

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE
OSTEOPONTINA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
GLIOMAS Y SU EVALUACIÓN COMO MARCADOR
PRONÓSTICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA

PAULINA MALAGÓN BAUTISTA

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE
OSTEOPONTINA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON
GLIOMAS Y SU EVALUACIÓN COMO MARCADOR
PRONÓSTICO”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

PAULINA MALAGÓN BAUTISTA

DIRIGIDA POR

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

SINODALES

Dra. ANGELINA RODRÍGUEZ TORRES

DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

M. en C. DAVID GUSTAVO GARCÍA GUTIÉRREZ

SINODAL

Dra. MARICELA LUNA MUÑOZ

SINODAL.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

OFIC-ACAD-16/580

Centro Universitario, 21 de septiembre de 2016.

CONSEJO ACADÉMICO
FACULTAD DE QUÍMICA
P R E S E N T E.

Nos permitimos informar a usted que una vez revisado la Tesis Individual denominada: "**ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN PROTEICA DE OSTEOPONTINA EN PACIENTES DIAGNOSTICADOS CON GLIOMAS Y SU EVALUACIÓN COMO MARCADOR PRONÓSTICO**", presentada por la pasante **PAULINA MALAGÓN BAUTISTA** con opción a recibir el Título de **INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**, de acuerdo al Artículo 95, fracción IX, del Reglamento de Titulación vigente.

Emitimos nuestro voto aprobatorio.

ATENTAMENTE
"EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR"



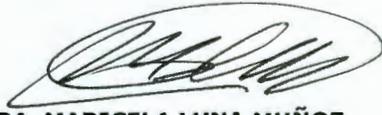
DRA. ANGELINA RODRIGUEZ TORRES



DRA. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA



M. EN C. DAVID GUSTAVO GARCIA GUTIERREZ



DRA. MARICELA LUNA MUÑOZ

c.c.- archivo

Mhv.



Agradecimientos especiales al Hospital General de México, en particular al Dr. Gustavo Aguado del departamento de Neurocirugía. Al laboratorio de Bioquímica de hormonas del Dr. Carlos Arámburo en el 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 compartirme esa gran pasión y amor por la ciencia, por enseñarnos que si decidimos hacer algo siempre debe ser con la mayor entrega, por permitirme ser parte de un proyecto que supera todo y brindarme sus conocimientos para finalizar esta tesis.

A mis sinodales, Dra. Laura Berumen, M. en C. David Gustavo García Gutiérrez y Dra. Maricela Luna Muñoz por aceptar ser parte de mi comité y darme una parte de su tiempo durante el proceso.

A la Dra. Geli Feregrino y Dra. Villagrán, por ser parte de mi historia antes y durante este largo camino, por ser fuente de inspiración y por ser mis guías en la decisión más importante que he tomado ya que dejar Medicina y decidir estudiar Biotecnología no fue nada fácil.

A mis amigos del laboratorio Gabriela Serrano, Adrián Chávez y Edgar Rodríguez, por el apoyo en los momentos de tesis, por los momentos fuera del laboratorio y esas largas discusiones en cualquier lado. ¡Gracias a Mati por hacerme reír siempre!

A mis amigas Gabriela Serrano, Rachel Ocaña, Valeria Caltzontzin, porque me apoyaron y permitieron llegar a mi meta, además de hacer divertido e increíble el camino y por siempre estar ahí.

A mis amigos Claudia Fuentes, Isaac Cuellar, Gonzalo Balderas, Minerva Contreras, Mónica Riverol, Víctor Mendoza, Jorge Aturo Bautista, Gerardo Montoya y Federico Cabrera por brindarme siempre su apoyo y ánimo para seguir adelante.

A mi hermano, Samuel Malagón por ser mi INSPIRACIÓN, por tratar de entenderme y siempre estar al pendiente de mí.

A mis papás, Leticia Bautista y Samuel Malagón, por aguantarme estos 26 años porque a pesar de los tropiezos que he tenido me siguieron apoyando, por sus sacrificios constantes que me permitieron llegar a este punto y por nunca oprimir mi sueño, ser Ingeniero en Biotecnología.

“La ciencia, muchacho, está hecha de errores, pero de errores útiles de cometer, pues poco a poco, conducen a la verdad” Julio Verne.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
PORTADA PRINCIPAL	
PORTADA SINODALES	
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Sistema Nervioso	1
1.2 Glía	2
1.2.1 Células endoteliales	3
1.2.2 Células de Schwann	4
1.2.3 Oligodendrocitos	4
1.2.4 Astrocitos	4
1.3 Gliomas	6
1.4 Biomarcadores	8
1.4.1 Osteopontina	10
2. HIPÓTESIS	15
3. OBJETIVOS	16
3.1 Objetivo general	16
3.2 Objetivos específicos	16
4. METODOLOGÍA	17
4.1 Diseño experimental	17
4.2 Obtención de biopsias líquidas y sólidas	18
4.3 Extracción de proteínas	19
4.4 Cuantificación de proteínas a través del método Bradford	19

4.5 Electroforesis de proteínas	19
4.6 Cuantificación de OPN sérica a partir de ELISA	20
4.7 Electroforesis bidimensional	22
4.7.1 Primera dimensión (punto isoelectrico)	22
4.7.2 Segunda dimensión (peso molecular)	22
4.8 Análisis estadístico	23
5. RESULTADOS	24
5.1 Proteínas totales en biopsias líquidas y sólidas	24
5.1.1 Extracción proteica de biopsia tumoral	24
5.1.2 Cuantificación de proteínas totales en biopsias líquidas y sólidas por el método de Bradford	24
5.2 Análisis de integridad proteica en suero de pacientes	26
5.3 Cuantificación sérica de OPN a través de ELISA	28
5.4 Electroforesis bidimensional de biopsia sólida	30
5.4.1 Análisis de la integridad proteica de biopsia sólida	30
5.4.2 Electroforesis bidimensional de biopsia tumoral	31
6. DISCUSIÓN	32
7. CONCLUSIÓN	37
8. REFERENCIAS	38
ANEXOS	42

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Datos estadísticos de la edad y supervivencia de los pacientes con astrocitomas	7
2	Datos generales de las muestras	18
3	Preparación de geles para SDS-PAGE	20
4	Preparación de curva estándar ELISA OPN humana	21
5	Preparación de la curva de calibración para cuantificación de proteínas	24
6	Concentración sérica de proteína total en pacientes	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Organización anatómica del Sistema Nervioso	1
2	Clasificación de las células gliales	3
3	Célula de Schwann y tipos de oligodendrocitos	4
4	Morfología del astrocito fibroso	5
5	Estructura de OPN	10
6	Isoformas de OPN (tv1, tv2 y tv3)	11
7	Diferentes procesos del cáncer en los que influye la OPN	12
8	Mecanismo molecular de la OPN en el crecimiento tumoral y metástasis a partir de la señalización mediada por integrina $\alpha\beta 3$ y CD44	13
9	Curva estándar representativa para la cuantificación de proteínas por el método Bradford	25
10	Electroforesis de proteínas totales en suero de los pacientes	26
11	Análisis densitométrico del patrón proteico en suero	27
12	Curva estándar representativa del ensayo ELISA de OPN humana	28
13	Concentraciones de OPN en suero de pacientes	29
14	Electroforesis en gel del extracto proteico tumoral	30
15	Gel de electroforesis bidimensional de extracto proteico tumoral del paciente NC5	31

RESUMEN

Los astrocitomas son los tumores de origen glial más recurrentes en cerebro, estos se clasifican de acuerdo a su malignidad en astrocitoma pilocítico (AP; grado I); astrocitoma difuso (AD; grado II), astrocitoma anaplásico (AA; grado III) y glioblastoma (GBM; grado IV), decreciendo su pronóstico conforme aumenta su graduación. Debido a que los tumores con grado I y II presentan signos clínicos muy inespecíficos, los pacientes generalmente son diagnosticados y tratados en los grados III y IV teniendo un pronóstico poco favorable. Para mejorar el tratamiento y la calidad de vida de estos pacientes, ciencias como la proteómica y la metabolómica estudian biomarcadores que pueden indicar con mayor precisión el estado fisiopatológico del individuo, permitiendo establecer un mejor diagnóstico y pronóstico con el objetivo de plantear una terapia más eficaz. La osteopontina (OPN) se ha descrito como un biomarcador con potencial pronóstico en diferentes tipos de tumores, sin embargo, en tumores cerebrales particularmente se ha reportado una estrecha relación entre la expresión en suero de OPN y el potencial de invasividad del GBM. Los datos publicados correlacionan a la proteína como un ligando desencadenante de diferentes procesos celulares como invasividad, metástasis y proliferación, todos indispensables para la progresión tumoral y asociados a un mal pronóstico. Por lo tanto, en este trabajo se evaluó a la OPN sérica en pacientes con graduaciones diferentes de astrocitomas, con la intención de analizar los límites en su detección dependientes de la biología del tumor y su correlación con la clínica, para así proponerla como una herramienta de apoyo en el planteamiento terapéutico de estos pacientes. El hallazgo más relevante en este trabajo fue la detección de mayor concentración de OPN sérica en pacientes diagnosticados con astrocitomas grado III con respecto a grado IV, por lo que OPN podría discriminar entre tumores de menor graduación con un mayor potencial de proliferación y progresión celular, perfilando la OPN como un potente biomarcador pronóstico.

1. ANTECEDENTES

1.1 Sistema Nervioso

El Sistema Nervioso (SN) realiza una gran cantidad de procesos complejos de pensamiento y acciones de control. Cada minuto recibe millones de estímulos que proceden de diferentes nervios y órganos que posteriormente se integrarán para modular las respuestas responsables de controlar las actividades motoras y sensitivas del organismo, las cuales varían desde la contracción muscular de tipo esquelético o liso y la secreción de sustancias a partir de glándulas exocrinas y endocrinas hasta la detección de aromas, colores y alteraciones en la temperatura (Gartner y col., 2008).

Anatómicamente el SN se divide en: Sistema Nervioso Periférico (SNP) y Sistema Nervioso Central (SNC). El SNP incluye nervios craneales y nervios raquídeos mientras que el SNC comprende encéfalo y médula espinal (Figura 1). Unidos conforman un sistema de comunicación integrado por distintos tipos de neuronas y células gliales altamente especializadas (Kandel y col., 2000).

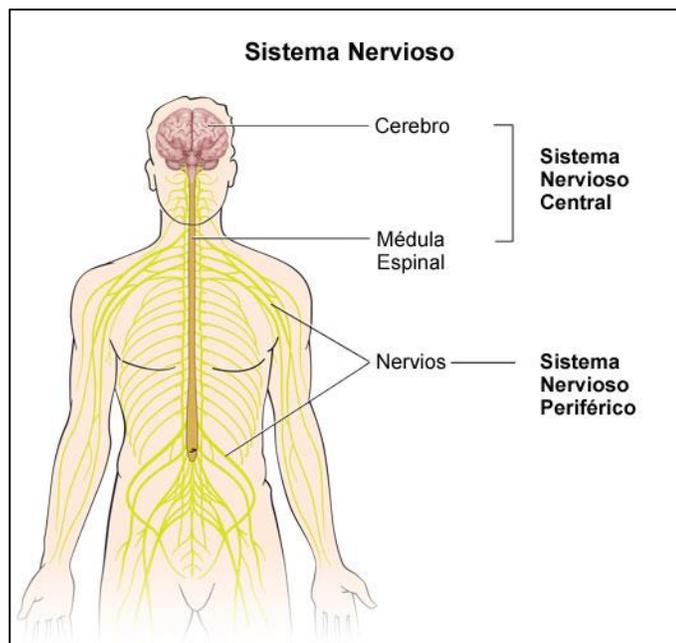


Figura 1. Organización anatómica del Sistema Nervioso (University of Utah Health Care, 2013).

Las funciones de las neuronas son recibir y transmitir impulsos a las diferentes áreas del SN a través de prolongaciones especializadas denominadas dendritas; estas estructuras cuentan con receptores sensibles a dichos impulsos y los propagarán a través del axón mediante el potencial de membrana que al despolarizarse genera un potencial de acción y este inducirá una respuesta que se transmite a otras neuronas u órganos efectores (Kandel y col., 2000; Guyton y Hall, 2009).

Las neuronas se clasifican dependiendo de su morfología, localización o función. Morfológicamente hay tres tipos principales: las bipolares que cuentan con dos prolongaciones a partir del soma, un axón y una dendrita. Las unipolares que poseen una sola prolongación pero ésta se despliega en una rama periférica y otra central. Y las multipolares que muestran varias dendritas que surgen del soma y un axón. También pueden ser catalogadas de acuerdo a su función en: aferentes, quienes reciben impulsos sensoriales en sus terminales dendríticas y los conducen al SNC para su procesamiento; motoras, que surgen del SNC y conducen sus impulsos a músculos y glándulas, por último las interneuronas, que funcionan como integradores al establecer redes nerviosas entre las aferentes, motoras y ellas mismas (Gartner y col., 2008). Las neuronas en coordinación con la glía efectúan funciones de interconectividad manteniendo condiciones homeostáticas, otorgando protección y controlando el microambiente celular para su mejor funcionamiento (Guillamón-Vivancos y col., 2015).

1.2 Glía

El SNC está conformado por 10 veces más células gliales que neuronas. Este conjunto de células aunque forman uniones entre ellas no reaccionan a impulsos nerviosos ni los propagan. En cambio, sus funciones varían desde proporcionar estructura al cerebro, producir mielina y tener actividad inmunológica hasta participar en el desarrollo axónico, la migración neuronal y la producción de algunos factores de crecimiento (Kandel y col., 2000).

En la Figura 2 se presenta la clasificación de la glía de acuerdo a su tamaño, función y origen. La microglía pertenece al sistema fagocítico mononuclear. Estas células se

encargan de eliminar las estructuras dañadas del SNC y protegerlo de virus y otros agentes patógenos (Gartner y col., 2008). La macroglía se clasifica de acuerdo a su función en: células endoteliales que producen y secretan líquido cefalorraquídeo (LCR); células de Schwann (SNP) y oligodendrocitos (SNC), encargadas de producir mielina; y los astrocitos que forman redes de sostén y actúan como una barrera semipermeable entre la neurona y la sangre (Hilton y Shivane, 2015).

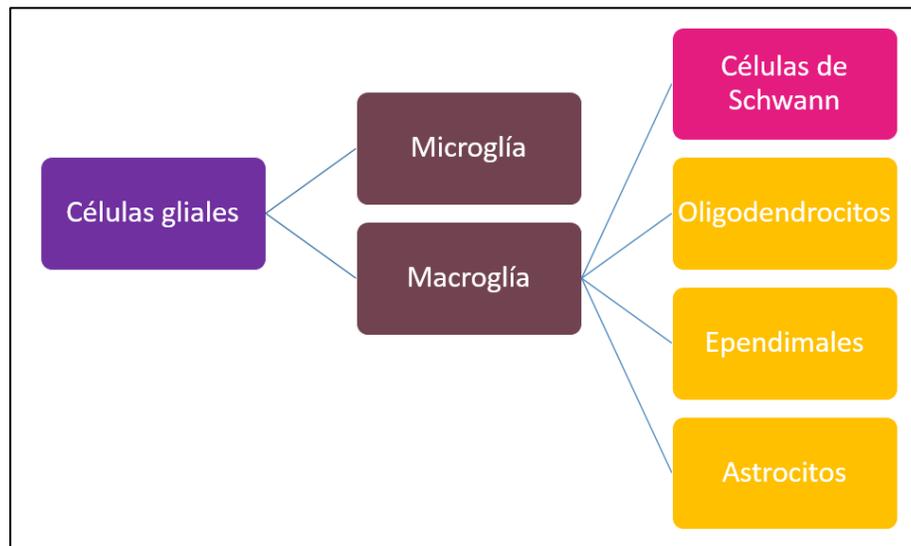


Figura 2. Clasificación de células gliales.

1.2.1 Células endoteliales

Sus características morfológicas y funcionales se relacionan con el transporte de fluidos. En distintas zonas de los ventrículos del cerebro las células endoteliales se modifican para formar el plexo coroideo que secreta el LCR. En particular los tanicitos, un tipo de células endoteliales, envían prolongaciones que tienen la función de transportar y recibir LCR entre las neuronas secretoras y los vasos sanguíneos del hipotálamo (Gartner y col., 2008).

1.2.2. Células de Schwann

Las células de Schwann interactúan con los axones de las neuronas en el SNP por medio de múltiples interconexiones funcionales y bioquímicas. Cuando la membrana de las células de Schwann comienza a envolver el axón, se establece el inicio de la

producción de mielina hasta terminar con un recubrimiento de más de 50 vueltas. Externamente las células de Schwann se encuentran protegidas por una lámina basal como se representa en la Figura 3A, esta estimulará la regeneración de los nervios periféricos en caso de daño (Gartner y col., 2008).

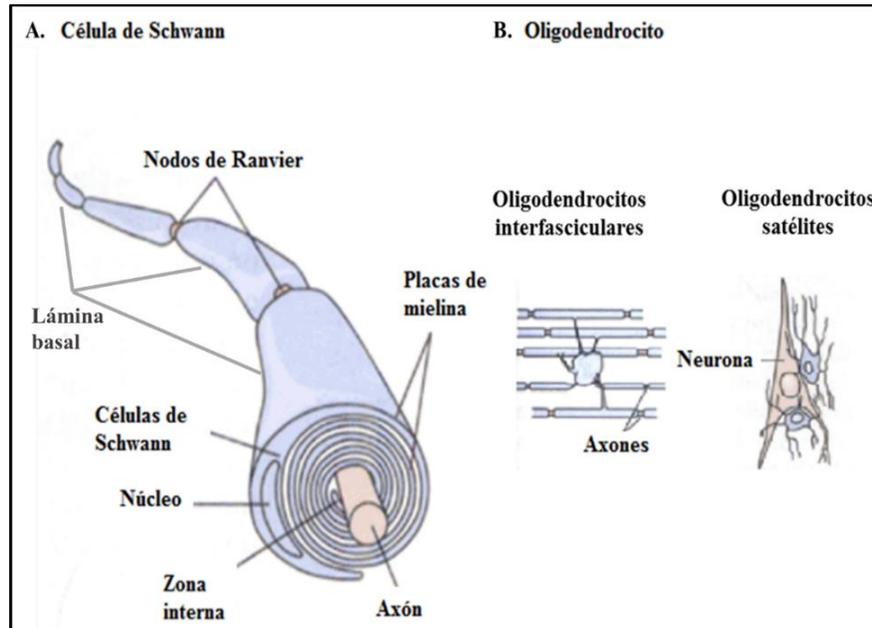


Figura 3. Célula de Schwann (A) y tipos de oligodendrocitos (B) (Modificado: Kandel y col., 2000).

1.2.3 Oligodendrocitos

En la Figura 3B se representan los dos tipos celulares en que se dividen los oligodendrocitos de acuerdo a su función, en interfasciculares y satélites. Los primeros se encargan de la producción y conservación de la mielina que se encuentra alrededor de los axones neuronales del SNC. Y los satélites se asocian fuertemente a los somas manteniendo un ambiente físico-químico controlado (Gartner y col., 2008).

1.2.4 Astrocitos

Los astrocitos proporcionan apoyo estructural y metabólico a las neuronas. Actúan como moduladores en la liberación de iones y neurotransmisores al espacio

extracelular y se dividen en protoplásmicos y fibrosos (Figura 4). Los protoplásmicos se encuentran en la sustancia gris y los fibrosos en la sustancia blanca (Kandel y col., 2000).

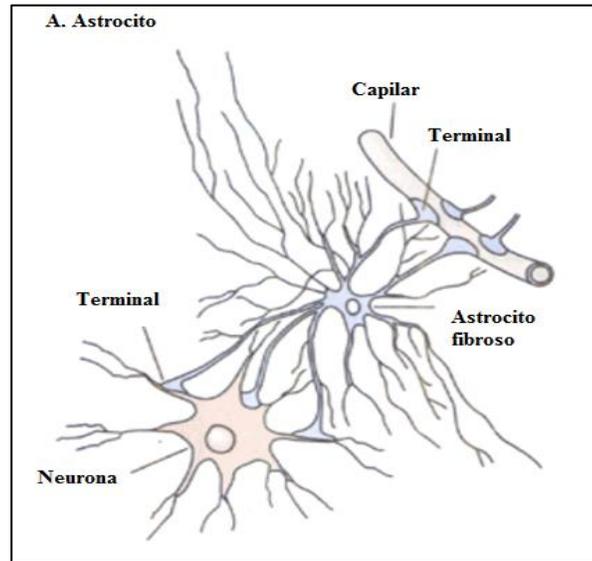


Figura 4. Morfología del astrocito fibroso (Modificado: Kandel y col., 2000).

Los astrocitos protoplásmicos tienen muchas prolongaciones y ramificaciones cortas, las cuales terminan como pedicelos, también conocidos como pies vasculares los cuales tienen contacto con los vasos sanguíneos. Otros tienen contactos con la piamadre y forman la membrana piamadre-glial (Gartner y col., 2008).

Los astrocitos fibrosos tienen prolongaciones largas sin ramificaciones y están en estrecho contacto con la piamadre y los vasos sanguíneos, sin embargo se encuentran separados de estas estructuras por su lámina basal (Kandel y col., 2000). Particularmente los que se encuentran en la periferia del SNC forman una capa continua sobre los vasos sanguíneos y nutren la barrera hematoencefálica, además de reunir el tejido cicatrizal celular a las áreas dañadas del SNC (Gartner y col., 2008).

Tomando en cuenta la gran importancia de las células gliales en procesos fisiológicos de mielinización, soporte estructural y metabólico, cuando alguna de ellas sufre acumulación de modificaciones genéticas, se transforma, comenzando a proliferar

sin restricción dando paso a un proceso microevolutivo tumoral provocando la pérdida de las funciones basales de la célula glial (Alberts y col., 2010). Los tumores según su capacidad metastásica pueden ser benignos o malignos. Los tumores benignos se caracterizan por encontrarse delimitados por una cápsula fibrosa, su crecimiento es lento y no son invasivos. En cambio, los tumores malignos raramente se encuentran encapsulados, presentan un crecimiento rápido y las células sufren importantes modificaciones morfológicas y fisiológicas que le permiten invadir otros tejidos (Talmadge y Fidler, 2010).

1.3 Gliomas

Los tumores cerebrales de origen glial son conocidos como gliomas, estos se caracterizan por un incremento en su actividad mitótica que promueve la progresión tumoral induciendo vascularización. Son considerados tumores malignos debido a su gran capacidad de invasión a otras áreas del cerebro y crecimiento rápido (Kros y col., 2015).

Entre los diferentes gliomas que se han descrito se encuentran el ependimoma, meduloblastoma, meningioma, oligodendroglioma y astrocitoma, este último, es el tumor cerebral más frecuente y representa más de la mitad de todos los tumores cerebrales primarios. Su incidencia anual se estima en 1 de cada 12 500 pacientes con casos de glioma maligno a nivel mundial. El sello distintivo de los astrocitomas, es la capacidad de invadir difusamente el tejido cerebral y no poseer un borde definido por lo que la extirpación quirúrgica es complicada (Somasundaram y col., 2009; Holdhoff y col., 2013). La invasión local incrementa y representa uno de los factores determinantes más importantes del pronóstico poco favorable asociado a tumores de alto grado. (Talmadge y Fidler, 2010).

El criterio de clasificación de los astrocitomas definido por la OMS se basa en su origen celular, agresividad, malignidad y morfología. De acuerdo a la OMS el sistema de clasificación comprende del Grado I al IV, integrado de la siguiente forma: astrocitoma pilocítico (AP; grado I); astrocitoma difuso (AD; grado II), astrocitoma anaplásico (AA; grado III) y glioblastoma (GBM; grado IV) (Sreekanthreddy y col.,

2010; Jhanwar-Uniyal y col., 2015). En el Cuadro 1 se presenta la edad promedio en la que se presentan con mayor frecuencia los tipos de astrocitomas y la expectativa de vida (WHO, 2014).

Cuadro 1. Datos estadísticos de la edad y supervivencia de los pacientes con astrocitomas (Modificado: WHO, 2014).

TUMOR	EDAD (AÑOS)	SUPERVIVENCIA 5 AÑOS
ASTROCITOMA PILOCÍTICO (GRADO I)	< 20	> 85%
ASTROCITOMA DIFUSO (GRADO II)	20-45	> 60%
ASTROCITOMA ANÁPLASICO (GRADO III)	~45	> 30%
GLIOBLASTOMA (GRADO IV)	~60	< 3%

El AP muestra crecimiento lento, muy rara vez progresa a tumor maligno y tiene una esperanza de vida mayor a 5 años. Son comunes en niños y adultos jóvenes. Se localiza preferentemente en el nervio óptico, quiasma óptico, hipotálamo y cerebelo. Histológicamente se caracterizan por tener células bipolares que forman áreas microquísticas, fibras de Rosenthal (acumulaciones de material hialino) y proliferación vascular (Hilton y Shivane, 2015).

Los AD pueden ocurrir en cualquier parte del SNC, la mayoría son de crecimiento lento. El promedio de supervivencia es de alrededor de 4 años y en aproximadamente la mitad de los casos, estos tumores se transforman a tumores de alto grado (III y IV), histológicamente muestran ausencia de mitosis. Los AD (II) y AA (III) son conocidos por su difusión ya que estos tumores tienden a infiltrarse, por lo que no puede ser completamente extirpado quirúrgicamente. Los AA muestran aumento en la proliferación y anaplasia e histológicamente a diferencia de los AD presentan una mayor actividad mitótica, su supervivencia media es aproximadamente de 3 a 2 años (Hilton y Shivane, 2015).

Los GBM se caracterizan por una desmesurada capacidad infiltrante y resistencia a quimioterapia (Ramírez y col., 2013). Histológicamente son células astrocíticas con grandes núcleos irregulares, áreas de necrosis y proliferación vascular (Sreekanthreddy y col., 2011). Los GBM se presentan *de novo*, más comúnmente en pacientes mayores de 60 años. Sin embargo, hay casos donde los GBM se derivan de AD y AA, estos son prevalentes en pacientes entre los 15-40 años. En este caso presentan bajos grados de necrosis (Hashemi y col., 2014; Gallego, 2015). El GBM tiene la peor expectativa de vida, donde la mayoría de los pacientes mueren en menos de 12 meses (WHO, 2007), aún realizando extirpación quirúrgica o implementando radioterapia y quimioterapia (Sreekanthreddy y col., 2010).

Algunos criterios que ayudan a diagnosticar los gliomas son la edad del paciente, el estado funcional neurológico, localización del tumor e imagenología por resonancia magnética nuclear (IRM) (Omuro y DeAngelis, 2013). Sin embargo, otra opción es usar herramientas moleculares que nos permitan identificar alteraciones en la proliferación, migración e invasión celular, a través de biomarcadores con el propósito de conocer el tipo de alteración molecular que le ha dado origen al fenotipo tumoral que presenta el paciente y en este sentido establecer con mayor precisión su pronóstico para que el médico le pueda proponer un tratamiento más eficaz (Hayes y col., 2015).

1.4 Biomarcadores

Los biomarcadores son indicadores de alteraciones fisiológicas, celulares, sub-celulares y moleculares en el desarrollo de enfermedades (Wang y col., 2001). Son de gran valor en el diagnóstico y pronóstico de múltiples patologías, además de ser una herramienta útil en el seguimiento al tratamiento de los pacientes con cáncer (Jung y col., 2007; Hashemi y col., 2014).

Durante las últimas décadas se han realizado estudios para identificar biomarcadores que apoyen en el pronóstico de gliomas evaluando la malignidad y capacidad de progresión del tumor; estos podrían medirse en las diferentes biopsias, sólidas ó líquidas (suero, plasma o LCR). Algunos ejemplos de estos biomarcadores son: las

glicoproteínas presentes en las células endoteliales A2B5 y el receptor CD133 que han demostrado estar relacionadas a la progresión de GBM (Ramírez y col., 2013), el receptor CD44 implicado en la adhesión a las células endoteliales a la matriz extracelular en los astrocitomas (Abbas y col., 2012). También la molécula de adhesión, L1CAM que es necesaria para el crecimiento y supervivencia del GBM (Jhanwar-Uniyal y col., 2015).

Otros biomarcadores directamente relacionados con el desarrollo de gliomas son: los exosomas (microvesículas o vesículas extracelulares) presentes en LCR, espacio extracelular y sangre, cuyo contenido molecular incluye proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, metabolitos y otras moléculas las cuales pueden evidenciar anomalías funcionales. Algunos exosomas presentes en fluidos cerebrales contienen moléculas relacionadas con patrones de expresión alterados que promueven la formación de gliomas como son el EGFR, podoplanina (PDPN) y 12 miR-21. Por lo que, podría aportar información sobre la presencia de antígenos tumorales. Del mismo modo, se está planeado la utilización de exosomas como inmunoterapia sin embargo debido a que es una rama de investigación reciente aun no es segura su aplicación (Kros y col, 2015).

Existen varios biomarcadores asociados a diferentes procesos celulares que promueven el cáncer, sin embargo, pocos han sido asociados tan estrechamente como las integrinas. Estas glicoproteínas participan en la unión de las células con la matriz extracelular. Son heterodímeros α - β que se unen de forma no covalente a la secuencia Arg-Gly-Asp (RGD) presente en muchas proteínas de la matriz extracelular como fibronectina, laminina, colágeno y la osteopontina (OPN) (Matusan-Ilijas y col., 2008; Zhao y col., 2015). Las integrinas activan las rutas metabólicas de la quinasa de adhesión focal (FAK), fosfoinositol 3-quinasa (PI3K), proteína quinasa B (Akt), quinasa reguladora extracelular (ERK) y la del factor nuclear kappa B (NF- κ B) (Fok y col., 2013).

Aunque se ha avanzado en el conocimiento de las cascadas de señalización que se activan por biomarcadores y los procesos celulares que esta transducción de señal

altera, la complejidad de las mismas y la variabilidad asociada al tiempo y estabilidad del estímulo o a la propia concentración del ligando, hace que un solo biomarcador sea insuficiente y poco específico como herramienta diagnóstica o pronóstica en los gliomas. Por lo tanto, la tendencia actual es la interpretación conjunta sobre la expresión diferencial de estas moléculas en los tejidos diana con el objetivo de visualizar de una forma más amplia el desarrollo de las patologías (Somasundaram y col., 2009; Erpolat y col., 2013).

1.4.1 Osteopontina

Algunas proteínas presentes en determinados fluidos como el suero, sirven como biomarcadores cancerígenos debido a que el aumento de su concentración se ha relacionado a la progresión y metástasis tumoral. Tal es el caso de la osteopontina (OPN) la cual se ha asociado con la progresión de tumores clasificados como alto grado (Weber y col., 2010; Kros y col., 2015). La OPN es una glicofosfoproteína presente en la matriz extracelular, con un peso molecular de 41 a 75 kDa, también es conocida como fosfoproteína secretada 1 (Spp1), 2ar, uropontina y como *early T-lymphocyte activation* (Eta-1) (Wai y Kuo, 2004; Gimba y Tilli, 2013).

Pertenece a la familia de las SIBLING (*small integrin-binding ligand N-linked glycoprotein*) que se caracterizan por contar con una secuencia RGD (Figura 5) la cual es reconocida por las integrinas permitiendo la activación de diferentes procesos que influyen en la adhesión entre células a la matriz extracelular (Screekanthreddy y col., 2010; Lamour y col., 2015).

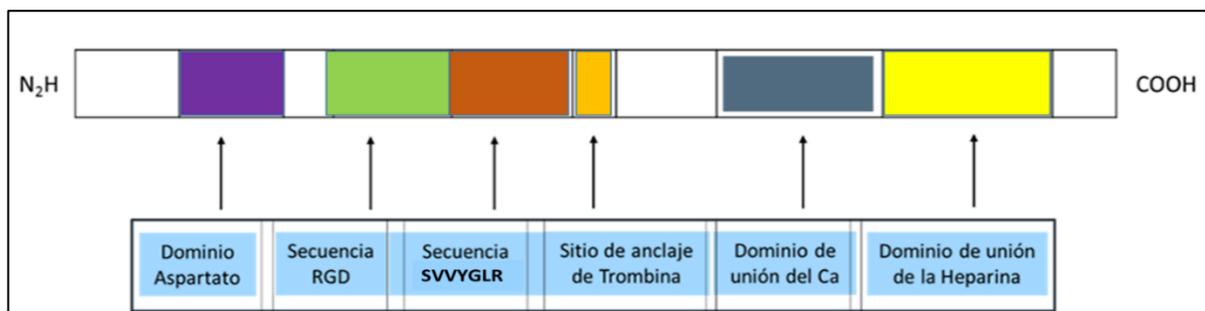


Figura 5. Estructura de OPN. Indicando dominios estructurales (Modificado: Wai y Kuo, 2008).

La OPN está formada por 7 exones y cuenta con tres isoformas, la OPNtv1, OPNtv2 y la OPNtv3 como se muestra en la Figura 6, los cuales presentan algunas variaciones estructurales. Por ejemplo, la OPN tv1 es la isoforma completa, la OPN tv2 carece del exón 5 y en la OPN tv3 se escindió el exón 4. Se ha demostrado que la actividad OPN tv1 o tv3 como ligando induce la invasión celular mediada por la vía NF- κ B / PI3K / Akt, a través de la interacción ligando-receptor con la integrina $\alpha\beta$ 3 (Gimba y Tilli, 2013).

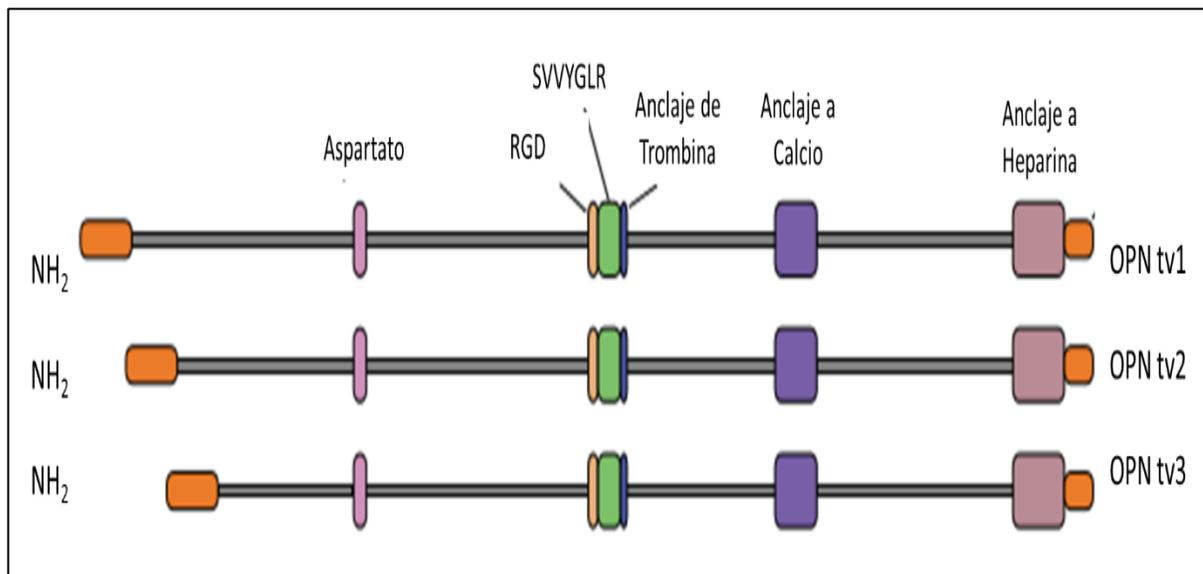


Figura 6. Isoformas de OPN (tv1, tv2 y tv3). Especificando los diferentes dominios estructurales de cada una de ellas (Modificado: Cao y col., 2012).

Se ha reportado una gran cantidad de sitios de fosforilación en las distintas isoformas de la OPN (Gimba y Tilli, 2013), estas modificaciones postraduccionales provocan una regulación funcional diferente entre ellas, causada por la quinasa efectora, de tal manera que las interacciones de OPN con receptores como la integrina $\alpha\beta$ 3 y el CD44 pueden modular distintas cascadas de señalización que promueven procesos como la proliferación, inhibición de apoptosis, supervivencia, crecimiento tumoral, evasión del sistema inmune, angiogénesis y motilidad (Figura 7).

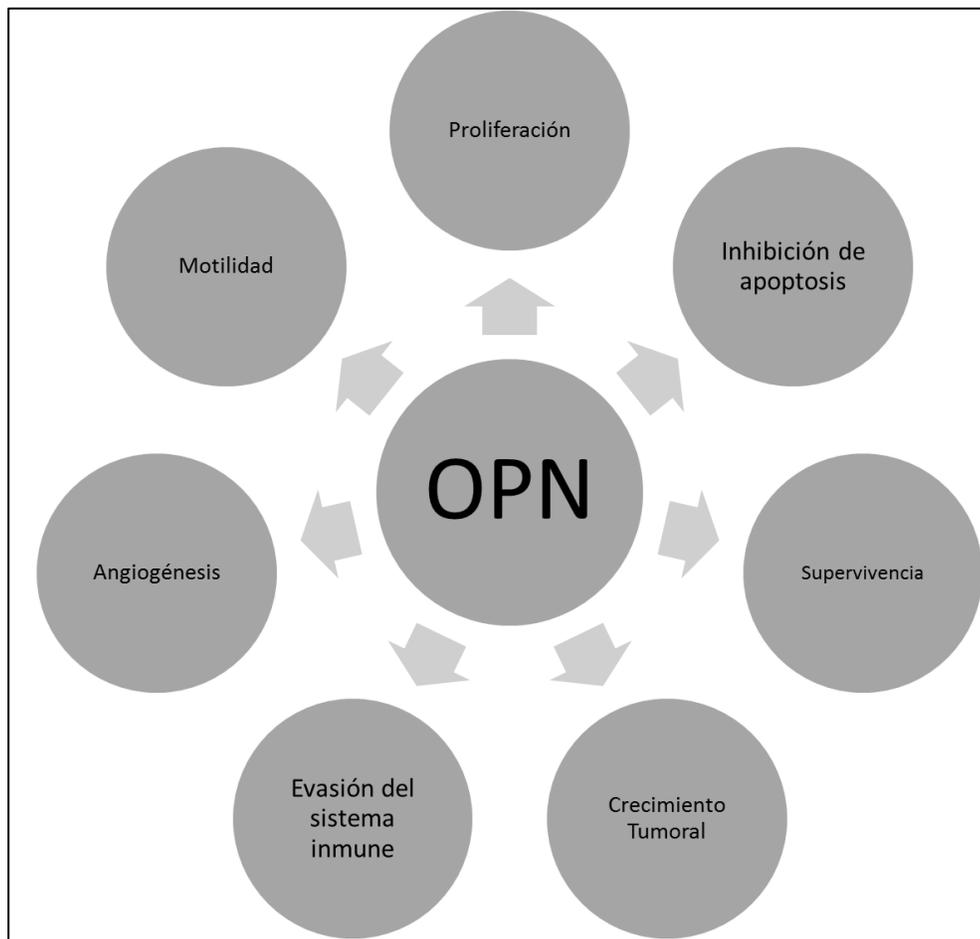


Figura 7. Diferentes procesos del cáncer en los que influye la OPN.

La expresión *in vivo* e *in vitro* por células de estirpe de astrocitoma maligno de $\alpha v\beta 3$ y $\alpha v\beta 5$ se ha reportado y también el reconocimiento de las integrinas $\alpha v\beta 1$, $\alpha v\beta 3$, $\alpha v\beta 5$, $\alpha 4\beta 1$, $\alpha 5\beta 1$, $\alpha 8\beta 1$ y $\alpha 9\beta 1$ participando la OPN como ligando y siendo dependiente al tipo celular glial. Por otro lado, se reportó la interacción de las integrinas a diferentes dominios estructurales de la OPN, entre ellas las $\alpha 4\beta 1$ y $\alpha 9\beta 1$ a la secuencia SVVYGLR y la integrina $\alpha v\beta 3$ a la secuencia RGD (Ding y col., 2002). Al igual el receptor transmembranal CD44, glicoproteína implicada en las interacciones célula-célula, la adhesión celular a la matriz y la migración, ha demostrado la asociación ligando-receptor de OPN con CD44, la cual tiene un efecto sobre la proliferación celular, evasión de la apoptosis y progresión tumoral por la vía PI3K / Akt (Qiu y col., 2014).

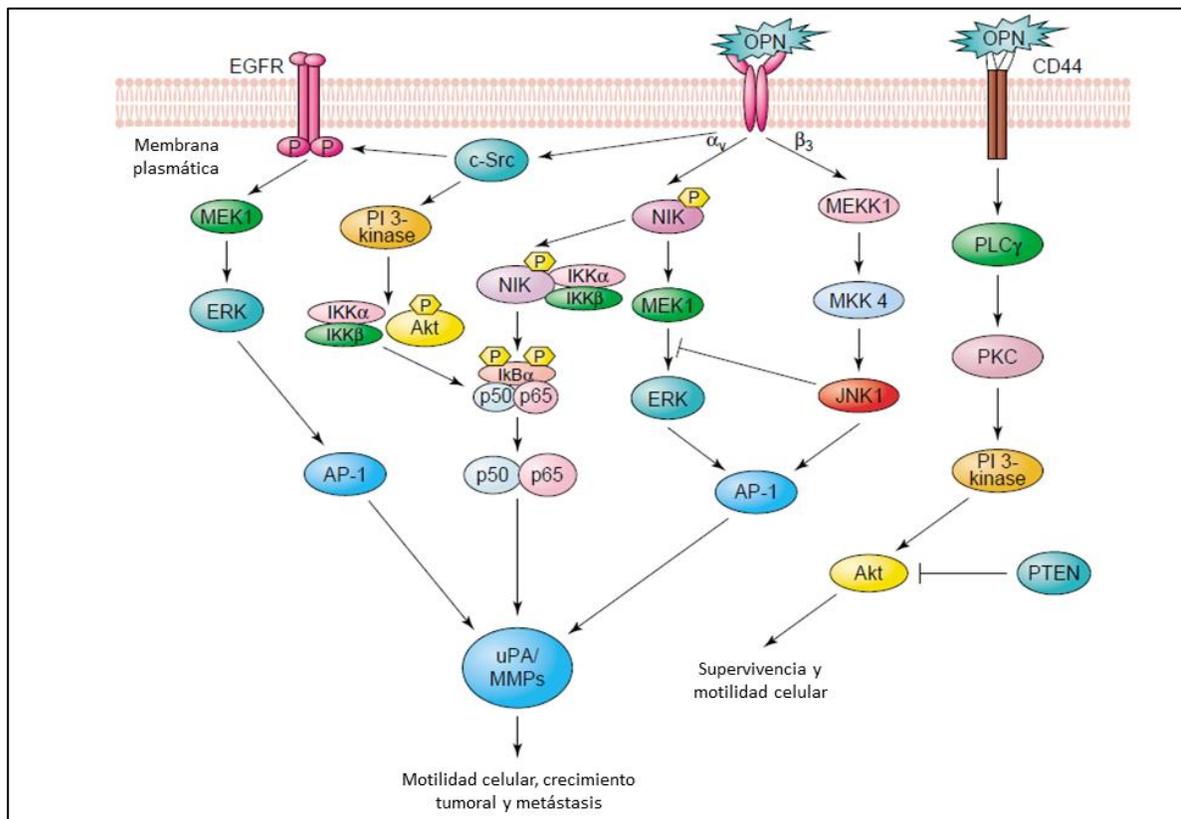


Figura 8. Mecanismo molecular de la OPN en el crecimiento tumoral y metástasis a partir de la señalización mediada por integrina $\alpha\beta_3$ y CD44 (Modificado: Rangaswami y col., 2006).

En la Figura 8 se observa como contribuye la unión $\alpha\beta_3$ -OPN en la actividad de las metaloproteasas (MMP) a través de la transactivación del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGFR) activado por c-Src o a partir de la quinasa de inducción nuclear (NIK), induciendo la transducción de señales de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK), la cual promueve la proliferación, división y diferenciación celular (Wai y Kuo, 2008).

A su vez NIK y c-Src promueven la activación del factor NF- κ B el cual controla la transcripción de genes como lo son los miembros de la familia Rel (c-Rel y I κ B), la producción de citoquinas y la supervivencia celular (Figura 8) (Rangaswami y col., 2006).

Por otro lado, la unión OPN-CD44 activa Akt por medio de la fosfolipasa C- γ (PLC- γ) lo que promueve la progresión, migración celular, el crecimiento tumoral y la evasión de apoptosis (Figura 8) (Rangaswami y col., 2006; Qiu, y col., 2014).

Por lo tanto, las interacciones de OPN con sus diferentes receptores desencadenan procesos celulares asociados a progresión tumoral convirtiendo a la OPN en un excelente candidato como biomarcador pronóstico proporcionando una herramienta que apoye a los diversos criterios que otorgan un diagnóstico con el objetivo de mejorar planteamiento terapéutico (Rangaswami y col., 2006).

2. HIPÓTESIS

La correlación entre los niveles séricos de OPN y los datos clínicos de pacientes con tumores gliales son un indicador pronóstico de aumento en la capacidad invasiva del tumor.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Correlacionar los niveles séricos de OPN con el diagnóstico y pronóstico clínico de pacientes con distintos grados de gliomas.

3.2 Objetivos Específicos

- Obtener biopsias líquidas y sólidas de pacientes diagnosticados con distintos tipos de gliomas.
- Evaluar niveles séricos de OPN en pacientes diagnosticados con diferentes tumores a través de ELISA.
- Analizar el patrón de expresión proteico de biopsias sólidas de gliomas.
- Analizar la relación entre los niveles séricos con el diagnóstico y pronóstico establecidos clínicamente.

4. METODOLOGÍA

4.1 Diseño experimental

Las muestras utilizadas en este proyecto fueron donadas por participantes que cumplieron los siguientes criterios generales de inclusión: sexo indistinto, tener la mayoría de edad (18 años) y haber firmado el consentimiento informado.

Las muestras fueron clasificadas en tres grupos de acuerdo a las siguientes características: grupo de individuos con ausencia de patología tumoral o control, grupo de pacientes diagnosticados con tumores no gliales u Oncológico y por último el grupo de pacientes diagnosticados con tumores gliales o Neuro-oncológico. El número de participantes se delimitó por aquellos usuarios que aceptaron participar en el protocolo, con características del grupo neuro-oncológico, usuarios del Depto. de Neuro-oncología, ajustando el número de pacientes de los grupos control y oncológico, seleccionados entre octubre 2015 - abril 2016. Los participantes del grupo oncológico y neuro-oncológico son usuarios de los Depto. de Neuro-oncología y Oncología del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” (HGM) y los pacientes del grupo control fueron voluntarios en la Unidad de Análisis Clínicos de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. Fue motivo de exclusión no cumplir con cualquiera de los criterios antes mencionados. En el Cuadro 2 se presenta la base de datos realizada con la información de cada grupo, incluyendo el código asignado, diagnóstico y tipo de biopsia obtenida.

La toma de muestra se realizó en las instituciones correspondientes a cada participante, por personal capacitado, quienes previamente les informaron el objetivo del proyecto y discutieron el consentimiento informado. Los pacientes que decidieron participar firmaron el documento de consentimiento informado.

El protocolo y consentimiento informado fueron evaluados por el Comité de Bioética y de Investigación del Hospital General de México “Dr. Eduardo Liceaga” y por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Querétaro. El consentimiento informado se elaboró de acuerdo a las

recomendaciones de la Declaración de Helsinki y las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en Seres Humanos de la CIOMS (Texto en Anexos)

Cuadro 2. Datos generales de las muestras. Número de paciente, código, grupo, diagnóstico y tipo de biopsia obtenida.

Paciente	Código	Grupo	Diagnóstico	Muestra
1	142	Control	APT	Suero
2	143	Control	APT	Suero
3	144	Control	APT	Suero
4	145	Control	APT	Suero
5	146	Control	APT	Suero
6	ONC1	Oncológico	Cáncer cérvico úterino	Suero
7	ONC2	Oncológico	Mieloma	Suero
8	ONC3	Oncológico	Tumor mixto pulmonar	Suero
9	ONC4	Oncológico	Cáncer gástrico	Suero
10	ONC5	Oncológico	Sarcoma	Suero
11	NC1	Neuro- oncológico	Astrocitoma maligno	Suero
12	NC2	Neuro- oncológico	Glioblastoma	Suero
13	NC3	Neuro- oncológico	Astrocitoma pilocítico	Suero
14	NC4	Neuro- oncológico	Shwanoma	Suero
15	NC5	Neuro- oncológico	Astrocitoma de alto grado	Suero/Biopsia

* Ausencia de patología tumoral (APT)

4.2 Obtención de biopsias líquidas y sólidas

Los sueros fueron obtenidos a partir de sangre completa. El paciente se presentó en ayuno de 8 horas antes de la recolección de la muestra. Se extrajeron 5 mL de sangre periférica por medio de punción venosa. Se separó el suero del paquete celular sanguíneo, después de la formación del coágulo, centrifugando a 3500 rpm por 5 minutos. Se recolectó el suero, posteriormente alícuotó y almacenó la muestra sérica a -70°C.

En caso del tejido tumoral, únicamente a participantes que se someterían a una extirpación quirúrgica como parte de su tratamiento, se les solicitó la donación de una tercera parte de la biopsia extraída para la realización de este estudio. La muestra obtenida fue almacenada a -70°C para su posterior procesamiento.

4.3 Extracción de proteínas

Una vez obtenido el tumor sólido, se pesó y se le agregó el amortiguador Tris-HCl 50mM, pH 9.0-9.5 con 1.2X de inhibidores de proteasas (Sigma-Aldrich cat. 11836153001) a una proporción de 5 mL por cada gramo de muestra para posteriormente ser homogeneizado en hielo por 2 horas en agitación constante con vortex. Enseguida se centrifugó a 10,000 rpm durante 15 minutos a 4°C . Finalmente el sobrenadante fue recolectado, alicuotado y almacenado a -70°C .

4.4 Cuantificación de proteínas a través del método Bradford

La cuantificación de la concentración de proteínas totales se realizó utilizando el método Bradford. Se preparó una curva estándar de 4 diluciones en un rango de concentraciones de 0 a 1.4 mg/mL utilizando como proteína estándar albumina de suero bovino (BSA) de una concentración de 2 mg/mL (Sigma-Aldrich, B6916) con base a las especificaciones recomendadas por la casa comercial. Se realizó por duplicado la cuantificación proteica tanto de la curva estándar como de las muestras problemas. En cada reacción se utilizaron 5 μL de los estándares o del extracto proteico (biopsia tumoral o suero) y se adicionó 250 μL del reactivo Bradford, se dejó incubar por 5 minutos a temperatura ambiente para posteriormente medir su absorbancia a 595 nm en un espectrofotómetro.

4.5 Electroforesis de proteínas

Para la electroforesis de proteínas se prepararon geles SDS-PAGE al 10 % como se observa en el Cuadro 3 (Bio-Rad Laboratories, 2014). Todas las muestras se ajustaron a un volumen final de 20 μL con una concentración de 62 mg/mL y tampón de carga 1X (Tris-HCl, SDS, glicerol, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol). Posteriormente fueron incubadas a 99°C por 5 minutos, transferidas a hielo y

centrifugadas 10 segundos a 4°C. Se corrieron los geles a 100 V por 2 horas. Después se tiñó con solución de Coomassie para observar la integridad de los extractos y biopsia sólida a través del patrón de bandas. Particularmente los geles de los extractos se eligieron dos bandas al azar y fueron analizadas por densitometría en ImageLab.

Cuadro 3. Preparación 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

4.6 Cuantificación de OPN sérica a partir de ELISA

Se empleó el kit comercial de ELISA tipo sandwich (Quantikine® ELISA Human Osteopontin Immunoassay, R&D System) el cual usa un anticuerpo monoclonal específico previamente colocado sobre la microplaca para OPN humana.

Para realizar el ELISA, se preparó la curva estándar con base al protocolo (R&D Systems, Cat. DOST00) utilizando el estándar de OPN humana (OPN recombinante en tampón con conservadores), el cual se reconstituyó con 1.0 mL de agua destilada generando una solución de 200 ng/mL. Se realizaron 8 diluciones utilizando el estándar y el calibrador diluyente RD5-24 (tampón), la primera a partir de una concentración 200 ng/mL a una de 20 ng/mL, la segunda a una concentración de 10 ng/mL y las restantes una dilución 1:2 de la solución inmediata anterior como se observa en el Cuadro 4, hasta llegar a la solución de 0 ng/mL.

Se preparó una dilución 1:25 de las muestras séricas problema, la cual se realizó tomando de cada muestra 10 μL llevando a un volumen final de 250 μL con el calibrador diluyente RD5-24.

Cuadro 4. Preparación de curva estándar ELISA OPN humana.

[ng/mL]	Estándar OPN Humana	Calibrador RD5-24
20	60 μL (200 ng/mL)	540 μL
10	300 μL (20 ng/mL)	300 μL
5	300 μL (10 ng/mL)	300 μL
2.5	300 μL (5 ng/mL)	300 μL
1.25	300 μL (2.5 ng/mL)	300 μL
0.625	300 μL (1.25 ng/mL)	300 μL
0.313	300 μL (0.625 ng/mL)	300 μL
0	---	600 μL

El ensayo ELISA se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems, Cat. DOST00) preparando duplicados de cada muestra por ensayo, añadiendo 100 μL del diluyente de ensayo RD1-6 (tampón de dilución) y 50 μL de estándar (OPN) o muestra. Después se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente cubriendo los pozos con tira adhesiva. Entre cada etapa se realizaron 4 lavados, llenando y aspirando 100 μL de tampón de lavado en cada pocillo. Enseguida se añadieron 200 μL de anticuerpo conjugado con peroxidasa anti-OPN e inmediatamente se cubrió con tira adhesiva incubando durante 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 μL de solución de sustrato a cada pocillo, dicha solución se preparó tomando volúmenes iguales tanto del reactivo A (peróxido de hidrógeno) como del B (Tetrametilbencidina), se incubó de 10 a 20 minutos a temperatura ambiente protegiendo de la luz. Inmediatamente se añadieron 50 μL de solución de parada induciendo un cambio de coloración de azul a amarillo en los pocillos. Después se

determinó la absorbancia de cada pocillo en un lapso de 10 a 20 minutos, usando un espectrofotómetro ajustado a 450 nm, finalmente se multiplicó por el factor de dilución y se obtiene la concentración de OPN sérica.

4.7. Electroforesis bidimensional

Una vez cuantificado el extracto proteico de la biopsia tumoral se realizó la técnica de electroforesis bidimensional, separando primero por punto isoeléctrico y posteriormente por peso molecular.

4.7.1 Primera dimensión (punto isoeléctrico)

Para la electroforesis bidimensional se utilizó una tira reactiva de 7 cm que posee un gel en una de sus caras, con un gradiente de pH de 3-6 (Bio-Rad, 163-2003) de acuerdo al punto isoeléctrico de la OPN (4.37). Al extracto proteico tumoral se le agregaron 125 μ L de la solución de rehidratación proporcionada por el kit (Bio-Rad, 1632105). Después se vació la muestra sobre la tira cubriendo con 1 mL de aceite mineral (Bio-Rad, 1632105) e incubó toda la noche a 4°C. Una vez terminada la incubación, se prosiguió a realizar el isoelectroenfoco, a partir de un programa de cuatro estadios; el primero S1 con aumento lento de 0 a 250 V, 50 μ A por 20 minutos; el segundo S2 manteniendo voltaje lineal a 4000 V, 50 μ A durante 2 horas; el tercero S3 con aumento rápido de voltaje de 4000 V hasta 10000 V/h, 50 μ A durante 1 hora; y el cuarto S4 voltaje rápido 500 V, 50 μ A durante 20 minutos, siendo así una duración total del programa de 5 horas.

4.7.2 Segunda dimensión (peso molecular)

Una vez finalizado el isoelectroenfoco, la tira reactiva se colocó encima de un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes al 10% adicionando agarosa para unir la tira al gel. Posteriormente se corrió a 100 V por 10 minutos y después a 200 V por 1 hora.

Para revelar el gel de poliacrilamida, se incubó toda la noche en la solución fijadora (metanol 30%, isopropanol-ácido acético al 10 %, ácido sulfosalicílico 3.5%). En seguida se realizaron 3 enjuagues utilizando solución de lavado (metanol 30%,

isopropanol-ácido acético 12%) para eliminar cualquier residuo de la solución fijadora y posteriormente se incubó con glutaraldehído al 10% durante 1 hora. A continuación se realizaron lavados con agua en agitación con intervalos 30 minutos durante 4 horas y finalmente 2 horas de lavados con agua con intervalos de 15 minutos.

Una vez finalizados los lavados el gel se tiñó con plata (NaOH 0.36%, NH₄OH conc, AgNO₃ 20%) incubando por 15 minutos. En seguida se realizó un lavado con agua por 30 segundos para el eliminar el exceso de plata y se agregó la solución de revelado (ácido-cítrico, formaldehído 37%) durante 15 minutos. Después de añadió la solución de paro (ácido-acético 10 %) en el momento en que comenzaron a visualizarse las primeras manchas en el gel. Finalmente se lavó, observó y digitalizó en el fotodocumentador.

4.8 Análisis estadístico

Se realizó el análisis estadístico por medio de ANOVA y método de Tukey con una $P < 0.05$.

5. RESULTADOS

5.1 Proteínas totales en biopsias líquidas y sólidas.

5.1.1 Extracción proteica de biopsia tumoral.

La extracción proteica se realizó a partir de una única biopsia tumoral obtenida por donación voluntaria de uno de los pacientes del departamento de Neuro-oncología del HGM, para efecto de este trabajo se le denominó con el código NC5 como se presenta en el Cuadro 2 de la página 18. Se realizó la extracción de proteínas con Tris-HCL como se detalla en Metodología, tomando una alícuota de biopsia tumoral para la cuantificación de proteínas.

5.1.2 Cuantificación de proteínas totales en biopsias líquidas y sólidas por el método de Bradford.

Para determinar la concentración proteica presente en los sueros de los tres grupos y del tumor sólido, se preparó una curva con BSA (Sigma-Aldrich, B6916) como se describe en el Cuadro 5 de la que se tomaron 5 μ L mezclando con 250 μ L del reactivo Bradford y posteriormente midiendo a 495 nm. Se realizó por duplicado tanto la curva y la medición de las biopsias líquidas y sólidas.

Cuadro 5. Preparación de la curva de calibración para cuantificación de proteínas.

[mg/mL]	BSA	H ₂ O
1.4 mg/mL	17.5 μ L (2 mg/mL)	7.5 μ L
1 mg/mL	14.29 μ L (1.4 mg/mL)	5.71 μ L
0.5 mg/mL	10 μ L (1 mg/mL)	10 μ L
0.25 mg/mL	10 μ L (0.5 mg/mL)	10 μ L
0 mg/mL	---	10 μ L

La cuantificación proteica total de las muestras se calculó interpolando la media de sus absorbancias en la ecuación de la curva estándar. Se realizaron dos experimentos independientes, en la Figura 9 se muestra una curva estándar representativa del ensayo.

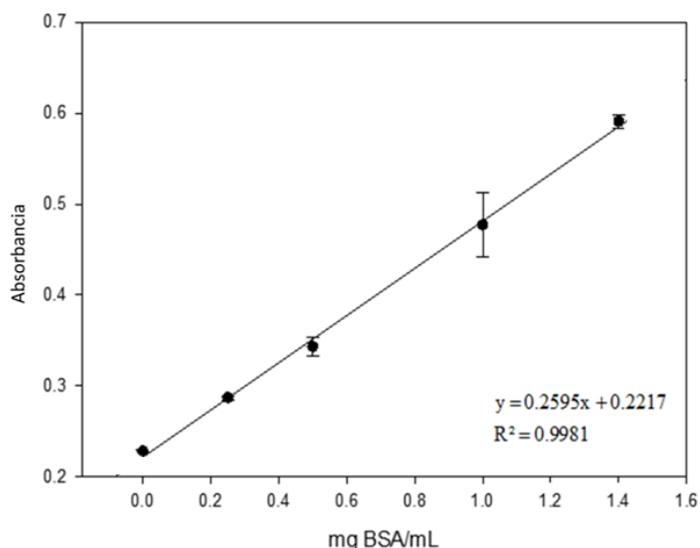


Figura 9. Curva estándar representativa para la cuantificación de proteínas por el método Bradford. Concentraciones de BSA de 0 a 1.4 mg/mL, lectura a 595 nm.

Se diluyó 1:50 el extracto proteico tumoral NC5 y 1:70 los sueros de los pacientes, tomando 5 μ L de estas diluciones más 250 μ L del reactivo de Bradford para la determinación de proteína total. Las muestras fueron analizadas por duplicado y la cuantificación proteica se determinó interpolando la media de las absorbancia en la ecuación de la curva estándar. En el Cuadro 6 se presenta la concentración proteica total en suero de cada paciente, en donde se pueden observar que las concentraciones en la mayoría de los pacientes son muy semejantes independientemente de su estado fisiológico. La concentración del extracto tumoral NC5 fue de 64.23 ± 0.89 mg/mL.

Cuadro 6. Concentración sérica de proteína total en pacientes.

Grupo Control		Grupo Oncológico		Grupo Neuro-oncológico	
142	86.547 mg/mL	ONC1	66.499 mg/mL	NC1	62.545 mg/mL
143	143.021 mg/mL	ONC2	112.666 mg/mL	NC2	81.888 mg/mL
144	92.194 mg/mL	ONC3	68.052 mg/mL	NC3	73.840 mg/mL
145	88.382 mg/mL	ONC4	72.852 mg/mL	NC4	67.063 mg/mL
146	93.606 mg/mL	ONC5	66.216 mg/mL	NC5	53.227 mg/mL

5.2 Análisis de integridad proteica en suero de pacientes.

Debido a que la obtención de las muestras fue realizada en un periodo de seis meses, consideramos importante evaluar la integridad de los sueros, para ello realizamos SDS-PAGE (Figura 10) con el objetivo de visualizar que los sueros no presentaran degradación proteica. Para ello se analizó el perfil de expresión entre los individuos del grupo “control” los pacientes de los grupos “oncológico” y “neuro-oncológico”. En las Figuras 10A y 10B se muestra una imagen representativa de los dos geles SDS-PAGE realizados de los tres experimentos independientes.

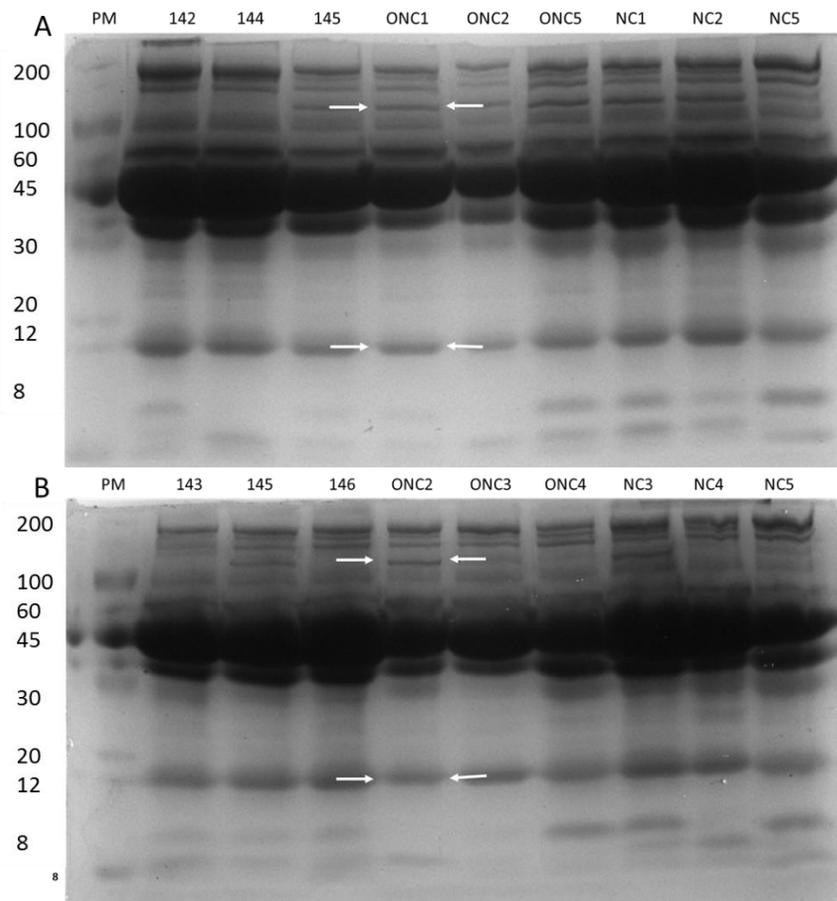


Figura 10. Electroforesis de proteínas totales en suero de los pacientes. Se señala con flechas las bandas elegidas para análisis densitométrico. Carril 1, marcador molecular (PM) ColorBurst (Sigma); carriles 2, 3 y 4, participantes grupo control; carriles 5, 6 y 7, participantes grupo oncológico; carriles 8, 9 y 10 participantes grupo neuro-oncológico.

En la Figura 10A y 10B los geles muestran que el suero de los 15 pacientes no presenta signos de degradación manteniendo integridad proteica y similitud del patrón de bandas independientemente de su condición fisiopatológica. El patrón de expresión proteico que observamos en el suero de los participantes muestra semejanza al reportado por distintos grupos de investigación, donde observamos una densidad mayor de bandas entre los 40 y 60 kDa asociado a los precursores de albumina y de ella misma, correspondiendo al hecho de que es la proteína más abundante en suero.

Para confirmar que las diferencias en la concentración sérica de proteínas no eran debido al estado clínico de los participantes se seleccionaron dos bandas proteicas al azar, 100 kDa y 12 kDa banda superior e inferior respectivamente y así realizar una semi-cuantificación por densitometría. Posteriormente se realizó un análisis estadístico de las mismas (Figuras 11), con el que observamos que las diferencias entre las muestras no está asociada al estado clínico de los participantes, además que una misma muestra puede presentar expresión diferencial entre proteínas.

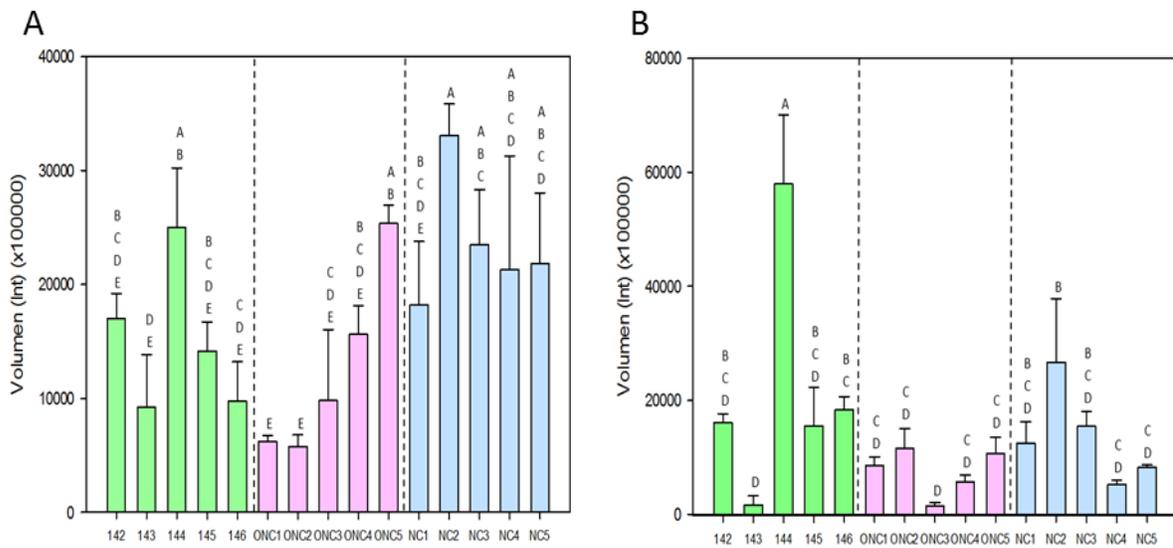


Figura 11. Análisis densitométrico del patrón proteico en suero. SDS-PAGE de proteínas totales, bandas superior (A) e inferior (B). Grupo control; (verde), grupo oncológico (rosa) y grupo neuro-oncológico (azul). Cada barra representa la media n=3, P<0.05 (Prueba ANOVA y Tukey).

5.3 Cuantificación sérica de OPN a través de ELISA.

La concentración de OPN fue determinada por medio del ensayo ELISA (Quantikine® ELISA Human Osteopontin Immunoassay de R&D System) realizando duplicados de curva y la medición de los sueros. Se preparó la curva estándar con base las especificaciones de la casa comercial, como se describe en el Cuadro 4, se eligieron 5 concentraciones para la elaboración de la curva estándar. La elección de las concentraciones para la curva estándar se realizó de acuerdo al resultado previamente obtenido del paciente NC2, diagnosticado con GBM (grado IV) el cual presentó una concentración menor a 5 ng OPN/mL y debido a que se ha reportado como el astrocitoma que presenta mayor concentración de OPN sérica en comparación a los grados menores (I, II y III) (Erpolat y col., 2013), se decidió preparar la curva dentro los valores de 0 a 5 ng/mL. En la Figura 12 se observa una curva estándar representativa para el ensayo ELISA.

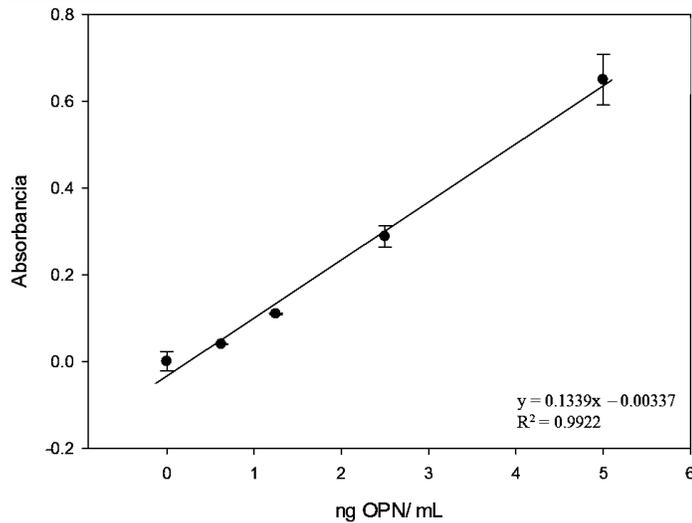


Figura 12. Curva estándar representativa del ensayo ELISA de OPN humana.

Concentraciones de los estándares entre 0 a 5 ng/mL, lectura a 450 nm.

Se realizaron dos ensayos independientes con su respectiva curva estándar evaluando duplicados de todas las muestras Posteriormente se determinó la concentración de OPN en las diferentes muestras calculando la media de la absorbancias e interpolando en su respectiva ecuación de la curva.

Debido a que la absorbancia de la muestra del paciente NC5 (astrocitoma de alto grado, grado III) fue mayor al del paciente NC2 (GBM, grado IV) particularmente la concentración de la muestra sérica se determinó calculando la media de las absorbancias y extrapolando con la ecuación de la curva estándar.

El análisis estadístico de la concentración de OPN en los sueros de los pacientes se observa en la Figura 13 y se realizó con apoyo del software Minitab17, realizando ANOVA y Tukey con una confiabilidad de 95%.

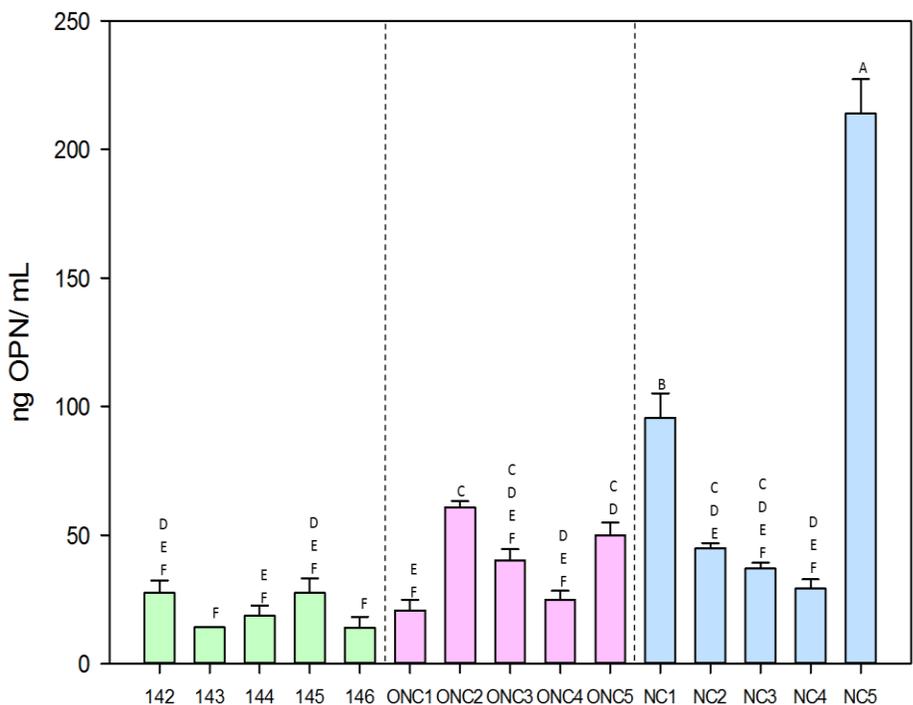


Figura 13. Concentraciones de OPN en suero de pacientes. Participantes del grupo control (verde), grupo oncológico (rosa) y por último el grupo neuro-oncológico (azul). Cada barra representa la media de dos experimentos independientes realizados por duplicado, $P < 0.05$ (Prueba ANOVA y Tukey).

De acuerdo al análisis estadístico, el grupo control y el grupo oncológico mostraron diferencias significativas entre ellos, sin embargo los pacientes de un mismo grupo presentaron concentraciones similares, obteniendo concentraciones medias de 20.4 ± 6.82 ng/mL (grupo control), $39.8 \text{ ng/mL} \pm 16.8$ ng/mL (grupo oncológico).

Por otra parte las concentraciones séricas de OPN en el grupo neuro-oncológico son de 88.14 ± 77.1 ng/mL. Se observa una gran dispersión de datos a través del análisis de la desviación estándar, tanto si el análisis se realiza entre los individuos del mismo grupo, como si se compara con respecto a la media y desviación estándar de los grupos control y oncológico. Los pacientes NC1 y NC5 presentaron concentraciones de 95.6 ± 11.7 ng/mL y 214 ± 16.2 ng/mL respectivamente, siendo 4.5X y 10.5X mayor al compararlas con respecto a la media del grupo control.

5.4 Electroforesis bidimensional de biopsia sólida

5.4.1 Análisis de la integridad proteica de la biopsia sólida

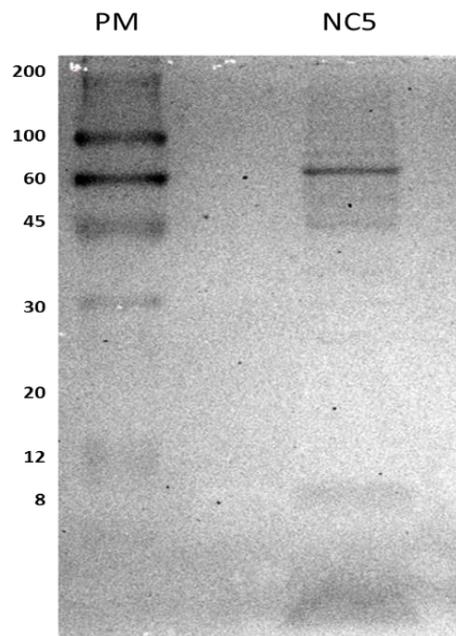


Figura 14. Electroforesis en gel del extracto proteico tumoral. Separado por peso molecular en kDa. Carril 1, marcador molecular (PM) ColorBurst (Sigma), carril 2 extracto proteico paciente NC5.

Una vez obtenidas las concentraciones séricas de OPN, se prosiguió a analizar el patrón de expresión proteico del único tumor obtenido cuyo paciente mostró altos niveles de OPN en suero. En la Figura 14 se muestra el patrón de expresión del extracto proteico total del astrocitoma grado III donado por el paciente NC5. 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 coomassie y se observó el patrón de bandas, en el cual no se observa degradación.

5.4.2 Electroforesis bidimensional de biopsia tumoral

Para un análisis global de la expresión proteica del paciente NC5 diagnosticado con AA, se realizó una electroforesis bidimensional del extracto proteico tumoral. En la Figura 15 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 45 o 50 kDa.



Figura 15. Gel de electroforesis bidimensional de extracto proteico tumoral del paciente NC5. Tinción de plata, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de proteínas. Tira reactiva de 7 cm gradiente 3-6.

6. DISCUSIÓN

Actualmente el abordaje en la investigación de los gliomas es mediante ciencias como la metabolómica y proteómica que permiten tener una visión dinámica de las biomoléculas implicadas en un momento y bajo condiciones específicas, lo que nos permite reconocer moléculas que al presentarse, ausentarse o alterarse correlaciona con las patologías o describen el estado de la misma. Por lo tanto, analizar la expresión y concentración de distintas sustancias en tejidos o fluidos, nos permite diagnosticar o pronosticar la evolución de un estado fisiológico o patológico. Dichas moléculas han sido denominadas como biomarcadores y se vislumbran también como poderosas herramientas para direccionar y dar seguimiento al tratamiento con mayor especificidad en respuesta a fármacos (Kros y col., 2015).

El estudio de los biomarcadores utilizados para identificar procesos tumorales no se ha circunscrito a proteínas o metabolitos, también hay interesantes aproximaciones asociadas a alteraciones de procesos celulares constitutivos como el uso de exosomas. Sin embargo, por su estabilidad e implicaciones funcionales directas o causales, las proteínas siguen siendo el principal abordaje en el estudio de biomarcadores. Un ejemplo de biomarcadores proteicos es la OPN, glicofosfoproteína que ha sido estudiada como marcador con potencial pronóstico debido a su presencia en diferentes procesos moleculares que promueven el cáncer, entre ellos, la inmortalidad celular, invasión, angiogénesis e inhibición a muerte celular.

En presencia de carcinomas como el de mama, pulmón y próstata la OPN presenta altos niveles en suero, por lo que se le ha considerado estar involucrada en los procesos cancerígenos (Weber y col., 2010; Gimba y Tilli, 2013). Particularmente en los gliomas, la presencia de OPN en suero se ha relacionado con la agresividad los astrocitomas, correlacionando con un aumento en la capacidad infiltrante a otras áreas del cerebro. Esta asociación fue caracterizada por Ding y col. en el 2002, comprobando la reducción de la migración tumoral al inhibir con anticuerpos las integrinas ($\alpha\beta3$ y $\alpha\beta5$) que reconocen la OPN como ligando, lo que indica que la

proteína en el cerebro es capaz de promover la migración de células de astrocitoma maligno.

En este estudio se evaluó a la OPN como biomarcador pronóstico en diferentes graduaciones de gliomas utilizando biopsias líquidas y sólidas. La investigación se realizó en pacientes diagnosticados con tumores cerebrales (Neuro-oncológico) y debido a que la OPN se ha descrito en otras patologías como melanoma, cáncer gástrico e hígado (Hsun-Jin y col., 2010) se establecieron dos grupos control, uno de pacientes con tumores no cerebrales (oncológico) y otro de pacientes con ausencia de patología tumoral (control). Se cuantificaron los niveles de OPN sérica en todos los pacientes, con el objetivo de valorar el potencial de OPN como marcador y su utilidad pronóstica. Como se ha descrito en varios estudios realizados por Weber y col., 2010; Sfiridaki y col. en 2011, Cao y col. en 2012 y Gimba y Tilli, 2013, la OPN es detectable en el suero de todos los participantes a través de la técnica de ELISA, sin embargo cada uno reporta variaciones en las concentraciones entre los pacientes que no presentan patologías como también en los pacientes con cáncer o tumores cerebrales de estirpe glial.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, los participantes del grupo neuro-oncológico mostraron los niveles más altos de OPN sérica, NC1 (95.6 ± 11.7 ng/mL), NC2 (44.9 ± 2.5 ng/mL), NC3 (37.16 ± 2.7 ng/mL), NC4 (29.2 ± 4.4 ng/mL) y NC5 (214 ± 16.2 ng/mL) en comparación a la media del grupo control (20.4 ± 6.82 ng/mL). Es importante destacar que la media de nuestro grupo control coincide con los hallazgos publicados por Sreeranthreddy y col. en 2010 quienes reportaron una media de 11.7 ± 7.26 ng/mL en pacientes con ausencia de patología tumoral en el Instituto Superior de Ciencias Médicas "Sri Satya Sai". En el grupo oncológico conformado por pacientes con diferentes patologías tumorales no cerebrales, los pacientes diagnosticados con mieloma y sarcoma presentaron las concentraciones más altas de OPN sérica del grupo, dichos valores corresponden a los reportados de >50 ng OPN/mL por Sfiridaki y col. en 2011 en mieloma y Cao y col. en 2012 en sarcoma por lo que nos hace descartar falsos positivos.

Por otro lado, al analizar los datos del grupo neuro-oncológico, el paciente NC2 diagnosticado con GBM (grado IV) presentó un valor de 44.9 ± 2.5 ng/mL, lo cual concuerda con los valores reportados por Screekanthreddy y col. en 2010, donde se determina una correlación entre una alta concentración de OPN sérica con un mal pronóstico, en comparación a los grados bajos (I, II y III) que presentaron menos de la mitad de la media reportada por GBM. Sin embargo, los pacientes diagnosticados con astrocitoma maligno (NC1) y astrocitoma de alto grado (NC5), ambos correspondientes a una graduación III (ABTA, 2012), presentaron valores por encima del paciente con GBM. El paciente NC1 presentó una concentración de 95.6 ± 11.7 ng/mL dos veces más alta que el GBM y el paciente NC5, 214 ± 16.2 ng/mL cinco veces más alta, de tal manera que los valores no concuerdan con lo reportado anteriormente por Screekanthreddy. En ambos casos, la relación entre el diagnóstico clínico y su asociación directa con las concentraciones séricas, permiten establecer una posible relación entre los procesos tumorales y las interacciones de OPN con la integrina $\alpha\beta_3$ y CD44 como ya lo han mencionado Wai y Kuo en 2004, quienes reportan la presencia del OPN como ligando para la mediación de la migración y la invasión de células tumorales. Por ejemplo, en la activación de cascadas como Akt por medio de PLC- γ a partir de interacción de OPN con CD44 (Rangaswami y col., 2006) la cual promueve la progresión, migración celular, el crecimiento tumoral y evasión a apoptosis.

En 2002, Ding y col. reportaron una disminución en la migración de células de astrocitoma maligno resultado al inhibir la interacción de OPN con $\alpha\beta_3$. Por lo tanto, la alta concentración sérica de OPN en pacientes diagnosticados con astrocitoma grado III podría estar relacionado a la migración de éstas celulares tumorales aumentando la malignidad de las mismas. Debido a que dicho proceso es activado a partir de PI3K, mediada por la interacción OPN- $\alpha\beta_3$, quinasa relacionada a la motilidad, crecimiento tumoral y metástasis.

A la OPN se le atribuye actividad en diferentes procesos como proliferación (Ramírez y col., 2013), motilidad (Lamour y col., 2015) y supervivencia celular (Gimba y Tilli, 2013), además de crecimiento tumoral, inhibición apoptótica y angiogénesis (Wang

y col., 2001). Por lo tanto, los resultados obtenidos en este trabajo proponen a la OPN como un biomarcador pronóstico de astrocitomas en grado III. Sin embargo, es necesario aumentar el número de participantes y dar un seguimiento del progreso del paciente, así como valorar la presencia de otras moléculas asociadas a la progresión tumoral y metástasis.

Por otro lado, la proteómica, es una rama del conocimiento que permite un análisis global de la presencia de proteínas en estados fisio-patológicos. En particular, la electroforesis bidimensional (2DE) es una técnica que nos permite recolectar información complementaria para una mejor identificación de las proteínas presentes en una muestra en particular, ya que es posible la detección diferencial de la expresión proteica utilizando dos variables de las proteínas, el peso molecular y el punto isoeléctrico (en este caso) y así establecer un patrón de expresión que puede ser comparable con un patrón establecido de expresión basal. Por lo tanto, se eligió dicha técnica para analizar la biopsia de tejido tumoral donada con la intención de comparar los patrones bidimensionales entre varios tumores gliales, clasificados en la misma graduación con características clínicas similares y así tener un mejor acercamiento para generar una base de datos de las diferencias presentadas en la expresión y en este sentido poder discriminar entre presencia o nivel de expresión diferencial entre pacientes, para en un futuro poder investigar más a fondo que proteínas son y conocer relaciones entre ellas y los estados patológicos. Sin embargo, el tiempo en que se realizó esta tesis solo un paciente fue sometido a una extirpación quirúrgica del glioma como parte su tratamiento, por lo que el planteamiento inicial de comparar patrones proteicos de distintos astrocitomas no fue posible. De tal manera que solo el patrón obtenido de la 2DE realizada del paciente NC5 diagnosticado con astrocitoma de alto grado fue analizado, para determinar las proteínas que se presentaron. De acuerdo al peso molecular (47 a 70 kDa) y el punto isoeléctrico (4.7) de la OPN, posiblemente una de las proteínas podría ser la OPN sin embargo debido a la falta de un anticuerpo que permita aseverarlo, se contempla continuar muestreando biopsias sólidas y realizar más análisis proteómicos por 2DE para poder establecer diferencias entre los tumores de un mismo grado. Después

seleccionar proteínas expresadas diferencialmente y realizar análisis subsecuente con MALDI-TOF acoplado a masas para identificar con precisión que proteínas están presentes y establecer posibles interacciones entre ellas.

La correlación entre la concentración sérica de OPN con los datos clínicos y patológicos se podría asociar como determinante de la malignidad del tumor por las evidencias de su participación como ligando en las cascadas de señalización asociadas a metástasis lo que le proporciona un mayor potencial de infiltración y malignidad a ese tumor. Por lo que, la detección de OPN podría llevar a una aproximación más acertada sobre el comportamiento biológico del tumor y la expectativa de vida del paciente y así ayudar al médico en el diseño de un tratamiento personalizado más eficiente para combatir la enfermedad y dar un seguimiento más estricto del paciente.

7. CONCLUSIÓN

El aumento en la concentración sérica de OPN correlaciona con el pronóstico clínico de malignidad en tumores sólidos gliales, por lo que la OPN podría ser un biomarcador pronóstico de la capacidad infiltrante.

8. REFERENCIAS

Abbas K, Lichtman A, Pillai S. Principales características de algunas moléculas CD. Ed. Elsevier Saunders. Inmunología celular y molecular. México. **2012**; 505-512.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. Biología molecular de la célula. 5ª edición. Barcelona: Editorial Omega. **2010**; 1602.

American Brain Tumor Association (ABTA). Glioblastoma y astrocitoma maligno. [monografía en internet] Grupo Roche. **2012**. [consultado 2016 mayo 25]. Disponible en: <http://www.abta.org/resources/spanish-language-publications/glioblastoma-y-astrocitoma-maligno.pdf>.

Bio-Rad Laboratories. A guide to polyacrylamide gel electrophoresis and detection. [monografía en internet] California, USA. **2014**. [consultado 2015 octubre 15]. Disponible en: http://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6040.pdf

Cao D, Li X, Jiang X, Lum Y, Khin E, Lee N, Wu G, Luk J. Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers. World J Gastroenterol **2012**; 18:3923-3930.

Ding Q, Stewart J, Prince C, Chang P, Trikha M, Han X, Grammer R, Gladson L. Promotion of malignant astrocytoma cell migration by osteopontin expressed in the normal brain: differences in integrin signaling during cell adhesion to osteopontin versus vitronectina. Cancer Research. **2002**; 62:5336–5343.

Erpolat O, Gocun P, Akmansu M, Ozgun G, Akyol G. Hypoxia-related molecules HIF-1 α , CA9, and osteopontin, predictions of survival in patients with high-grade glioma. Strahlenther Onkol. **2013**; 189:147-154.

Fok T, Lapointe H, Tuck A., Chambers A., Jackson-Boeters L, Daley T, Darling M. Expression and localization of osteopontin, homing cell adhesion molecule/CD44, and integrin α v β 3 in pleomorphic adenoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and adenoid cystic carcinoma. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. **2013**; 116:743–751.

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

Gartner L, Hiatt J. Tejido Nervioso. Ed. McGraw-Hill Interamericana. Texto Atlas de Histología. México. **2008**; 185-218.

Gimba E, Tilli T. Human osteopontin splicing isoforms: known roles, potential clinical applications and activated signaling pathways. *Cancer Letters*. **2013**; 331:11-17.

Guillamón-Vivancos T, Gómez-Pinedo U, Matías-Guiu J. Astroцитos en las enfermedades neurodegenerativas (I): función y caracterización molecular. *Neurología*. **2015**; 30:119-129.

Guyton A, Hall J. Organización del sistema nervioso, funciones básicas de las sinapsis, sustancias transmisoras. Ed. Elsevier Saunders. Tratado de fisiología médica. Barcelona. **2009**; 555-571.

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

Hayes J, Thygesen H, Droop A, Hughes A, Westhead D, Lawler S, Wurdak H, Short S. Prognostic microRNA's in high-grade glioma reveal a link to oligodendrocyte precursor differentiation. *Onconscience*. **2015**; 3:252-262.

Hilton DA, Shivane AG. Neuropathology simplified: a guide for clinicians and neuroscientists. New York. Springer. **2015**; 1-15.

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

Hsun-Jin J, Chin-Cheng L, Yung-Luen S, Dueng-Yuan H, Hsin-I M, Jing-Huei L, Hen-Wei W, Horng-Mo L. Osteopontin regulates human glioma cell invasiveness and tumor growth in mice. *Neuro-Oncology*. **2010**; 12:58–70.

Jhanwar-Uniyal M, Labagnara M, Friedman M, Kwasnicki A, Murali R. Glioblastoma: molecular pathways, stem cells and therapeutic targets. *Cancers*. **2015**; 7:538-555.

Jung J, Fuerch C, Schanzer A, Heck A, Plate K, Seifert V, Steinmetz H, Raabe A, Sitzer M. Serum GFAP is diagnostic marker for glioblastoma multiforme. *Brain*. **2007**; 130:3336-3341.

Kandel E, Schwartz J, Jessel T. Nerve cells and behavior. Ed. McGraw-Hill: Principles of neural science. Nueva York. **2000**; 19-35.

Kros J, Mustafa D, Dekker L, Sillevs P, Luider T, Zheng P. Circulating glioma biomarkers. *Neuro-Oncology*. **2015**; 17:343–360.

Lamour V, Henry A, Kroonen J, Nokin MJ, Marschall Z, Fisher L, Chau T, Chariot A, Sanson M, Delattre J, Turtoi A, Peulen O, Rogister B, Castronovo V, Bellahce A. Targeting osteopontin suppresses glioblastoma stem-like cell character and tumorigenicity in vivo. *Int. J. Cancer*. **2015**; 137:1047-1057.

Matusan-Ilijas K, Behrem S, Jonjic N, Zarkovic K, Lucin K. Osteopontin expression correlates with angiogenesis and survival in malignant astrocytoma. *Pathol. Oncol. Res*. **2008**; 14:293-298.

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

Qiu Y, Hu Y, Zhang Z, Ye L, Hong J, Schneider M, Ling X, Du J, Zuo X, Zhou S, Chen G, Xie S, Zhang J, Zhen H, Feng J, Dong W. Genetic association of osteopontin (OPN) and its receptor CD44 genes with susceptibility to Chinese gastric cancer patients. *J Cancer Res Clin Oncol*, **2014**.

Ramirez Y, Weatherbee J, Wheelhouse R, Ross A. Glioblastoma multiforme therapy and mechanisms of resistance. *Pharmaceuticals*. **2013**; 6:1475-1506.

Rangaswami H, Bulbule A, Kundu G. Osteopontin: role in cell signaling and cancer progression. *TRENDS in Cell Biology*. **2006**; 16:79-87.

Sfiridaki A, Miyakis S, Pappa C, Tsirakis G, Alegakis A, Kotsis V, Stathopoulos E, Alexandraki M. Circulating osteopontin: a dual marker of bone destruction and angiogenesis in patients with multiple myeloma. *Journal of Hematology & Oncology*. **2011**; 4:-2.

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

Sreekanthreddy P, Srinivasan H, Kumar D, Nijaguna M, Sridevi S, Vrinda M, Arivazhagan A, Balasubramaniam A, Hedge A, Chandramouli B, Santosh V, Rao M, Kondaiah P, Somasudaram K. Identification of potential serum biomarkers of glioblastoma: serum osteopontin levels correlate with poor prognosis. *Cancer Epidemiol Biomarkers*. **2010**; 19:1409-1422.

Talmadge JE, Fidler IJ. AACR Centennial Series: The Biology of Cancer Metastasis: Historical Perspective. *Cancer Research*. **2010**; 70(14):5649-5669.

University of Utah Health Care. Resumen de los trastornos del sistema Nervioso. [monografía en internet]. Medical Drive SLC, UT 84132. **2013**. [consultado 2015 octubre 5]. Disponible en: <http://healthcare.utah.edu/heal>.

Wai P, Kuo P. Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer Metastasis Rev*. **2008**; 27:103-118.

Wai P, Kuo P. The role of osteopontin in tumor metastasis. *Journal of Surgical Research*. **2004**; 121:228-241.

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

Weber GF, Lett S, Haubein N. Osteopontin is a marker for cancer aggressiveness and patient survival. *Brit J Cancer*. **2010**; 103:861–869.

World Health Organization (WHO). World Report Cancer 2014. [monografía en internet] International Agency for Research on Cancer. **2014**. [consultado 2015 septiembre 25]. Disponible en: <http://www.iarc.fr/en/publications/books/wcr/>.

Zhao M, Xu H, Liang F, He J, Zhang J. Association of osteopontin expression with the prognosis of glioma patient: a meta-analysis. *Tumoral Biol*. **2015**; 36: 429-436.

ANEXOS

CONSENTIMIENTO INFORMADO

La Universidad Autónoma de Querétaro y el Hospital General 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 nervioso 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.

Con una muestra sanguínea del paciente 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 le podrán 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(s) se encriptarán, es decir, su nombre será sustituido 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(son) 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 DONACIÓN 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.