES

1.1 Sistema nervioso

El sistema nervioso (SN) se divide en sistema nervioso central (SNC) y sistema nervioso periférico (SNP). El SNC incluye al cerebro y la médula espinal mientras que el SNP está formado por nervios, ganglios sensoriales y autonómicos. Tanto el SNC como el SNP están compuestos prioritariamente por dos grupos de células: las neuronas y la glía. Las neuronas tienen la función de recibir y enviar señales a otras neuronas creando la compleja red neuronal. Este tipo celular está compuesto por un cuerpo también llamado soma o pericarión, el cuál es el centro metabólico y el lugar en el que se encuentra la información genética; las dendritas, encargadas de recibir información; y el axón, que transmite las señales recibidas por las dendritas a través de potenciales de acción (Figura 1a) (Waxman, 2010). Las neuronas, de acuerdo a su morfología, pueden ser multipolares, bipolares o unipolares (Figura 1b). Las multipolares, presentes en mayor abundancia dentro del SN, son aquellas que tienen un gran número de dendritas y un solo axón. Las bipolares tienen una sola dendrita y un solo axón. Las unipolares tienen un solo axón que se divide en central y periférico (Hilton y Shivane, 2015).

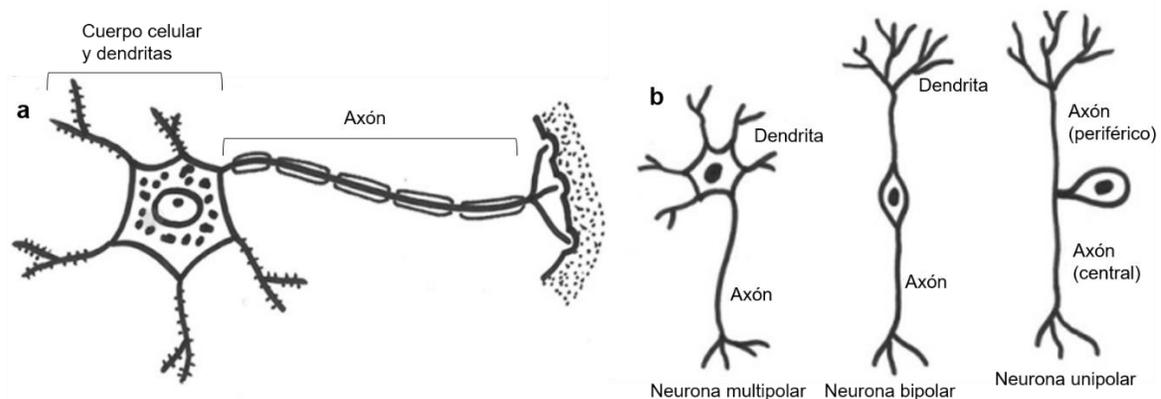


Figura 1. Clasificación estructural de las neuronas. (a) Componentes de la neurona
(b) Tipos de neurona (Hilton y Shivane, 2015).

Las células gliales, con una proporción 10 a 1 con respecto a las neuronas, tienen funciones como la formación de mielina, el mantenimiento de los niveles de K^+

extracelular, la recaptura de los neurotransmisores en la actividad sináptica y sirven como guía para el correcto acomodo de las neuronas durante el desarrollo. Éstas se clasifican en microglía y macroglía (Cuadro 1) con respecto a su origen, mesodérmico y ectodérmico, respectivamente (Waxman, 2010).

Cuadro 1. Clasificación y funciones de las células gliales en el SNC (Waxman, 2010).

Células gliales	Tipo celular	Función
Macroglía	Oligodendrocitos	Formación de mielina.
	Astrocitos	Regulación de ambiente iónico. Recaptura de neurotransmisores. Guía de axones. Formación de la BHE.
	Ependimarias	Revestimiento del conducto ependimario.
Microglía		Vigilancia inmunológica.

La microglía, con una función similar a la de los macrófagos, se encarga de vigilar, detectar y destruir antígenos cumpliendo la función de células efectoras clave en la respuesta inmune dentro del SNC (Hambardzmyan y col., 2016). Por otro lado, la macroglía engloba a las células ependimarias, los oligodendrocitos y los astrocitos (Waxman, 2010). Las células ependimarias revisten el conducto ependimario que contienen al líquido cefalorraquídeo (LCR). Los oligodendrocitos, predominantes en la sustancia blanca, forman vainas compactas de mielina alrededor de los axones que actúa como aislante. Los astrocitos proporcionan apoyo estructural al tejido nervioso, regulan el ambiente iónico, actúan como guías de la migración neuronal y contribuyen en la formación de la barrera hematoencefálica (BHE) (Verkhatsky y Butt, 2013).

Si alguna célula glial se ve alterada genéticamente en protooncogenes y/o genes supresores de tumores, puede generar una serie de modificaciones funcionales que dan origen al desarrollo de un tumor dentro del SN.

1.2 Tumores del sistema nervioso

La formación de la masa celular conocida como tumor es resultado de alteraciones a nivel molecular provocando fallas en los mecanismos que controlan el crecimiento y la proliferación celular (Weinberg, 2014). La aparición de estas alteraciones depende de factores externos como el consumo de tabaco, la exposición a químicos, radiación y organismos infecciosos; y de factores internos de la célula como son las mutaciones heredadas o inducidas por: disfunción de enzimas reguladoras de productos del metabolismo, deficiencia en los sistemas de reparación del ADN, producción descontrolada de factores señalizadores de la proliferación, entre otros (Hejmadi, 2010). Las células tumorales sufren cambios fisiológicos (Figura 2) que les proveen capacidades particulares como: evasión de la apoptosis, activación de la angiogénesis, desregulación del sistema energético celular, evasión de la destrucción de la célula cancerosa por parte del sistema inmune. La conversión de tumor a cáncer es dependiente de desarrollar la capacidad de invasión y metástasis (Hanahan y Weinberg, 2000; 2011).



Figura 2. Principales características fisiológicas de una célula tumoral (modificado de Hanahan y Weinberg, 2011).

El término cáncer es utilizado en más de 200 patologías diferentes (Faratian y col., 2010) y es considerado por la Organización Mundial de la Salud (OMS) como una de las principales causas de morbilidad y mortalidad a nivel mundial, estimando 14 millones de nuevos casos y 8 millones de muertes en 2012. Los tumores del sistema nervioso (SN) representan entre el 2 y 3% del total de tipos de cáncer, con una incidencia de 21 nuevos casos por cada 100,000 habitantes al año (WHO, 2014). Es importante destacar que este tipo de tumores presentan una baja probabilidad de migración fuera de SN pero una alta capacidad para generar tumores secundarios dentro del mismo tejido (Franks, 1991; Lodish y col., 2005).

El criterio de clasificación de la OMS para tumores del SN se basa en su origen celular, agresividad, malignidad y morfología, creando de tal forma un sistema de medición que comprende del Grado I al IV, siendo los tumores de Grado I aquellos con bajo nivel de crecimiento y baja probabilidad de colonización de otras zonas del SN; Grado II aquellos con naturaleza de infiltración profunda, bajo nivel proliferativo pero recurrentes; los Grado III muestran atipia nuclear y actividad mitótica activa; y los tumores de Grado IV que se caracterizan por ser de rápido crecimiento y colonizar otras zonas dentro del SN (Louis y col., 2007). Existen más de 125 tipos diferentes de tumores del SN, cuyas variables de clasificación son muy diversas por la propia heterogeneidad de los tumores (Ironsides y Ironsides, 2012). De acuerdo a la OMS, los tumores con mayor incidencia son: neuroblastomas, meningiomas, y gliomas WHO, 2014).

Los neuroblastomas se caracterizan por ser tumores neuroepiteliales cuyo origen son las células de la cresta neural, de la que se derivan los ganglios neurales simpáticos y la médula adrenal (Irwin y Park, 2015). Estos tumores se presentan principalmente en la infancia con una incidencia de 10.5 por cada millón de niños entre 0 y 4 años. Estos tumores tienen la tendencia de crecer rápidamente y la capacidad de diseminarse a través LCR (Cheung y Dyer, 2013).

Los meningiomas son tumores de lento crecimiento compuesto por células aracnoideas (Doroudchi y col., 2013). Hay varios tipos de meningiomas los cuales

son clasificados de acuerdo a su sitio de origen, la relación con otros tejidos y su grado histológico; algunos de éstos son los fibrosos, angiomas, microcísticos, cordoides, metaplásicos y anaplásicos (malignos). Estos tumores equivalen al 30% de los tumores de SNC en adultos y entre el 0.4 y 4.6% en niños y adolescentes siendo más común en mujeres de entre 30 y 60 años. Éstos pueden aparecer en cualquier área del SNC y son comunes las apariciones múltiples, sin embargo, la metástasis es muy rara (Fathi y Roelcke, 2013).

Los gliomas equivalen al 50% de los tumores dentro del SN convirtiéndolos en los más comunes. Estos tumores surgen de las células gliales y son considerados tumores malignos debido a su gran capacidad de infiltración en el cerebro. Presentan la característica de no poseer un borde claro y definido, por lo que la extirpación quirúrgica total es complicada (Somasundaram y col., 2009). Debido a que tienen comportamientos distintos de actividad proliferativa, vascular y mitótica, la estrategia médica para combatirlos difiere entre ellos (Ironsides y Ironsides, 2012). Los gliomas están clasificados en oligodendrogliomas, oligoastrocitomas y astrocitomas, de acuerdo a las células donde se originan (Sreekanthreddy y col., 2010).

Los oligodendrogliomas están clasificados por la OMS como Grado II, sin embargo, en algunos casos donde llegan a mostrar un aumento en la actividad mitótica, necrosis y proliferación vascular son re-clasificados como Grado III, a éstos últimos se les denomina oligodendrogliomas anaplásicos. Los oligodendrogliomas presentan quimiosensibilidad al tratamiento con PVC (procarbacin, lomustina y vincristina) (Stege y col., 2005) así como radiosensibilidad, además de ser identificables por imagenología debido a que muestran signos de calcificación. Microscópicamente, estos gliomas están compuestos por células de núcleo redondo con un halo perinuclear (Figura 3) y están generalmente organizados en nódulos agrupándose preferentemente alrededor de las neuronas (Hilton y Shivane, 2015).

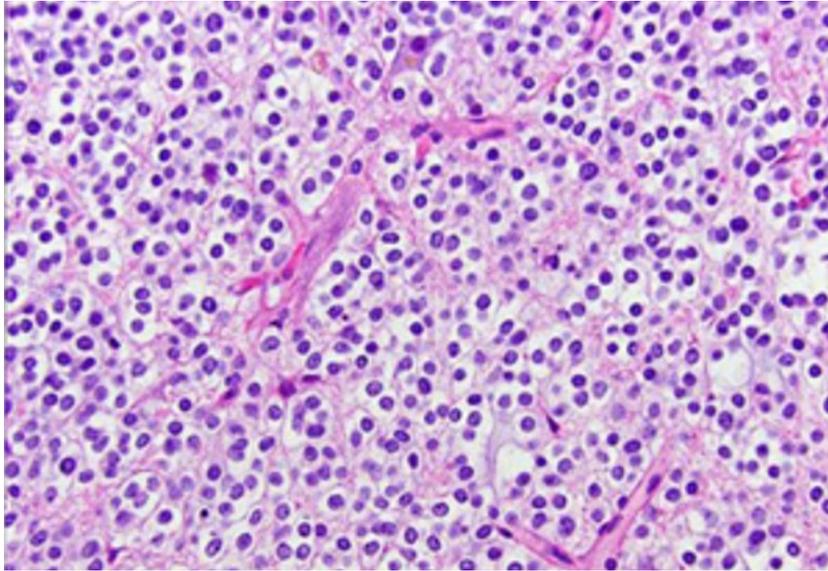


Figura 3. Histología del oligodendroglioma (Wesseling y col., 2015).

Los oligoastrocitomas llevan su nombre por presentar características de un oligodendroglioma además de algunos componentes astrocíticos por lo que son difíciles de diagnosticar (Figarella-Branger y col., 2008). Dependiendo de su malignidad pueden ser clasificados como oligoastrocitomas (Grado II) u oligoastrocitomas anaplásicos (Grado III) (Hilton y Shivane, 2015).

Los astrocitomas son el tipo de tumor primario más común del SNC cuya célula de origen es el astrocito (Omuro y DeAngelis, 2013). Estos tumores primarios se subdividen en: astrocitoma pilocítico (AP) o Grado I; astrocitoma difuso (AD) o Grado II; astrocitoma anaplásico (AA) o Grado III y glioblastoma (GBM) o Grado IV (Louis y col., 2007;).

El AP o Grado I muestra un crecimiento lento y debido a su baja malignidad puede ser removido quirúrgicamente por lo que los pacientes diagnosticados con éste tienen una esperanza de vida mayor a 5 años. Se presenta con mayor frecuencia en niños y adultos jóvenes además de tener preferencia por sitios específicos dentro del SNC como el hipotálamo y cerebelo. Histológicamente están caracterizados por células astrocíticas bipolares que forman áreas sólidas y microcísticas, fibras de Rosenthal y proliferación vascular (Figura 4a; flechas: fibras de Rosenthal). El AD o

Grado II es un tipo de astrocitoma de lento crecimiento cuya esperanza de vida para los pacientes diagnosticados con este tipo de tumor es de aproximadamente 4 años. Histológicamente muestran una morfología astrocítica de apariencia uniforme, baja celularidad y ausencia de figuras mitóticas (Figura 4b). El AA o Grado III muestra un aumento en la proliferación y anaplasia, siendo la esperanza de vida para los pacientes diagnosticados con este tipo de tumor de aproximadamente 18 meses. Histológicamente se caracterizan por presentar una densidad celular alta, atipias nucleares y mitosis (Figura 4c). El GBM o Grado IV es el tumor más común y más agresivo; una vez detectado la esperanza de vida no supera los 12 meses. Histológicamente se compone de células astrocíticas con grandes núcleos irregulares, figuras mitóticas, áreas de necrosis y proliferación vascular (Figura 4d; flechas: proliferación vascular) (Figarella-Branger y col., 2008; Sreekanthreddy y col., 2011; Hashemi y col., 2014; Ostrom y col., 2014; Hilton y Shivane, 2015).

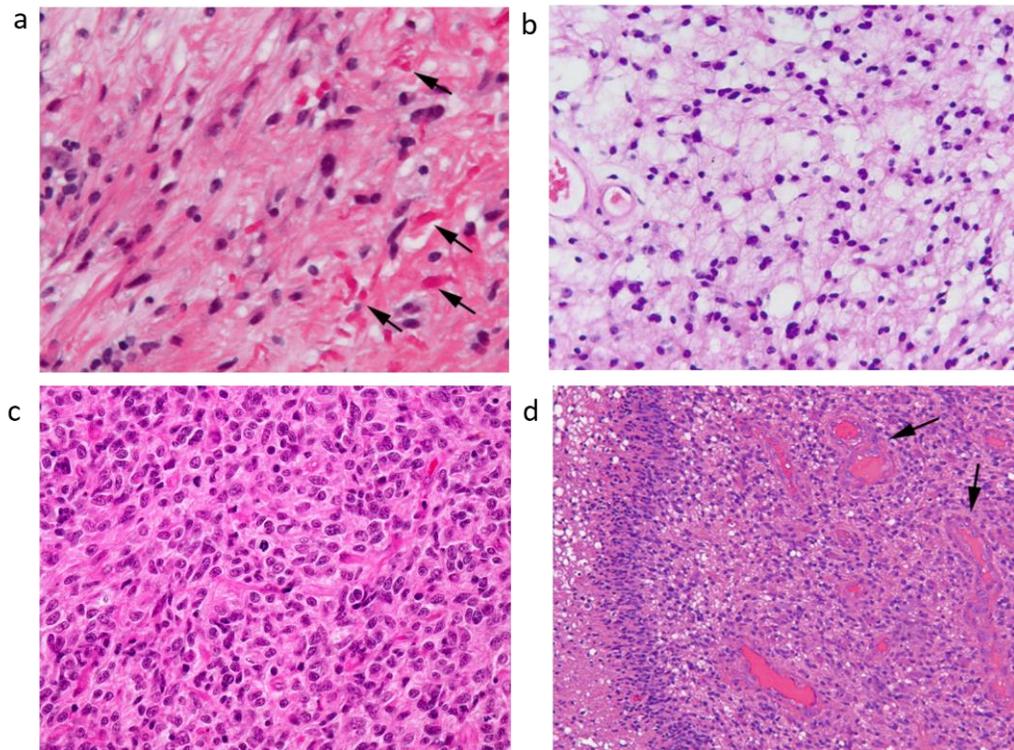


Figura 4. Histología de los astrocitomas. a) astrocitoma pilocítico, se señalan las fibras de Rosenthal (flecha); b) astrocitoma difuso; c) astrocitoma anaplásico; d) glioblastoma, se señala la proliferación celular (flechas) (Hilton y Shivane, 2015).

En el Cuadro 2 se señalan la edad promedio de aparición y supervivencia media de los astrocitomas.

Cuadro 2. Datos clínicos de los astrocitomas (modificado de WHO, 2014).

Tumor	Edad (años)	Supervivencia
Astrocitoma pilocítico (Grado I)	< 20	> 5 años
Astrocitoma difuso (Grado II)	20-45	4 años
Astrocitoma anaplásico (Grado III)	20-45	~ 18 meses
Glioblastoma (Grado IV)	~ 45-60	< 12 meses

1.3 Glioblastoma

El glioblastoma (GBM) tiene una incidencia anual de 5.26 casos por cada 100,000 habitantes y representa el 82% de los casos de glioma maligno a nivel mundial (Omuro y DeAngelis, 2013). Se clasifican en primario y secundario en relación a sus características clínicas. Los GBM primarios se presentan más comúnmente en pacientes de aproximadamente 60 años de edad. Este tipo de tumores no se derivan de astrocitomas de más bajo grado, es decir, se desarrollan desde un principio como GBM. Por otro lado, los GBM secundarios son más prevalentes en pacientes de 45 años o menos y se derivan de astrocitomas difusos y anaplásicos (Hashemi y col., 2014). El fármaco por elección para su tratamiento es la temozolmida (TMZ) que incrementa ligeramente la esperanza de vida de 8.1 a 9.7 meses, sin embargo, la mayoría de los pacientes desarrollan resistencia al tratamiento por lo que combatir la enfermedad es extremadamente complicado. Sólo el 5% de los pacientes sobrepasan los 5 años después de haber sido diagnosticados (Gallego, 2015).

1.4 Diagnóstico de tumores cerebrales

El diagnóstico de los tumores cerebrales se realiza a través de la revisión de la historia clínica del paciente y por técnicas de imagenología e histopatología.

La sospecha de la presencia de un tumor cerebral comienza con la aparición de diversos síntomas como son: hemiparesia, cambios neuropsicológicos, afasia, jaquecas, náusea, vómito y convulsiones (Stark y col., 2010).

Las jaquecas son de los síntomas más frecuentes, presentes en aproximadamente 50% de los casos. En un paciente mayor de 50 años, las jaquecas suelen presentarse de manera recurrente y con severidad progresiva. Las dificultades cognitivas y cambios de personalidad son frecuentemente confundidas por desórdenes psicológicos o demencia, particularmente en adultos mayores. Síntomas como hemiparesia, pérdida sensorial o alteración del campo visual son comunes y reflejan la localización del tumor. Ocasionalmente, el desarrollo de los síntomas es rápido, parecido a una apoplejía. Las convulsiones son el síntoma más común y se presentan en el 20-40% de los pacientes. Un diagnóstico temprano es difícil de realizar dado que los primeros síntomas son parte del cuadro sintomatológico de otras patologías no relacionadas al cáncer por lo que la mayoría de los individuos se realizan análisis por imagenología hasta presentar síntomas como pérdida de equilibrio, problemas de memoria y convulsiones (Omuro y DeAngelis, 2013).

Las técnicas de imagenología para el diagnóstico de gliomas son: la tomografía computarizada (CT), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de resonancia magnética nuclear (Doroudchi y col., 2013). Sin embargo, estas técnicas se basan en la medición de la integridad de la barrera hematoencefálica (BHE) por lo que sólo es una medición indirecta de los tumores (Holdhoff y col., 2013) debido a que el contraste no es capaz de atravesar la BHE intacta (Wolburg et al., 2012).

La RMN es preferida entre otros métodos de diagnóstico debido a su alta resolución de contraste y capacidad de mostrar varios planos con las secuencias T1 y T2 además del volumen sanguíneo cerebral a través de la perfusión con resonancia magnética (PRM), en la cual se observa la vascularidad cerebral (Hattingen y Warmuth-Metz, 2016).

El medio de contraste empleado por excelencia es el gadolinio, el cual es administrado vía intravenosa momentos antes de realizar el estudio y al ser un metal

con propiedades paramagnéticas, modifica el magnetismo de los protones de agua aumentando la intensidad de la señal de lesiones que presentan una vascularidad alterada. El GBM aparece en imágenes de RMN (Figura 5) como una masa heterogénea, esto se debe a la formación de espacios necrótico y/o quistes (Demir y col., 2005).

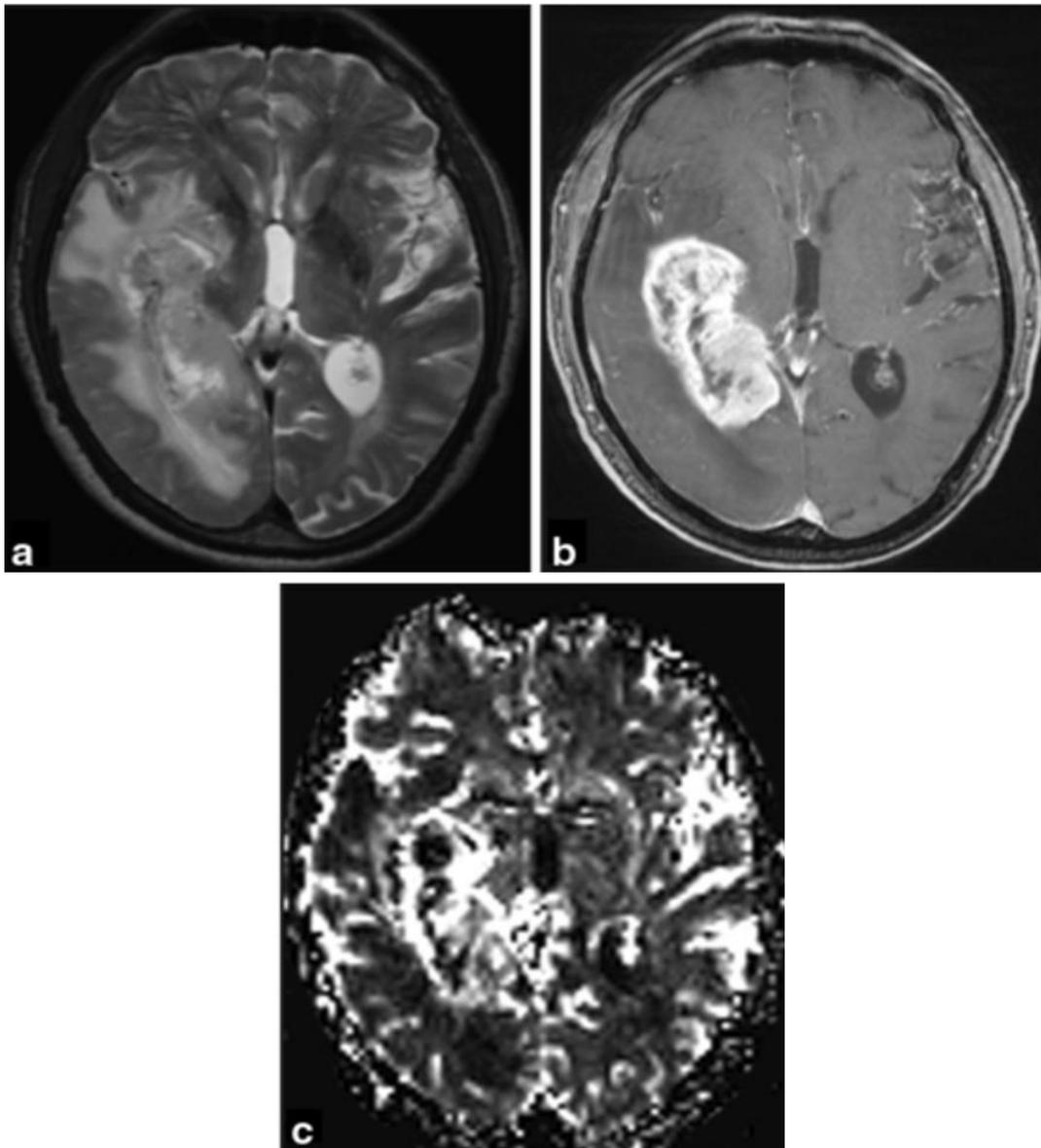


Figura 5. Resonancia magnética de GBM. Se muestra un GBM con un alto volumen sanguíneo cerebral (VSC). a) secuencia T1; b) secuencia T2 después de añadir el contraste; c) perfusión por resonancia magnética (PRM) (Ticky y col., 2015)

Otro método de diagnóstico que aunado a la imagenología ayuda en la correcta identificación de los tumores es el análisis histopatológico el cual se basa en la tinción diferencial de tejido utilizando colorantes para reconocer e interpretar anomalías morfológicas en biopsias (Hilton y Shivane, 2015).

Las tinciones más utilizadas por histopatólogos y neuropatólogos son la hematoxilina y eosina, violeta de cresilo, bielschowsky y PTAH (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tinciones histológicas (modificado de Hilton y Shivane, 2015).

Tinción	Uso
Hematoxilina y eosina	Tinción más utilizada en histopatología. Usada para teñir secciones congeladas y tejido fijo con formalina. La hematoxilina tiñe el núcleo de azul y la eosina tiñe el citoplasma de rosa. Esta tinción no es específica para algún tipo celular o estructura, sin embargo permite evidenciar la estratificación tisular y alteraciones morfológicas en las células.
Violeta de cresilo	Utilizada principalmente para el estudio de la morfología y distribución de neuronas. El cresil violeta tiñe los cuerpos de Nissl de púrpura oscuro o azul.
Bielschowsky	Tinción de plata utilizada para localizar axones, los cuales son teñidos de negro.
PTAH	Esta tinción es utilizada para identificar astrocitos y fibras gliales.

Actualmente se están investigando algunos marcadores moleculares tisulares, séricos o en LCR como potenciales herramientas de diagnóstico. Con estas nuevas estrategias puede ser posible realizar un diagnóstico temprano, una mejor predicción de respuesta al tratamiento y una clasificación más precisa. Por lo anterior, el diagnóstico molecular es una herramienta útil complementaria de los análisis histológicos, de imagenología e historia clínica en el diagnóstico tumoral (Capper y Reifenberger, 2015).

Algunas alteraciones moleculares frecuentes correlacionadas con gliomas específicos son: mutaciones en los codones R132 de la isocitrato deshidrogenasa (IDH) 1 y R172 de la IDH2, fusión del gen BRAF a causa de una duplicación en tándem, pérdida de material genético en el brazo largo del cromosoma 19 (19q) y del brazo corto del cromosoma 10q, aumento en la amplificación del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), supresión de p16^{INK4A}, mutaciones en PTEN y P53, (Figura 6) (Figarella-Branger y col., 2008; Capper y Reifenberger, 2015).



Figura 6. Marcadores moleculares en diagnóstico de gliomas (WHO,2014).

1.5 Biomarcadores en gliomas

De acuerdo al Instituto Nacional de Cáncer un biomarcador es: “una molécula biológica encontrada en sangre, otros fluidos corporales, o tejidos que proporcionan una señal de un proceso normal o anormal, o de una condición o enfermedad” (NCI), es decir, los biomarcadores son indicadores de alteraciones a nivel fisiológico, celular, sub-celular y molecular en el desarrollo de enfermedades específicas o respuestas farmacológicas de una intervención terapéutica (Wang y col., 2001; Kros

y col., 2015). En los últimos años se han investigado biomarcadores que puedan ser obtenidos de forma no invasiva con potencial para: 1) identificar riesgo de cáncer, 2) realizar un diagnóstico temprano, 3) obtener una clasificación precisa y 4) lograr un eficiente seguimiento del tratamiento determinándose en tejido, suero o LCR (Somasundaram y col., 2009).

Para la detección de biomarcadores en tejido se utiliza como herramienta a la inmunohistoquímica. Algunos de estos biomarcadores tisulares utilizados para confirmar el diagnóstico o que proveen mayor información en casos complejos tumorales son: proteínas del neurofilamento (NFP) y sinaptofisina que funcionan como marcadores diferenciales entre tumores infiltrados y no infiltrados localizados en las neuronas; proteína S-100, utilizada para teñir tumores en las vainas nerviosas (Schwannomas), ependimomas y melanomas; MIB-1/ki-67, marcador utilizado para teñir a las células que están en fase proliferativa del ciclo celular; y la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), proteína del citoesqueleto usada para identificar a los tumores de origen astrocítico (Ironsides y Ironsides, 2012).

Otro candidato para la obtención de biomarcadores es el suero debido a que los cambios en la concentración de sus componentes pueden ayudar a diferenciar entre un estado fisiológico normal y anormal de algún individuo. Algunos autores señalan como posibles biomarcadores séricos para la identificación de glioma al factor de crecimiento epidérmico (EGF) el cual muestra niveles en suero correlacionables con los grados de astrocitoma; YKL-40, factor de crecimiento para células del tejido conectivo, factor de adhesión y migración de células endoteliales cuyos niveles en suero aumentan en presencia de gliomas; CTSD, la catepsina D es una proteasa aspártica que se encuentra presente en niveles más altos con respecto a su expresión basal en gliomas de alto grado; y GFAP, de la cual se ha descrito que se presenta en niveles detectables en GBM comparado con los niveles de individuos sanos debido a la alta capacidad de proliferación que tiene este tumor, provocando la necrosis de células circundantes de tal forma que es detectable en el torrente sanguíneo como consecuencia del estado comprometido en la integridad de la BHE (Somasundaram y col., 2009).

1.6 GFAP

La proteína ácida fibrilar de glía (GFAP), descrita en un principio por Eng y col. (1969), es un filamento intermedio (FI) tipo III presente en el cerebro y característico de los astrocitos maduros (Kiviniemi y col., 2015). Los filamentos intermedios son proteínas que forman parte del sistema de filamentos del citoesqueleto, el cual desempeña funciones que van desde darle forma a la célula hasta dirigir el tráfico intracelular de orgánulos. Este sistema, junto con los FI, está formado por los filamentos de actina o microfilamentos y los microtúbulos (Alberts, 2015). La GFAP, como filamento intermedio, se relaciona con procesos biológicos de movimiento y estructura celular, comunicación y mantenimiento de la integridad de la BHE (Biswas y col., 2011;).

A través de herramientas computacionales, Biswas y col. (2011) modelaron la posible estructura tridimensional de GFAP (Figura 7). Estructuralmente GFAP está dividida en tres grandes dominios: la “cabeza” amino-terminal, el “cuerpo” helicoidal central, y la “cola” carboxi-terminal (Middeldorp y Hol, 2011). El dominio N-terminal es el más pequeño de todas las proteínas de FI con 68 residuos de aminoácidos además contener la secuencia de nonapéptido (SSYRRIFGG) compartida por todos los FI tipo III (Sukhorukova y col., 2015).

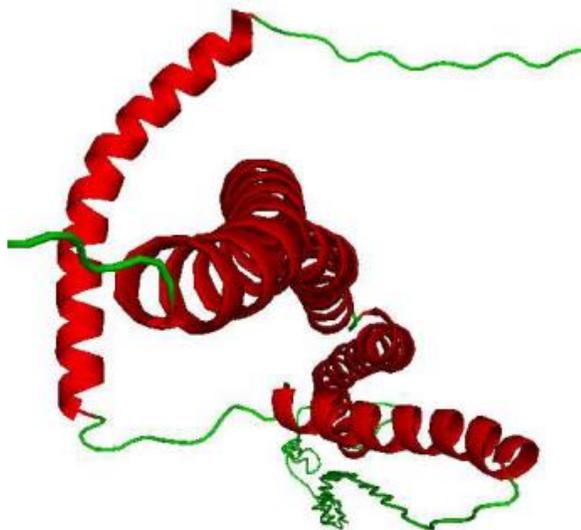


Figura 7. Estructura tridimensional de GFAP (Biswas y col., 2011).

La GFAP, clonada en 1989, se localiza en el cromosoma 17 (17q21) y está compuesto de 8 intrones y 9 exones. El corte y empalme del ARN puede dar lugar hasta 8 isoformas (Cuadro 4) con estructuras diferentes en el dominio C-terminal y similares en el N-terminal (Figura 8) (Sukhorukova y col., 2015).

Cuadro 4: Isoformas de la GFAP humana (Middeldorp y Hol, 2011)

Isoforma	Transcripto	Tamaño (aa)
α	Exón 1-9	432
γ	Carece (en su mayor parte) del exón 1, nuevo exón.	≥ 321
δ y ϵ	Exón 1-7, y exón 7a	431
K	Exón 1-7, y exón 7b	438
$\Delta 135$	Deleción de nucleótidos en exón 3 y 6	374
$\Delta 164$	Deleción de 164 nucleótidos	≤ 366
$\Delta \text{exon}6$	Carece del exón 6	≤ 347

De estas isoformas, la α -GFAP es la más abundante con 432 residuos de aminoácidos (Petzold, 2015), un peso molecular alrededor de 50 kDa y un punto isoeléctrico de 5.42 (Middeldorp y Hol, 2011).

Los cambios en la expresión de GFAP pueden alterar la morfología de los astrocitos, lo cual a su vez puede afectar de forma indirecta a otras células y por consiguiente la estructura del cerebro. La expresión de GFAP en el cerebro humano en desarrollo comienza en la glía radial, la cual está compuesta de células bipolares en la zona ventricular, que expresa de igual forma vimentina y nestina, además de que puede actuar como célula progenitora neural. Durante la maduración de las células precursoras a astrocitos, se observa un cambio en la presencia de los FI de vimentina a GFAP, esto se debe a que la expresión de GFAP es directamente proporcional al

desarrollo del cerebro generando un incremento en la transcripción de GFAP (Middeldorp y Hol., 2011).

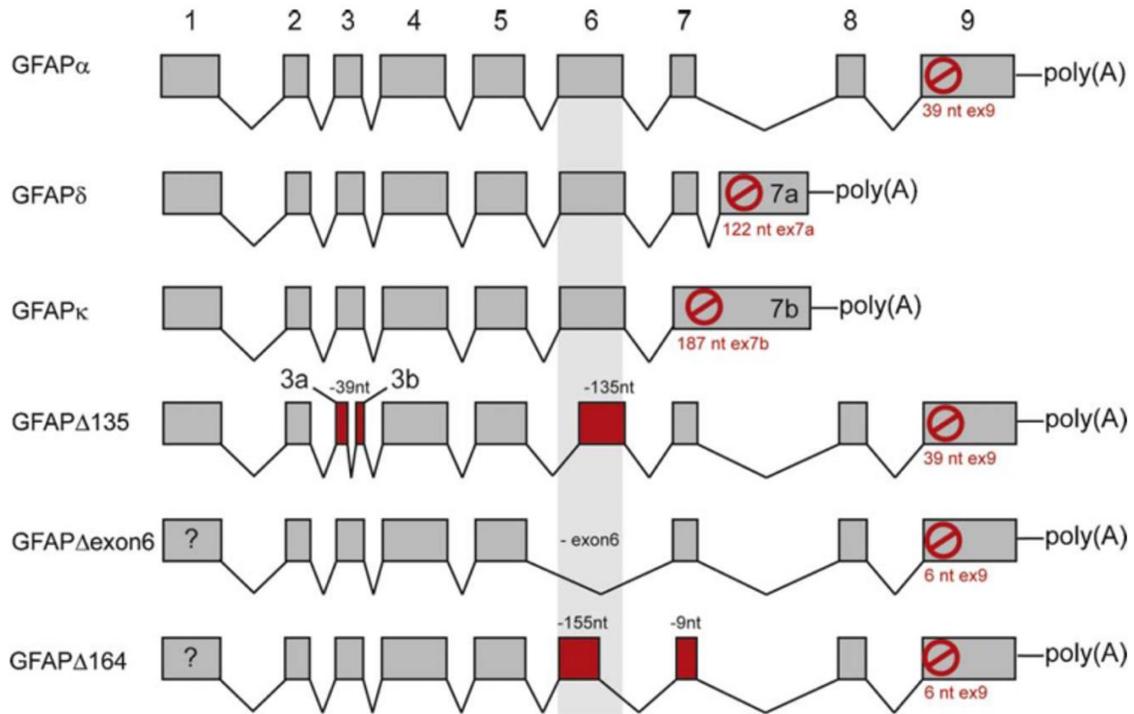


Figura 8. Isoformas por corte y empalme de la GFAP humana (Middeldorp y Hol, 2011)

Además de su rol como proteína estructural del citoesqueleto (Sukhorukova y col., 2015) en los últimos años se ha logrado elucidar a través de investigaciones de modelos experimentales con ratones y líneas celulares el papel de GFAP en las funciones fisiológicas particulares de los astrocitos. La GFAP está involucrada en la regulación del volumen y movimiento del mismo, juega un rol importante en las interacciones neurona-glia y en el anclaje a la membrana plasmática de los transportadores de glutamato cruciales para el reciclaje de neurotransmisores. La presencia de GFAP fomenta la creación de nuevas conexiones sinápticas además de ser requerida durante la vascularización del tejido nervioso y la formación de la BHE. En caso de lesiones cerebrales, promueve la formación de una cicatriz glial a través de los astrocitos reactivos (Figura 9) (Middeldorp y Hol, 2011).

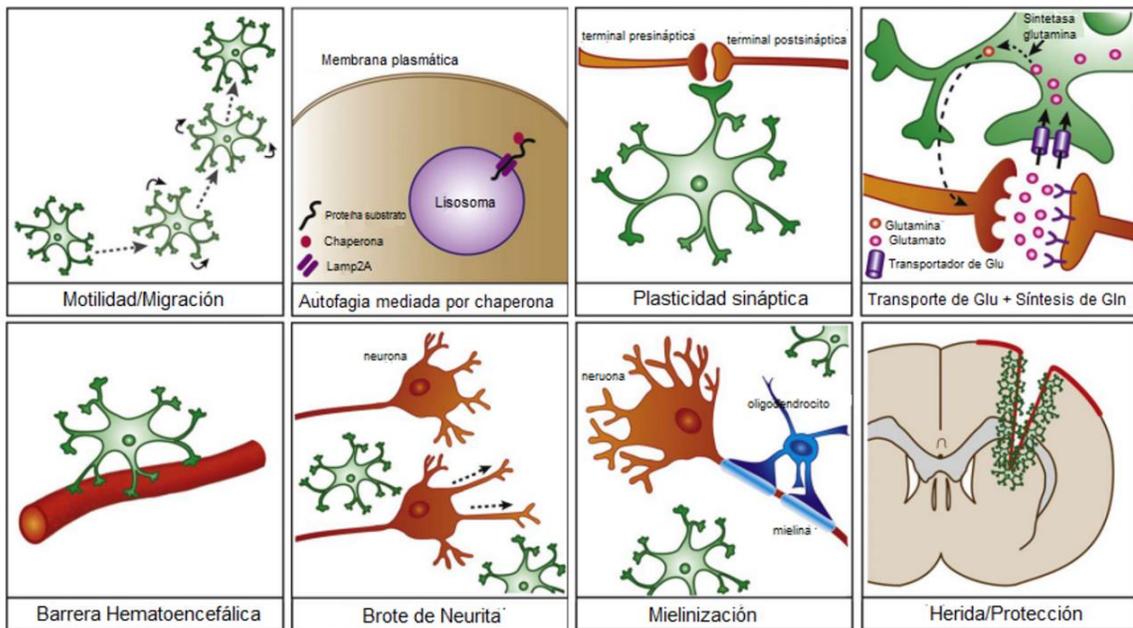


Figura 9. Funciones atribuidas a GFAP (Middeldorp y Hol, 2011).

La proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) es un importante componente astrocítico estructural y funcional. Por lo tanto su detección en suero indica un estado patológico de estas células, aunado con la desestabilización de la BHE, convirtiéndolo en un biomarcador con potencial para el diagnóstico diferencial específico de los distintos tumores cerebrales en la población mexicana.

2. HIPÓTESIS

La concentración de la proteína ácida fibrilar glial (GFAP) en suero varía entre distintos tipos de tumores cerebrales de acuerdo al tipo celular, grado y factores etiológicos.

3. OBJETIVO

3.1 General

Cuantificar las concentraciones de GFAP en suero de pacientes diagnosticados con distintos tumores cerebrales y relacionarlas con el diagnóstico clínico establecido.

3.2 Específicos

1. Obtener muestras séricas de pacientes diagnosticados con distintos tipos de tumores asociados al sistema nervioso, no relacionados al sistema nervioso y sin patologías.
2. Evaluar los niveles séricos de GFAP de las muestras obtenidas utilizando la técnica de ELISA.
3. Analizar la expresión proteica en tejido tumoral a través de una electroforesis bidimensional.
4. Correlacionar la concentración de GFAP y evaluar su viabilidad como biomarcador diferencial de los distintos tipos de tumores cerebrales.

4. METODOLOGÍA

4.1 Muestra poblacional

Se invitaron a participar en este proyecto a pacientes del Hospital General de México Eduardo Liceaga usuarios de los servicios de Oncología y Neurología durante 2015-2016 y personas sanas de la Universidad Autónoma de Querétaro. Los participantes en el estudio fueron divididos en tres grupos. El grupo 1 denominado “grupo de neuro-oncología”, integrado por pacientes diagnosticados con diferentes tumores cerebrales; el grupo 2 denominado “grupo oncológico no relacionado”, formado por pacientes diagnosticados con tumores no relacionados al SNC y el grupo 3 “grupo control”, constituido por individuos que no tuvieran historial clínico relacionado con alguna patología tumoral.

Los criterios de inclusión establecidos para todos los participantes del proyecto fueron los siguientes: ser mayor de 18 años, sexo indistinto, aceptar participar voluntariamente en el proyecto y firmar el consentimiento informado. Adicionalmente los participantes del grupo 1 debían presentar una sintomatología clínica de tumor cerebral, misma que debió haber sido confirmada por estudios de imagenología, histopatología y diagnóstico clínico del médico tratante; para el grupo 2 debían presentar un diagnóstico clínico comprobado de tumorigénesis no relacionado al SNC; finalmente para el grupo 3 los participantes no debían presentar o haber presentado alguna patología tumoral y mostrar valores séricos de 6 marcadores (glucosa, urea, creatinina, ácido úrico, colesterol total y triglicéridos) dentro de los rangos de referencia en una química sanguínea de rutina. Fue motivo de exclusión no cumplir con cualquiera de los criterios antes mencionados.

Cada paciente, sin importar el grupo, dio su consentimiento para la obtención de la muestra y acceso a algunos datos como edad y diagnóstico definido. El documento de consentimiento informado para este estudio fue redactado basado en la Declaración de Helsinki y las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos de la CIOMS, en el proceso, se le explicó al paciente el propósito del estudio, el tipo de muestra que se tomaría, el proceso para realizar

la toma de muestra, el volumen de la misma y que ésta solo se tomaría una única vez. Se solicitó el permiso para el acceso a los datos de su edad y diagnóstico. Se enfatizó en la confidencialidad y anonimato con la cual sería manejada la información. El paciente tuvo la libertad de aceptar o no participar en el estudio además de conocer la posibilidad de poder salir del protocolo o retirar los datos de su muestra en cualquier momento sin repercusión alguna en su tratamiento, así como la posibilidad de conocer los resultados obtenidos del estudio si lo solicitaba.

Sólo aquellos pacientes cuyo procedimiento terapéutico indicara extirpación quirúrgica se les solicitó la donación de una parte de la biopsia extraída para análisis de proteínas.

De cada participante se obtuvo una muestra sérica y una biopsia del paciente diagnosticado con astrocitoma maligno (AM). En el cuadro 5 se señalan los diagnósticos de los participantes del proyecto y el tipo de muestra donada.

Cuadro 5: Diagnósticos de los participantes.

Paciente	Diagnóstico	Nomenclatura	Muestra
1	Sin patologías	H1	Suero
2	Sin patologías	H2	Suero
3	Sin patologías	H3	Suero
4	Sin patologías	H4	Suero
5	Sin patologías	H5	Suero
6	Cáncer cérvico uterino	CCU	Suero
7	Mieloma	M	Suero
8	Tumor mixto pulmonar	TMP	Suero
9	Cáncer gástrico	G	Suero
10	Sarcoma	S	Suero
11	Astrocitoma maligno	AM	Suero/Biopsia
12	Glioblastoma	GBM	Suero
13	Astrocitoma pilocítico	PA	Suero
14	Schwannoma	W	Suero
15	Astrocitoma de alto grado	AAG	Suero

4.2 Recolección de la muestra

La toma de muestra consistió en recolectar 5 mL de sangre periférica en un tubo sin anticoagulante a través de una punción venosa de los pacientes que cumplieron con los parámetros de inclusión. Los participantes realizaron un ayuno mínimo de 8 horas antes de la recolección. La muestra de los participantes fue obtenida por personal especializado del Hospital General de México Eduardo Liceaga y de la Unidad de Análisis Clínicos de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. El suero fue separado del paquete globular por centrifugación a 3500 rpm durante 10 minutos, alicuotado y almacenado a -70°C hasta que se comprobara la integridad de los sueros. Por otro lado, el tejido tumoral fue obtenido a través de una cirugía realizado por el onco-neurocirujano, una tercera parte de esa muestra fue donada para el proyecto y almacenada a -70°C

4.3 Extracción de proteínas totales

La extracción de proteínas totales de la muestra tumoral se realizó utilizando como amortiguador Tris-HCl (50mM, pH 9.0) con una concentración final de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, 11836153001) al 1X. El tejido tumoral se pesó y se adicionó el amortiguador de extracción en una proporción de 5 μL por cada mg de muestra. Se realizó una lisis mecánica cortando con bisturí, se recolectó la muestra la cual se mantuvo durante 2 horas en baño de hielo en agitación por vórtex. Una vez transcurridas las dos horas, el extracto fue centrifugado por 15 minutos a 10,000 rpm a 4°C , el sobrenadante fue recuperado y alicuotado para ser almacenado a -70°C .

4.4 Cuantificación de proteínas totales

La cuantificación proteica se llevó a cabo utilizando el método de Bradford. La curva estándar utilizada para la cuantificación se realizó de acuerdo a los parámetros recomendados por la casa comercial (Sigma-Aldrich, B6916). Se realizaron diluciones en serie con un rango de 0 a 1.4 mg/mL a partir de una solución stock de 2 mg/mL de BSA (Bio-Rad, 5000207) En el cuadro 6 se muestra el volumen del estándar y agua necesarios para la obtención de las concentraciones específicas de BSA para la curva estándar.

Cuadro 6. Curva estándar para cuantificación proteica.

Volumen del Estándar	H ₂ O	Concentración BSA
17.5 µL de 2 mg/mL	7.5 µL	1.4 mg/mL
14.3 µL de 1.4 mg/mL	5.71 µL	1 mg/mL
10 µL de 1 mg/mL	10 µL	0.5 mg/mL
10 µL de 0.5 mg/mL	10 µL	0.25 mg/mL

Se realizaron 2 diluciones de la muestra de tejido para su cuantificación, 1:20 y 1:50, y una dilución de 1:70 para las muestras de suero. Por duplicado se añadieron 5 µL de las diluciones y 250 µL del reactivo de Bradford en una placa de 96 pocillos; se mezcló por pipeteo, la placa fue incubada a temperatura ambiente por 6 minutos y se leyó la absorbancia a 595 nm. Las absorbancias de la curva estándar fueron graficadas obteniendo una línea de tendencia central y una ecuación de la recta. Las concentraciones de las muestras problema se calcularon interpolando las absorbancias en la ecuación de la recta y multiplicando por el factor de dilución.

4.5 Electroforesis de proteínas

Se prepararon geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% (Cuadro 7). Todas las muestras se ajustaron a un volumen final de 20 µL con una concentración proteica de 55 mg/mL y buffer de carga 1X (Tris-HCl, SDS, glicerol, azul de bromofenol, β-mercaptoetanol).

Cuadro 7. Composición de geles para SDS-PAGE.

Reactivo	Gel de empaquetamiento 5%	Gel separador 10%
H ₂ O	2.1 mL	1.9 mL
1.5 M Tris (pH 8.8)	-	1.3 mL
1.0 M Tris (pH 6.8)	380 µL	-
30% solución de poliacrilamida	500 µL	1.7 mL
10% SDS	30 µL	50 µL
10% persulfato de amonio	30 µL	50 µL
TEMED	3 µL	2 µL

Las muestras fueron incubadas a 95°C por 5 minutos, transferidas a hielo y centrifugadas 10 segundos a 4°C. A continuación, se cargaron en el gel y se corrió a 100V durante 2 horas. Una vez finalizada la corrida, los geles fueron teñidos durante 5 minutos con una solución de azul de Coomassie (45% metanol, 10% ácido acético glacial, 0.25% Coomassie) y en agitación toda la noche con agua con el fin de eliminar el exceso de colorante. Los geles fueron digitalizados y analizados por densitometría utilizando el software Image Lab (Bio-Rad).

4.6 ELISA

Los niveles de GFAP en suero fueron medidos utilizando el ensayo de adsorción (ELISA) tipo sándwich para realizar la cuantificación de GFAP humana. Se analizaron 3 muestras de pacientes sin patologías (H1, H2 y H3), 3 de pacientes con tumorigénesis no relacionada al SN (TMP, G y S) y 4 de pacientes con distintos tipos y grados de tumores cerebrales (AM, GBM, PA y AAG).

El procedimiento del ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (BioVendor, RD192072200R). Las muestras, los controles de calidad y las soluciones estándar fueron diluidos 1:3 antes del análisis. Se hicieron duplicados de 100 µL por cada dilución en los pozos del ELISA que contenían anticuerpo anti-GFAP fijado previamente y a continuación la placa fue incubada por 2 horas a temperatura ambiente en agitación constante, seguido por una hora de incubación con 100 µL de la solución del anticuerpo anti-GFAP biotilnado seguido de 1 hora de incubación con el anticuerpo conjugado estreptavidina-HRP. Entre cada incubación, se realizaron 3 ciclos de lavado. Posteriormente, la placa fue incubada 10 minutos con la solución de sustrato (tetrametilbenzidina) a temperatura ambiente sin agitación y protegida de la luz. La reacción colorimétrica fue detenida añadiendo la solución de paro (peróxido de hidrógeno). La absorbancia de los estándares y las muestras fue medida utilizando un lector de ELISA a 450 nm.

El límite de detección (LD) del ensayo en las condiciones de trabajo, definido como la concentración de la media de la absorbancia de los blancos (diluyente del calibrador) más 3 SD de la absorbancia de los blancos ($A_{\text{blanco}} + 3 \times SD_{\text{blanco}}$), fue

medido y calculado. Todos los valores debajo de este límite de detección fueron considerados con un valor de 0 ng/mL.

4.7 Electroforesis bidimensional

El extracto proteico tumoral fue centrifugado al vacío por 1 hora, se descartó el sobrenadante y la pastilla fue resuspendida con 125 μ L de la solución de rehidratación (8 M urea, 2% CHAPS, 50 mM DTT, 0.2% Bio-Lyte® 3/10 anfolito, 0.001% azul de bromofenol). A continuación, el total de la muestra rehidratada fue incubada toda la noche a 4°C bajo la tira de isoelectroenfoque de 7 cm de pH entre 3 y 6 (Bio-Rad, 163-2003). Una vez terminada la incubación, la tira fue colocada en el equipo de isoelectroenfoque y se prosiguió a realizar la separar las proteínas por punto isoeléctrico utilizando el programa especificado en el Cuadro 8.

Cuadro 8. Programa para isoelectroenfoque.

Etapa	Voltaje	Amperes (μ A/gel)	Tendencia	Tiempo
S1	250 V	50	Lenta	20 min
S2	4000 V	50	Lineal	2 hrs
S3	4000 V	50	Rápida	10,000 V/h
S4	500 V	50	Rápida	20 min

Una vez realizado el isoelectroenfoque se llevó a cabo una segunda dimensión para separar las proteínas por peso molecular en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10%. La tira de isoelectroenfoque se colocó físicamente encima del gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y se adicionó aragosa para unir la tira y el gel. La electroforesis se corrió durante 1 hora a 150 V.

Para el revelado, el gel de poliacrilamida se incubó toda la noche en una solución fijadora (metanol 30%, TCA 10%, ácido sulfosalicílico 3.5%) en agitación a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 30 minutos con una solución de metanol (30%) y TCA (12%). Se hizo un breve lavado con agua desionizada y se incubó el gel durante 1 hora con glutaraldehído al 10%. Una vez

terminado el periodo de incubación, se lavó en agua desionizada durante 6 horas en agitación. A continuación, se tiñó el gel incubándolo con una solución de plata (NaOH 21%, NH₄OH conc.1.4%, AgNO₃ 4%) durante 15 minutos. Se realizó un rápido lavado con agua para eliminar cualquier exceso de plata y se agregó la solución reveladora (ácido cítrico 10%, formaldehído 0.15%). La solución de paro del revelador (ácido acético 10%) se agregó una vez que apareció el patrón de proteínas. Finalmente, se lavó brevemente con agua y se digitalizó utilizando el software Image Lab (Bio-Rad).

5. RESULTADOS

5.1 Cuantificación de proteínas totales en suero

Con el objetivo de cuantificar las proteínas totales de los sueros se realizó una curva estándar con diluciones seriadas en un rango de 0-1.4 mg/mL de BSA como se señala en la metodología a partir de una solución stock de 2mg/mL (Cuadro 6). La ecuación de la recta para la curva estándar se obtuvo graficando la concentración de las diluciones contra la media de la absorbancia obtenida. En la Figura 10 se muestra una curva estándar representativa de la cuantificación de proteínas.

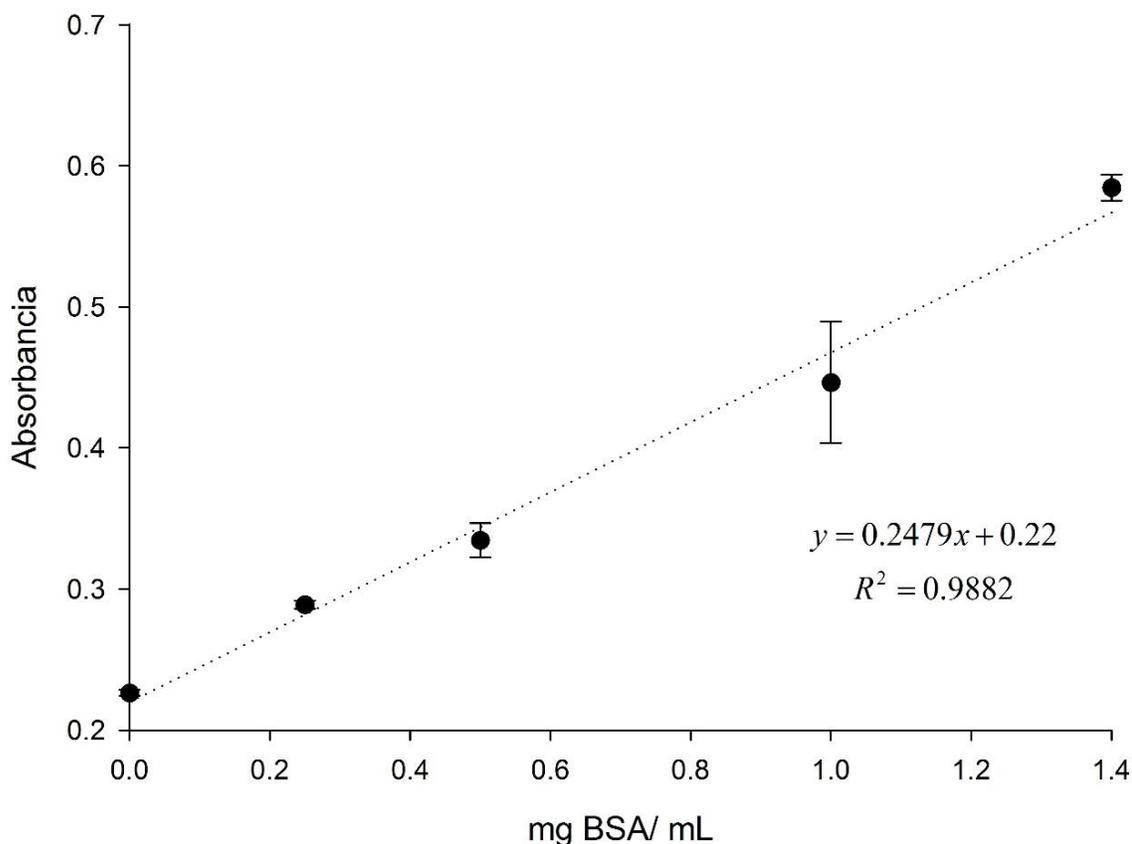


Figura 10. Curva estándar representativa de BSA.

La cuantificación proteica total de las muestras se calculó interpolando la media de sus absorbancias en la ecuación de la curva estándar. La media de las concentraciones proteicas totales obtenida de las muestras séricas de los 15 pacientes fue de 77.28 ± 24.70 mg/mL. En la Figura 11 se muestra la concentración

proteica de cada muestra y su análisis de varianza ($P < 0.05$). El análisis mostró diferencias estadísticamente significativas en la concentración sérica total de proteínas entre individuos, sin embargo, estas diferencias no presentan un patrón cuya tendencia podría estar asociada con el estado clínico de los participantes.

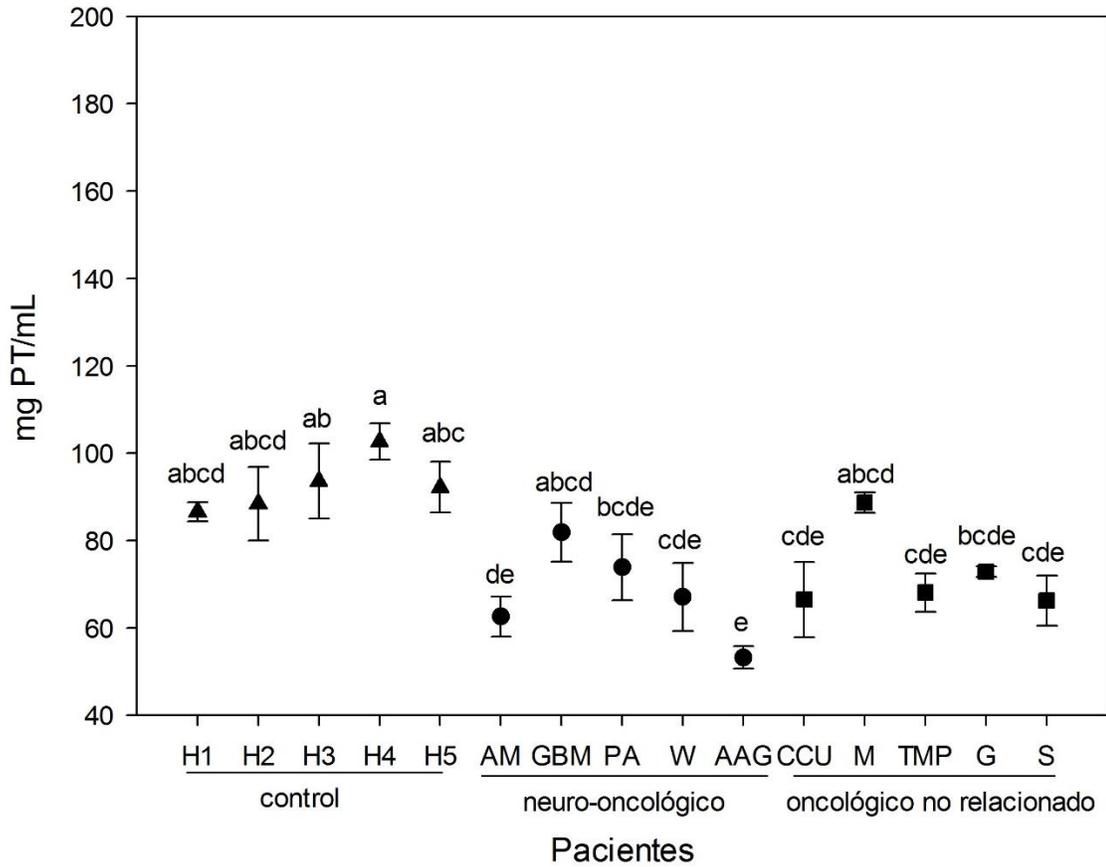


Figura 11. Concentración de proteínas totales (PT) en suero (●). (ANOVA-prueba de Tukey; $P < 0.05$.)

5.2 Electroforesis de proteínas.

Con el fin de comprobar la integridad de los sueros se realizó un SDS-PAGE al 10% y se analizó la expresión diferencial proteica. Para ello se analizó el perfil de expresión entre los individuos del grupo “control” y los pacientes de los grupos “neuro-oncológico” y “oncológico no relacionado”. En la Figura 12 (a y b) se observan todas las muestras séricas de los participantes, las cuales presentaron un patrón

similar de bandeo. Se observan bandas definidas comunes entre las muestras y patrones similares a los reportados (Chromy, 2004) sin signos de degradación.

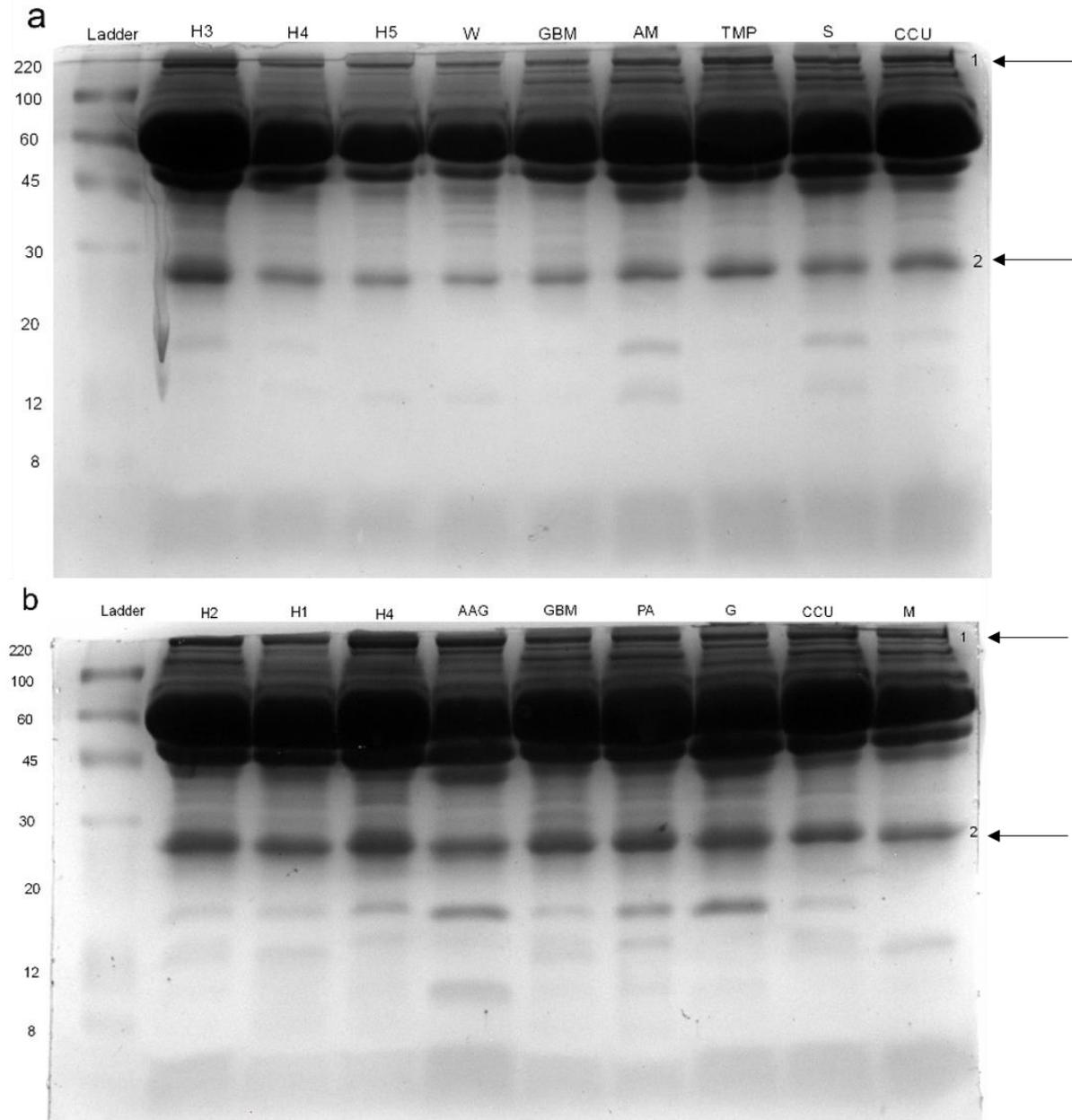


Figura 12. Electroforesis de proteínas de sueros. Geles a y b patrón de expresión proteico de las muestras. Flechas 1 y 2, bandas elegidas para análisis densitométrico.

Con el fin de confirmar que las diferencias en la concentración proteica en suero no eran debido al estado clínico de los participantes se seleccionaron al azar dos bandas proteicas definidas para realizar una semi-cuantificación por densitometría y posteriormente un análisis estadístico de las mismas. Con el análisis estadístico (Figura 13) observamos que la diferencia entre las muestras no está asociada al estado clínico de los participantes, además, una misma muestra presenta expresión diferencial entre proteínas.

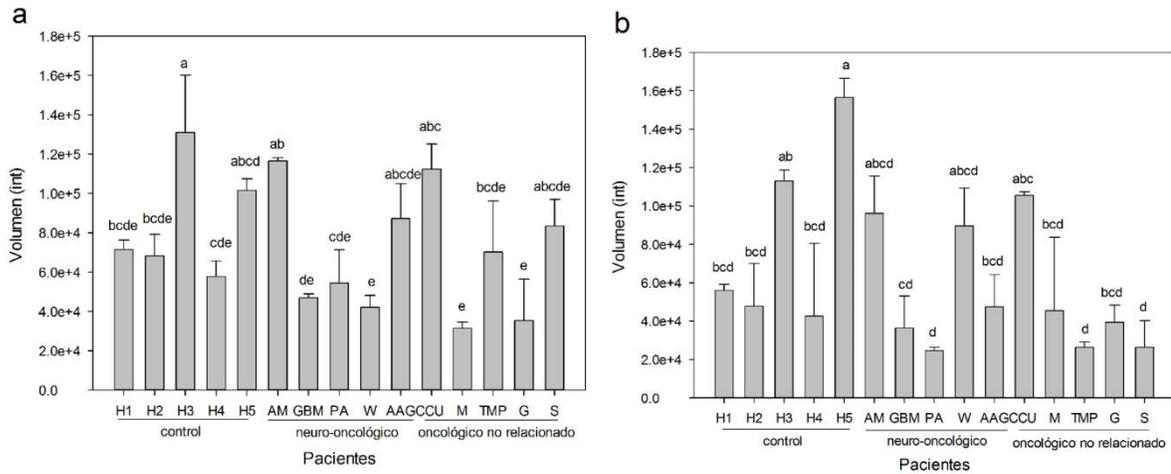


Figura 13. Densitometría de geles de proteína. a) banda 1 y b) banda 2. (ANOVA- Prueba de Tukey; P<0.05).

5.3 Cuantificación de GFAP por ELISA

Una vez comprobada la integridad del suero se prosiguió a cuantificar GFAP. En experimentos previos del laboratorio, se desproteinizaron sueros utilizando el kit Albumin and IgG Depletion (QIAGEN) con el fin de reducir las proteínas séricas más abundantes y así mejorar la detección de GFAP. Sin embargo, los resultados mostraron que, aunque la cantidad de albumina e IgG disminuía no se mejoraba significativamente la detección de GFAP (datos no se muestran) por lo que se decidió realizar los experimentos sin desproteinizar los sueros.

Para la cuantificación de GFAP por ELISA, se realizó una curva estándar por duplicado en un rango de 0 a 5 ng/mL (Figura 14) siguiendo las instrucciones de la casa comercial (BioVendor, RD192072200R). La ecuación de la recta se obtuvo

graficando la concentración contra el promedio de la absorbancia. La determinación de GFAP en las muestras se calculó interpolando el promedio de las absorbancias obtenidas en la ecuación de la curva estándar. El límite de detección (LD) calculado para el ensayo ($A_{\text{blanco}} + 3 \times SD_{\text{blanco}}$) fue definido como 0.179 ng/mL; todas las cuantificaciones debajo del LD se les asignó un valor de como 0 ng/mL.

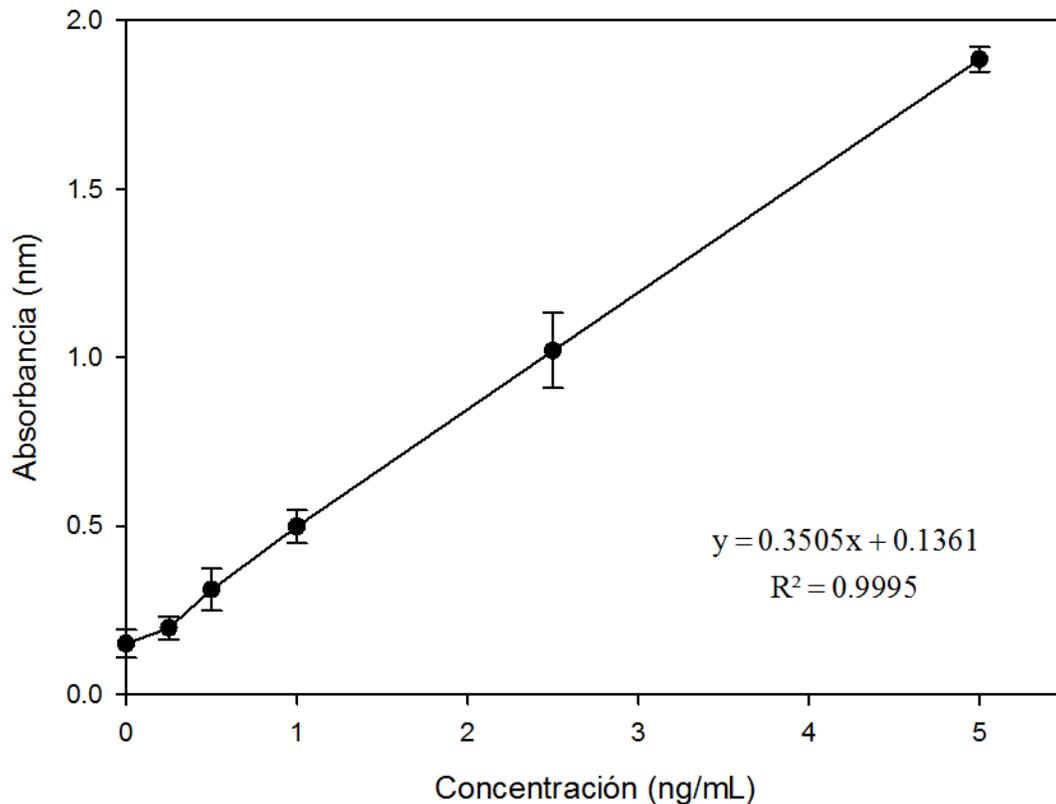


Figura 14. Curva estándar representativa para GFAP del ELISA.

Se utilizó el suero de 10 pacientes con distintos diagnósticos de los cuales el 92% de los valores obtenidos de GFAP se encontraron debajo del límite de detección calculado (0.179 ng/mL). En la Figura 15 se observa que ningún paciente del grupo “control” mostró niveles detectables de GFAP en suero; los pacientes del grupo “oncológico no relacionado” no mostraron GFAP en suero (límite de detección 0.179 ng/mL) y el paciente diagnosticado con GBM fue el único del grupo de “neuro-oncología” que mostró niveles de GFAP en suero por arriba del límite de detección (1.362 ng/mL). Se realizaron al menos tres experimentos independientes con

duplicado de cada muestra exceptuando los pacientes del grupo control, los cuales se utilizaron muestras de distintos pacientes por duplicado en cada experimento.

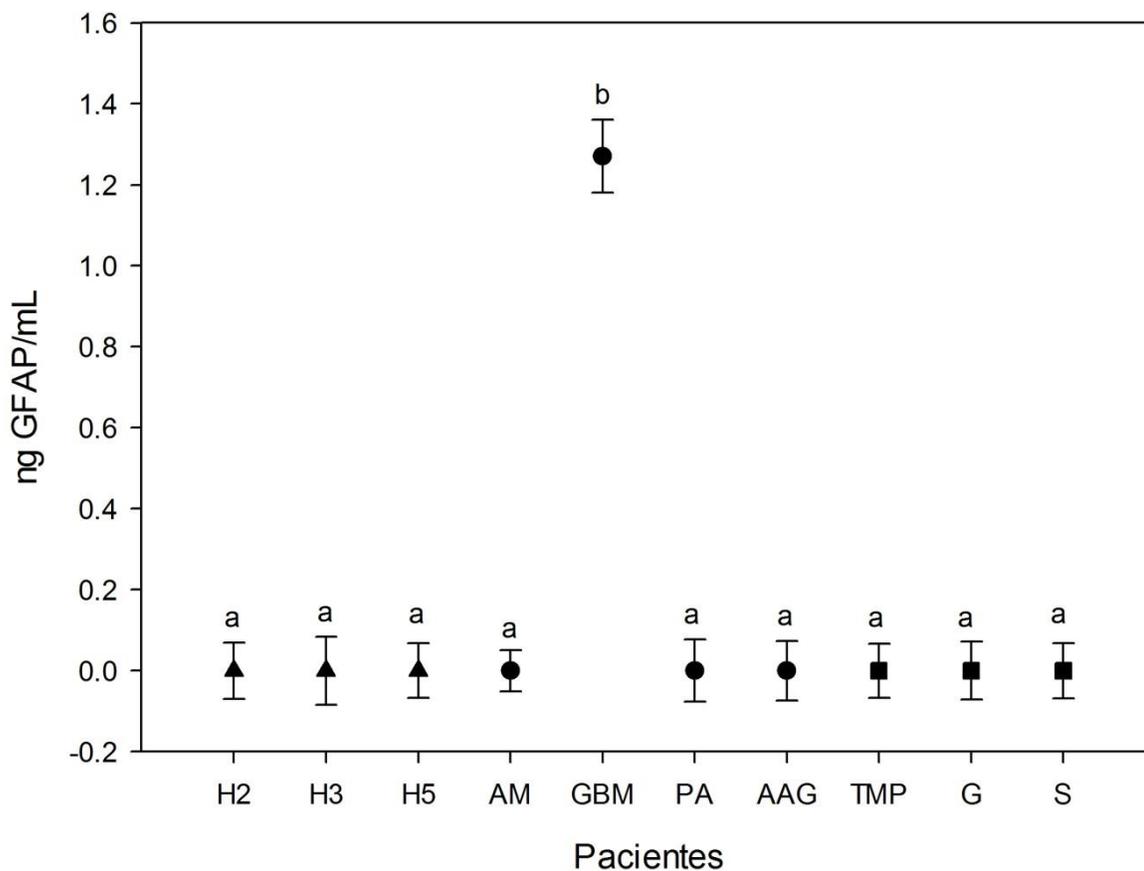


Figura 15. Cuantificación de GFAP sérico determinado por ELISA. Pacientes del grupo “control” (▲), grupo “neuro-oncológico” (●) y grupo “oncológico no relacionado” (■). Los valores obtenidos debajo del LD (0.179 ng/mL) fueron considerados como 0 ng/mL

5.4 Análisis del tejido tumoral

Durante el tiempo que se desarrolló esta tesis, únicamente un paciente donó parte del tumor que le fue extirpado. En la Figura 16 se muestra el patrón de expresión del extracto proteico total del astrocitoma grado III donado y de cerebro de rata, este último utilizado como control debido a la falta de uno de referencia. Se realizó un SDS-PAGE al 10% en el que se cargaron 53 mg/mL de proteína total de extracto, el

gel fue teñido con Comassie y se observó el patrón de bandas. Se observan diferencias en los perfiles de expresión mostrando una mayor cantidad de bandas de proteínas en el cerebro de rata en comparación con el extracto tumoral.

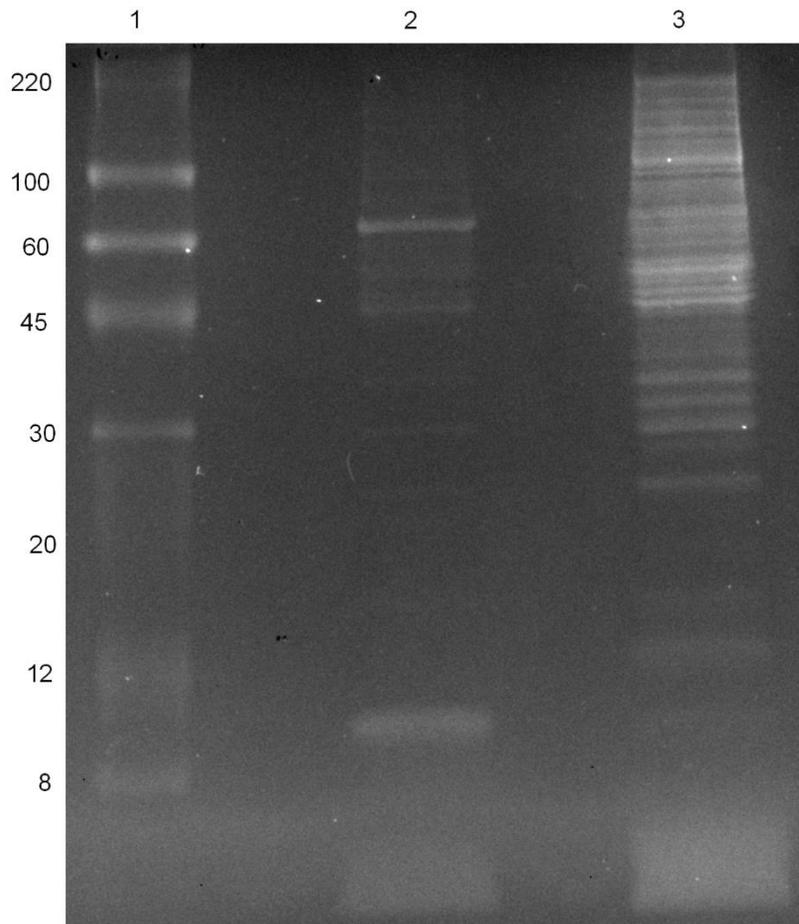


Figura 16. Electroforesis de proteínas del extracto proteico tumoral. En el carril 1 se muestra marcador de peso molecular, los números indican el peso (kDa); en el carril 2 y 3 se observa el patrón de proteínas del extracto tumoral y de cerebro de rata, respectivamente.

5.5 Electroforesis bidimensional

Para un análisis global de la expresión proteica del paciente diagnosticado con AM, se realizó una electroforesis bidimensional del extracto proteico tumoral. En la Figura 17, se muestra el gel obtenido de la electroforesis bidimensional realizada; en él se

observa que la mayor cantidad de proteínas migraron en un pH de 4.5 y entre 50 y 70kDa (flecha).



Figura 17. Electroforesis bidimensional del extracto proteico tumoral del paciente diagnosticado con AM. Flecha: Proteínas.

6. DISCUSIÓN

El aumento en la incidencia de cáncer a nivel mundial ha promovido el desarrollo de ensayos predictivos, diagnósticos y pronósticos para la enfermedad (Strimbu y Tavel, 2010). En este sentido, biomoléculas como proteínas, ácidos nucleicos, anticuerpos o péptidos con capacidad indicadora diferencial en procesos fisiológicos, patológicos y de respuesta farmacológica se han posicionado como posibles biomarcadores (Henry y Hayes, 2012). Además de su capacidad como indicador, la búsqueda de un biomarcador que pueda ser obtenido con mínima invasividad ha provocado que los investigadores centren su atención en los componentes de la sangre periférica, cuyo dinamismo refleja diferencias entre estados celulares y por ende se convierte en el tipo de muestra ideal (Hanash y col., 2008).

En las últimas décadas, algunas biomoléculas presentes en suero como el antígeno prostático específico (PSA), la proteína del aparato mitótico nuclear (NuMA), el antígeno de cáncer 125 (CA-125) y la gonadotropina coriónica humana (hCG) han sido consideradas biomarcadores y utilizadas como herramienta para el diagnóstico de cáncer (Yotsukura y Mamitsuka, 2015). De igual manera, la proteína ácida fibrilar de glía (GFAP) ha sido estudiada como marcador con potencial diagnóstico debido a que se expresa únicamente en células gliales, y cuya presencia en suero es condicionante de estados patológicos.

En el presente estudio se cuantificaron los niveles séricos de GFAP sérico de pacientes mexicanos diagnosticados con distintos tipos de astrocitomas, con el objetivo de valorar el potencial de GFAP como marcador diferencial y confirmar su utilidad diagnóstica específicamente en la población mexicana debido a la diversidad genética entre poblaciones a nivel mundial y a la variabilidad etiológica de la patología.

Al analizar los niveles de GFAP en el suero de los participantes con estados fisiopatológicas diferentes por medio de la técnica de ELISA, se encontró de entre todas las muestras evaluadas únicamente el paciente diagnosticado con tumor glial grado IV (glioblastoma) presentó niveles detectables en suero. Lo anterior

corresponde con lo reportado por Jung y col. en 2007 cuyos hallazgos establecen un 100% de correlación entre la detección de GFAP en suero y pacientes diagnosticados con GBM del departamento de neurocirugía en Frankfurt, Alemania.

Sin embargo, hay otras patologías reportadas en la bibliografía con niveles elevados de en suero, como en pacientes con un fuerte trauma, hemorragia (ICH) e infarto (IC) cerebral (Foerch y col., 2006; Nylén y col., 2006; Honda y col., 2010; Mayer y col., 2013). Dado que no hay similitud sintomática entre una ICH o IC y un tumor cerebral pudimos descartar la posibilidad de falsos positivos. Foerch y col. en 2012 profundizan en el estudio de la utilidad diagnóstica de GFAP como biomarcador diferencial, realizando un ensayo con pacientes que presentaban alguno de los cuadros clínicos de ICH e IC. En dicho trabajo se reporta un aumento significativo en los niveles séricos de GFAP en ICH respecto a los niveles de IC. En este sentido, es importante resaltar que GFAP en suero siempre se ha asociado a estados patológicos debido a su expresión específica de tipo celular, por lo que su presencia en circulación periférica no es justificable si no hay daño cerebral. Sin embargo, reportes publicados por Kiviniemi y col. en 2015 señalan la detección de GFAP en suero como consecuencia de neurocirugía siendo el único caso de GFAP circulante no asociado directamente a patologías clínicas concluyendo que los niveles post-operación en suero de GFAP es debido al trauma cerebral inducido por la cirugía y no por la presencia del tumor.

GFAP es una proteína con un peso molecular de 50 kDa (Sukhorukova y col., 2015), demasiado grande para atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) por lo que para su detección en suero debe presentarse un desarreglo estructural de células astrocíticas ocasionado por un rompimiento mecánico o muerte celular necrótica (Mayer y col., 2013; Ticky y col., 2015).

En las primeras etapas del desarrollo del glioma (Grado I y II), el tumor es sostenido por la propia vasculatura del cerebro, por lo que no hay una disrupción de la BHE. Sin embargo, mientras que glioma progresa aumentando su malignidad y agresividad (Grado III y IV), las células endoteliales que forman parte de la vasculatura cerebral

son separadas de la estructura principal y forman nuevos puntos angiogénicos en el sitio del tumor (Dubois y col., 2014). Lo anterior, aunado al desplazamiento de los pies perivasculares de los astrocitos, y a la alteración en la expresión de las uniones estrechas, genera la desestabilización de la BHE provocando fugas focales permitiendo el paso de moléculas a través de ella como GFAP (Watkins y col., 2014).

De tal forma, la diferencia en la cantidad de GFAP sérica observada entre las muestras de los pacientes diagnosticados con astrocitoma pilocítico (AP) o grado I y glioblastoma (GBM) o grado IV se debe a que en los gliomas de bajo grado la interacción astrocito-célula no se ve alterada por lo que la BHE se encuentra intacta (Nduom y col., 2013) evitando el paso de GFAP a torrente sanguíneo. Por otro lado, una de las características del GBM es la formación de poros en las células endoteliales que forman la BHE (Wolburg y col., 2012) por lo que la detección en suero de una molécula como GFAP es indicativo de un estado fisiológico alterado de la BHE.

En nuestro ensayo, no fue posible detectar niveles séricos de GFAP en los pacientes diagnosticados con astrocitoma maligno y astrocitoma de alto grado, ambos clasificados como grado III. Sin embargo, en ensayos realizados por Ticky y col. en 2015 pacientes diagnosticados con Grado III mostraron niveles de GFAP detectables en suero. Esta discrepancia se puede deber a que clínicamente los tumores son graduados basándose en su morfología y malignidad (Louis y col., 2007). No obstante, molecularmente varían en sus modificaciones genéticas como lo reportan por Yue y col. en 2009 quienes describen cambios moleculares como la sobreexpresión de Ki67 y mutación de p53 asociados a la progresión tumoral de los astrocitomas, aumentando su agresividad y modificando su malignidad. Debido a que el desarrollo del cáncer puede estar asociado a distintas alteraciones en vías de señalización como PI3K-PTEN-mTOR y la vía canónica de MAPK, éstas se verían reflejadas en una variación en la agresividad y malignidad del tumor explicando la detección GFAP en suero en tumores catalogados como Grado III (Dhillon y col., 2007; Yuan y Cantley, 2008).

Por otro lado, la proteómica y la genómica se vislumbran como aproximaciones en la búsqueda de biomarcadores relacionados al cáncer donde en conjunto pueden establecer un diagnóstico preciso y diseñar terapias personalizadas (Sawyers, 2008).

En el campo de la proteómica, la electroforesis bidimensional (2DE) es una técnica que permite el análisis global de proteínas totales a una alta resolución (Rabilloud y col., 2010). El uso de esta técnica puede proveer de información complementaria para una clasificación precisa debido a la detección diferencial de la expresión proteica existente entre muestras (Narayan y col., 1986); razón por la cual fue la técnica empleada para el análisis proteico de la muestra de tejido tumoral donada.

Es muy baja la probabilidad que un glioma sea extirpado quirúrgicamente como alternativa terapéutica razón por la cual en el tiempo destinado para el muestreo de este proyecto únicamente se obtuvo la donación de una muestra limitando en el planteamiento inicial de comparar patrones proteicos de distintos astrocitomas. En este sentido, la comparación entre varios tipos de tumores gliales, clasificados en la misma graduación y con características clínicas similares podría ser el mejor acercamiento para generar una base de datos de las variaciones en la expresión proteica, ya sea el aumento o la inhibición de proteínas específicas.

Se planteó la utilización de cerebro de rata y biopsia de cerebro humano para analizar diferencias de expresión proteicas en las muestras tumorales. Sin embargo, el patrón obtenido de la electroforesis de proteínas mostró diferencias entre el extracto tumoral y de cerebro de rata. Lo anterior, junto con el análisis proteómico realizado por Földi y col. en 2011 donde muestra un patrón representativo de la expresión proteica en una 2DE de cerebro de rata el cuál, comparándolo con aquellos obtenidos por Narayan y col. en 1986 de tumores cerebrales y del presente ensayo se llegó a la conclusión de no ser un sistema de comparación adecuado debido a la diferencia en la distribución de proteínas existente entre ambas especies. De igual forma, aunque la obtención de una biopsia de cerebro humano podría mostrar datos interesantes, las características diferenciales en relación a la proporción glía-neurona de las diferentes regiones del cerebro y las propias condiciones asociadas al tiempo y

recolección de la muestra complican la posibilidad de utilizar este tipo de muestra para comparar los patrones proteicos con los del tumor glial. Por lo tanto, debido a la no idoneidad de las alternativas antes mencionadas, se plantea como perspectiva de este trabajo continuar muestreando biopsias sólidas y realizar el análisis proteómico por 2DE con el objetivo de establecer una comparativa entre tumores del mismo grado, seleccionar proteínas expresadas diferencialmente para realizar un análisis subsecuente con espectroscopía de masas (MS), HPLC-MS y/o MALDI-TOF para elucidar secuencia, estructura y posibles interacciones entre proteínas en el fenotipo tumoral (Banerjee y col., 2012).

7. CONCLUSIONES

En condiciones glio-patológicas es posible detectar GFAP en suero utilizando como herramienta ELISA.

La especificidad de la expresión sérica de GFAP la convierte en un biomarcador con potencial de diagnóstico diferencial entre astrocitomas Grado IV y los demás de menor graduación.

8. REFERENCIAS

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Morgan D, Raff M, Roberts K, Walter P. Molecular biology of the cell. 6th edition. New York: Garland Science, **2015**: 889-962.

Banerjee HN, Mahaffey K, Riddick E, Banerjee A, Bhowmik N, Patra M. Search for diagnostic/prognostic biomarker for the brain cancer glioblastoma multiforme by 2D-DIGE-MS technique. Mol Cell Biochem. **2012**; 367:59-63.

Biswas S, Kushwaha SK, Mandal RS, Roy S, Das HR. Structural model based designing of inhibitors for glial fibrillary acidic protein. Ann Biol Res. **2011**; 2:40.50.

Capper D, Reifenberger G. Klassifikation von gliomen: aktuelle fortschritte und perspektiven. Nervenarzt. **2015**; 6:1-9.

Cheung NKV, Dyer MA. Neuroblastoma: developmental biology, cancer genomics and immunotherapy. Nat Rev Cancer. **2013**; 13:397-411.

Chromy BA, Gonzales AD, Perkins J, Choi MW, Corzett MH, Chang BC, Corzett CH, McCutchen-Maloney SL. Proteomic analysis of human serum by two dimensional differential gel electrophoresis after depletion of high-abundant proteins. J Proteome Res. **2004**; 3:1120-1127.

Demir MK, Hakan T, Akinci O, Berkman Z. Primary cerebellar glioblastoma multiforme. Diagn Interv Radiol. **2005**; 11:83-86.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolch W. MAP kinase signaling pathways in cancer. Oncogene. **2007**; 26:3279-3290.

Doroudchi M, Pische ZG, Malekzadeh M, Golmoghaddam H, Taghipour M, Ghaderi A. Elevated serum IL-17 but no IL-6 in glioma versus meningioma and schwannoma. Asian Pac J Cancer Prev. **2013**; 14:5225-5230.

Faratian D, Bown JL, Smith VA, Langdon SP, Harrison DJ. Cancer systems biology. En: Yan Q. Systems biology in drug discovery and development: methods and protocols. Humana Press, **2010**;245-263.

Dubois LG, Campanati L, Righy C, D'Andrea-Meira I, Leite de Sampaio e Spohr TC, Porto-Carreiro I, Pereira CM, Balca-Silva J, Kahn S, DosSantos MF, Oliveira M, Ximenes-da-Silva A, Lopes MC, Faveret E, Gasparetto EL, Moura-Neto V. Gliomas and the vascular fragility of the blood brain barrier. Front Neurosci, **2014**; 8:1-13.

Fathi A, Roelcke U. Meningioma. *Curr Neurol Neurosci Rep.* **2013.** 13:337-344.

Figarella-Branger D, Colin C, Coulibaly B, Quilichini B, Maues de Paula A, Fernandez C, Bouvier C. Classification histologique et moleculaire des gliomes. *Rev Neurol.* **2008;** 164:505-515.

Foerch C, Curdt I, Yan B, Dvorak F, Hermans M, Berkefeld J, Raabe A, Neumann-Haefelin T, Steinmetz H, Sitzer M. Serum glial fibrillary acidic protein as a biomarker for intracellular haemorrhage in patients with acute stroke. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* **2006;** 77:181-184.

Foerch C, Niessner M, Back T, Bauerle M, De Marchis GM, Ferbert A, Grehl H, Hamann GF, Jacobs A, Kastrup A, Klimpe S, Palm F, Thomalla G, Worthmann H, Sitzer M. Diagnostic accuracy of plasma glial fibrillary acidic protein for differentiating intracerebral hemorrhage and cerebral ischemia in patients with symptoms of acute stroke. *Clin Chem.* **2012;** 58:237-245.

Földi I, Müller G, Penke B, Janáky T. Characterisation of the variation of mouse brain proteome by two-dimensional electrophoresis. *J Proteomics.* **2011;** 74:894-901.

Franks LM. What is cancer? En: Franks LM, Teich NM. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer.* New York: Oxford University Press, **1991:**1-30.

Gallego O. Nonsurgical treatment of recurrent glioblastoma. *Curr Oncol.* **2015;** 22:273-281.

Hambardzumyan D, Gutmann DH, Kettenmann H. The role of microglia and macrophages in glioma maintenance and progression. *Nat Neurosci.* **2016;** 19:20-27.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell.* **2011;** 144:646-674.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* **2000;** 100:57-70.

Hanash SM, Pitteri SJ, Faca VM. Mining the plasma proteome for cancer biomarkers. *NATURE.* **2008;** 452:571-579.

Hashemi F, Naderian M, Kadivar M, Nilipour Y, Gheytnchi E. Expression of the neural markers, NFP and GFAP in malignant astrocitoma. *Asian Pac J Cancer Prev.* **2014;** 15:6315-6319.

Hattingen E, Warmuth-Metz M. MR imaging of brain tumors. En: Hattingen E, Pilatus U. *Brain tumor imaging.* New York. Springer. **2016:**11-53.

Hejmadi M. Introduction to cancer biology. 2nd edition. Bookboon Publisher, **2010**.

Henry LN, Hayes DF. Cancer biomarkers. *Mol Oncol.* **2012**; 6:140-146.

Hilton DA, Shivane AG. Neuropathology simplified: a guide for clinicians and neuroscientist. New York: Springer, **2015**.

Holdhoff M, Yovino SG, Boadu O, Grossman SA. Blood-based biomarkers for malignant gliomas. *J Neurooncol.* **2013**; 113:345-352.

Honda M, Tsuruta R, Kaneko T, Kasaoka S, Yagi T, Todani M, Fujita M, Izumi T, Maekawa T. Serum glial fibrillary acidic protein is a highly specific biomarker for traumatic brain injury in humans compared with S-100B and neuron-specific enolase. *J Trauma.* **2010**; 69:104-109.

Ironside AJ, Ironside JW. Pathology of tumours of the central nervous system. *Surgery.* **2012**; 30:107-115.

Irwin MS, Park JR. Neuroblastoma: paradigm for precision medicine. *Pediatr Clin N Am.* **2015**; 62:225–256.

Jung CS, Foerch C, Schänzer A, Heck A, Plate HK, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M. Serum GFAP is a diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain.* **2007**; 130:3336-3341.

Kiviniemi A, Gardverg M, Frantzén J, Parkkola R, Vuorinen V, Pesola M, Minn H. Serum levels of GFAO and EGFR in primary and recurrent high-grade gliomas: correlation to tumor volume, molecular markers, and progression-free survival. *J Neurooncol.* **2015**:237-245.

Kros JM, Mustafa DM, Dekker LJM, Sillevs-Smitt PAE, Luider TM, Zheng P. Circulating glioma biomarkers. *Neuro-Oncology.* **2015**; 17:343-360.

Lodish H, Berk A, Matsudarai A, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP et al. *Biología celular y molecular.* 5ª edición. Buenos Aires: Médica Panamericana, **2005**.

Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **2007**; 114:97-109.

Mayer CA, Brunkhorst R, Niessner M, Pfeilschifter W, Steinmetz H, Foerch C. Blood levels of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in patients with neurological diseases. *PLOS ONE.* **2013**; 8:1-5.

Middeldorp J, Hol EM. GFAP in health and disease. *Prog Neurobiol.* **2011**; 93:421-443.

Narayan RK, Heydorn WE, Creed GJ, Jacobwitz DM. Protein patterns in various malignant human brain tumors by two-dimensional gel electrophoresis. *Cancer Res.* **1986**; 46:4685-4694.

National Cancer Institute. <http://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms?CdrID=45618> [consultado 2016 mayo 19].

Nduom EK, Yang C, Merrill MJ, Zhuang Z, Lonser RR. Characterization of the blood-brain barrier of metastatic and primary malignant neoplasm. *J Neurosurg.* **2013**; 119:427-433.

Nylén K, Öst M, Csajbok LZ, Nilsson I, Blennow K, Nellgård B, Rosengren L. Increased serum-GFAP in patients with severe traumatic brain injury is related to outcome. *J Neurol Sci.* **2006**; 240:85-91.

Omuro A, DeAngelis LM. Glioblastoma and other malignant gliomas. *JAMA.* **2013**; 310:1842-1850.

Ostrom QT, Glitteman H, Liao P, Rouse C, Chen Y, Dowling J, Wolinsky Y, Kruchko C, Barnholtz-Sloan J. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2007-2011. *Neuro Oncol.* **2014**; 16:1-63.

Petzold A. Glial fibrillary acidic protein is a body fluid biomarker for glial pathology in human disease. *Brain Res.* **2015**; 1600:17-31.

Rabilloud T, Chevallet M, Luche S, Lelong C. Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: past, present and future. *J Proteomics.* **2010**; 73:2064-2077.

Sawyers CL. The cancer biomarker problem. *NATURE.* **2008**; 452:548-552.

Somasundaram K, Nijaguna MB, Kumar DM. Serum proteomics of glioma: methods and applications. *Expert Rev Mol Diagn.* **2009**; 9:695-707.

Sreekanthreddy P, Srivansan H, Kumar DM, Nijaguna MB, Sridevi S, Vrinda M, Arivazhagan A, Balasubramaniam A, Hedge AS, Chandramouli BA, Rao M, Kondaiah P, Somasundaram K. Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: serum osteopontin levels correlate with poor prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* **2010**; 19:1409-1422.

Stark AM, van de Bergh J, Hedderich J, Mehdorn HM, Nabavi A. Glioblastoma: clinical characteristic, prognostic factors and survival in 492 patients. *Clin Neurol Neurosurg.* **2012**; 114:840-845.

Stege EMB, Kros JM, de Bruin HG, Enting RH, van Heuvel I, Looijenga LHJ, van der Rijt CDD, Smitt PAES, van den Bent MJ. Successful treatment of low-grade oligodendroglial tumors with a chemotherapy regimen of procarbazine, lomustine, and vinicristine. *Cancer.* **2005**; 103:802-809.

Strimbu K, Tavel JA. What are biomarkers? *Curr Opin HIV AIDS.* **2010**; 5:463-466.

Sukhorukova EG, Korzhhevskii DE, Alekseeva OS. Glial fibrillary acidic protein: the component of intermediate filaments in the vertebrate brain astrocytes. *J Evol Biochem Phys.* **2015**; 51:1-10.

Ticky J, Spechtmeyer S, Mittelbronn M, Hattingen E, Rieger J, Senft C, Foerch C. Prospective evaluation of serum glial fibrillary acidic protein (GFAP) as a diagnostic marker for glioblastoma. *J Neurooncol.* **2016**; 126: 361-369.

Verkhatsky A, Butt A. *Glial Physiology and Pathophysiology.* 1st edition. John Wiley & Sons, Ltd. **2013.**

Wang JS, Links JM, Groopman JD. Molecular epidemiology and biomarkers. En: Choy WN. *Genetic toxicology and cancer risk assessment.* New York, Marcel Dekker Inc. **2001**:271-297.

Watkins S, Robel S, Kimbrough IF, Robert SM, Ellis-Davies G, Sontheimer H. Disruption of astrocyte-vascular coupling and the blood-brain barrier by invading glioma cells. *Nat Commun.* **2014**; 5:1-15.

Waxman SG. *Neuroanatomía clínica.* 26ª edición. México: McGraw Hill, **2010**: 7-17.

Weinberg RA. *The biology of cancer.* 2nd edition. London. Garland Science. **2014**: 31-70.

Wesseling P, van den Bent M, Perry A. Oligodendroglioma: pathology, molecular mechanism and markers. *Acta Neuropathol.* **2015**; 129:809-827.

Wolburg H, Noell S, Fallier-Becker P, Mack, AF, Wolburg-Buchholz K. The disturbed blood-brain barrier in human glioblastoma. *Mol Aspects Med.* **2012**; 33:579-589.

World Health Organization (WHO). *World Report Cancer 2014,* France, 2014, Lyon. International Agency for Research on Cancer. **2014**

Yotsukura S, Mamitsuka H. Evaluation of serum-based cancer biomarkers: a brief review from a clinical and computational viewpoint. *Crit Rev Oncol Hemat.* **2015**; 93:103-115.

Yuan TL, Cantley LC. PI3K pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene.* **2008**; 27:5497-5510.

Yue W, Yu S, Zhao S, Chen Z. Molecular markers relating to malignant progression in grade II astrocytoma. *J Neurosurg.* **2009**; 110:709-714.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO.

La Universidad Autónoma de Querétaro y el Hospital General de la Ciudad de México. Está llevando a cabo un estudio para evaluar la utilidad diagnóstica de proteínas en suero y saber si existe una correlación con un tipo de tumor cerebral.

En este estudio solicitaremos la participación de distintos grupos de pacientes; Participantes con posibles tumores en el sistema nervioso, participantes con tumores no relacionados con sistema nervios y otros sin ningún tipo de tumor.

Estamos solicitando que nos facilite una muestra de sangre de 5 ml., que se tomará en el mismo momento en que se le programe la cita para la toma de sangre de sus estudios de rutina en el laboratorio.

También deseamos que nos conteste una breve encuesta con algunos datos generales: nombre, edad, sexo, actividad laboral que realiza y que tipo de enfermedad se le ha diagnosticado. Esto con el fin de correlacionar estos datos con los marcadores en sangre que queremos medir. Así mismo le solicitamos su consentimiento en el caso de que fuera candidato del servicio de cirugía, para poder tener una pequeña muestra de tejido extirpado. Usted puede consentir darnos solo la muestra de sangre o solo el tejido o bien, consentir en donar los dos tipos de muestra o ninguna.

En su sangre se realizará un estudio que ayudará a evaluar la presencia y especificidad de proteínas que han sido relacionadas con enfermedades del sistema nervioso central, con la finalidad de poder encontrar nuevas formas diagnósticas menos invasivas y se utilicen como pruebas diagnósticas de rutina. Únicamente se evaluarán tres proteínas en su suero y posteriormente su muestra será destruida. Si usted lo solicita, estos resultados se los podemos proporcionar.

En el caso del tejido, estamos haciendo un análisis más general, en el que evaluaremos la presencia de diferentes de proteínas en distintos tipos y grados de los tumores. Para ello realizaremos una extracción total de las proteínas y lo compararemos con otros tipos de tumor para identificar diferencias y similitudes de las proteínas que se están expresando en su tejido.

Necesitaremos de al menos 5 minutos para la toma de la muestra de sangre y 5 min para contestar la encuesta. No tendrá que tomar ningún medicamento ni tratamiento experimental para someterse a este estudio. Su tratamiento (si fuera el caso) es independiente de este estudio y el único responsable de tal tratamiento es su médico.

En el caso de la muestra de tejido esta será donada solamente si usted lo autoriza. Ya que puede someterse a este procedimiento quirúrgico por recomendación terapéutica de su médico tratante y no querer participar en esta investigación. El

procedimiento quirúrgico es responsabilidad de su médico y su realización es independiente de esta investigación.

Los datos proporcionados en la encuesta, así como los estudios que realizaremos con su(s) muestra se encriptarán, es decir, sus nombres serán sustituidos por un número, de tal forma que solo el responsable del proyecto podrá tener acceso a la correlación entre la muestra del paciente y los datos personales. De esta forma todos los datos serán analizados de forma estadística con un número asignado y los resultados se publicarán como estadística de población. Los resultados de este estudio se darán a conocer en informes oficiales tras un análisis estadístico y NUNCA aparecerá su nombre o se referirá a usted de manera personal.

Usted no obtendrá ningún beneficio directo del estudio por proveernos su(s) muestra(s). Esta(s) es para realizar un estudio que servirá para comprender mejor la utilidad de estas proteínas y su posible utilización diagnóstica para su implementación en un futuro.

A usted no se le pagará por participar en este estudio.

El objetivo de este estudio es encontrar una alternativa diagnóstica que mejore las posibilidades de diagnóstico precoz a pacientes con enfermedades del sistema nervioso.

Usted puede seleccionar libremente y sin ninguna consecuencia el no participar en este proyecto. Es usted libre de tomar su decisión y no está sujeta a la pérdida o condicionamiento como beneficiario en esta institución.

Si usted decide tomar parte en este estudio, podrá retractarse en cualquier momento y por lo tanto eliminaremos de nuestra base de datos toda información que nos haya brindado.

Si usted tiene alguna duda sobre el estudio, contacte a la Dra. Angelina Rodríguez. Responsable de este estudio en la Unidad de Microbiología, en la Universidad Autónoma de Querétaro. Tel. (442) 1921200 ext.65214. Correo electrónico: angelina@uaq.mx.

CARTA CONSENTIMIENTO PARA LA TOMA DE SANGRE Y ENCUESTA.

Estoy de acuerdo en donar una muestra de 5 ml. de sangre para evaluar tres proteínas séricas, de acuerdo al proyecto: **“ANÁLISIS PROTEÓMICO DE BIOMARCADORES TUMORALES EN SUERO Y TEJIDO DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON DISTINTOS GRADOS DE GLIOMAS EN EL SERVICIO DE NEUROLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO: ALTERNATIVA DIAGNÓSTICA “**, cuya responsable es la Dra. Angelina Rodríguez.

Me han dado la oportunidad de preguntar todas mis dudas y éstas han sido respondidas.

He leído el formulario que también me solicitan y estoy enterado de que estos datos se manejarán de forma confidencial.

Tengo una copia de este consentimiento informado

Nombre y Firma del paciente:

Fecha:

Nombre y Firma del testigo

Fecha

Nombre y Firma del responsable del proyecto.

Fecha.

Encuesta.

Nombre: _____

Apellido paterno: _____

Apellido materno: _____

Edad. _____

Sexo: _____

Cuál es su actividad laboral: _____

Patología diagnosticada: _____

CARTA CONSENTIMIENTO PARA LA DONACION DE TEJIDO.

Estoy de acuerdo en donar una muestra de TEJIDO (50-200 microgramos) para evaluar proteínas diferenciales, de acuerdo al proyecto: **“ANÁLISIS PROTEÓMICO DE BIOMARCADORES TUMORALES EN SUERO Y TEJIDO DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON DISTINTOS GRADOS DE GLIOMAS EN EL SERVICIO DE NEUROLOGÍA DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO: ALTERNATIVA DIAGNÓSTICA**“, cuya responsable es la Dra. Angelina Rodríguez.

Me han dado la oportunidad de preguntar todas mis dudas y éstas han sido respondidas.

Tengo una copia de este consentimiento informado

Nombre y Firma del paciente

Fecha

Nombre y Firma del testigo

Fecha

Nombre y Firma del responsable del proyecto.

Fecha.