

DEPARTAMENT PATOLOGIA

BÚSQUEDA DEL GEN SUPRESOR DE TUMORES
IMPLICADO EN MEDULOBLASTOMA

MARIA LUISA PÉREZ EBRI

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 20 de juny de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Joaquín Donat Colomer
- D. José Miguel Couselo Sánchez
- D^a. Aurora Navajas Gutiérrez
- D^a. Carmen Nájera Mortes
- D. José Miguel Cerdá Nicolás

Va ser dirigida per:

D. Antonio Pellín Pñerez

D. Francisco Martínez Castellano

D^a. Carmen Orellana Alonso

©Copyright: Servei de Publicacions
Maria Luisa Pérez Ebri

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7292-0

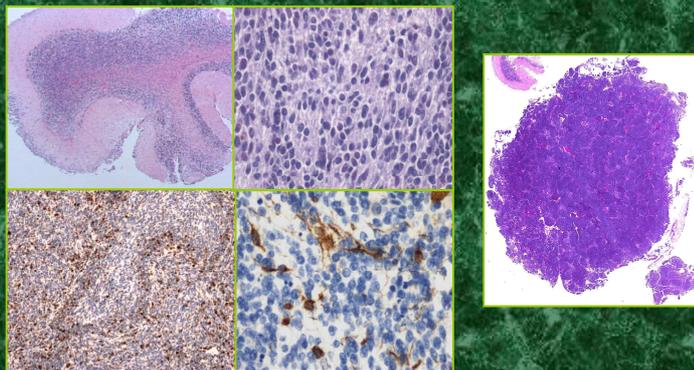
Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT DE VALÈNCIA



Departamento de Patología
Facultad de Medicina y Odontología

**BÚSQUEDA DEL GEN SUPRESOR
DE TUMORES
IMPLICADO EN MEDULOBLASTOMA**



Tesis doctoral
María Luisa Pérez Ebrí
Valencia 2008

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA

**Facultad de Medicina y Odontología
Departamento de Patología**



**BÚSQUEDA DEL GEN SUPRESOR
DE TUMORES IMPLICADO EN
MEDULOBLASTOMA**

Memoria que para optar al grado de Doctora
presenta María Luisa Pérez Ebri, licenciada en
Medicina y Cirugía.

Valencia, Abril 2008

II

Dr. Antonio Pellín Pérez, Catedrático de Biología del Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Valencia.

Dr. Francisco Martínez Castellano, biólogo adjunto de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

Dra. Carmen Orellana Alonso, bióloga adjunta de la Unidad de Genética y Diagnóstico Prenatal del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

CERTIFICAN:

La presente tesis doctoral titulada "*Búsqueda del gen supresor de tumores implicado en meduloblastoma*", ha sido realizada por la licenciada en Medicina y Cirugía por la Universidad de Valencia Doña María Luisa Pérez Ebri en el Departamento de Patología de la Facultad de Medicina y Odontología de dicha Universidad bajo nuestra dirección y reúne todos los requisitos para su depósito y lectura.

Para que así conste, firman la presente en Valencia, Abril 2008.

Fdo. Dr. Antonio Pellín Pérez

Fdo. Dr. Francisco Martínez Castellano

Fdo. Dra. Carmen Orellana Alonso

A Rafa por su paciencia

A mis hijos por su sonrisa

A mi madre por su fe en mí

A mi padre por enseñarme a
trabajar y tener constancia

A los niños enfermos y sus familias

v

AGRADECIMIENTOS

-A Miguel Hernández, por introducirme en las nuevas metodologías e indicarme cómo empezar.

-A Silves, por su disposición e incondicional ayuda.

-A Paki y Carmen, por su calma, sabiduría y animosidad.

-Al Dr. Pellín por prestarse a continuar y dar forma a este trabajo.

-A las Drs. Victoria Castell y Adela Cañete, siempre prestas a ayudar y colaborar.

-Al Dr. Prieto y la Dra. Lourdes Badía que me abrieron las puertas para trabajar en su unidad.

-A todo el personal de laboratorio de la Unidad de Genética del Hospital la Fe por trabajar junto a mí compartiendo su espacio y material.

-A Concha, por ayudarme en la ardua burocracia.

ÍNDICE

	pag
I. INTRODUCCIÓN	1
1.- Genes y cáncer	1
1.1.- Generalidades	1
1.2.- Tipos de genes implicados en el cáncer	3
1.2.1.- Oncogenes	3
1.2.2.- Genes supresores de tumores	4
1.2.3.- Genes de reparación del DNA	4
1.3.- Estrategias de búsqueda e identificación de genes implicados en cáncer	6
1.3.1.-Estudios citogenéticos	6
1.3.2.-Estudios moleculares: establecimiento de región mínima de pérdida.	6
1.3.3.-Identificación de genes candidatos, estudio de expresión y caracterización de mutaciones puntuales.	8
2.- Tumores infantiles de sistema nervioso central	9
2.1.-Generalidades	9
2.1.1- Embriología del sistema nervioso central	9
2.1.2.-Cerebelo, embriología y anatomía	9
2.1.3.- Neoplasias pediátricas	10
2.2.- Clasificación de los tumores del sistema nervioso	10
2.3.- Tumores embrionarios	11
3.- Meduloblastoma	13
3.1.-Definición	13
3.2.-Epidemiología	13
3.3.-Etiología y susceptibilidad genética	13
3.4.- Histogénesis	14
3.5.- Histopatología	15
3.5.1. Macroscopía	15
3.5.2. Microscopía	15
3.6.- Inmunohistoquímica	19
3.6.1. Sinaptofisina	19
3.6.2. Proteínas de filamentos intermedios	20
3.6.3. P 53	20
3.6.4. Bcl-2	21

3.6.5 Otros anticuerpos	21
3.6.6 Ki67	21
3.7.- Microscopía electrónica	21
3.8.- Clínica y comportamiento biológico	22
3.9.- Diagnóstico	22
3.10.-Diagnósticos diferenciales	23
3.11.-Estadaje	23
3.12.-Factores pronósticos	24
3.13.-Tratamiento	25
3.14.- Supervivencia	25
4.- Alteraciones citogenéticas y moleculares descritas en meduloblastoma; posible gen supresor de tumores en 17p	27
4.1.-Alteraciones citogenéticas	27
4.2.-Alteraciones moleculares, estudios de pérdida de heterocigosis	29
4.3.- Región mínima de pérdida	30
4.4- Genes de la región	30
II. HIPÓTESIS DE TRABAJO	33
III. OBJETIVOS	35
IV. MATERIAL Y MÉTODOS	37
1.- Muestras de tumor.	37
1.1.- Obtención de las muestras	37
1.1.1- Traslado del tejido tumoral	37
1.1.2- Preservación del tejido	38
1.2.- Base de datos	38
1.3.- Aspectos éticos	38

2.- Descripción de la serie.	39
2.1.- Histopatología	39
2.2.- Estudio inmunohistoquímico	40
2.2.1.- PGFAP	40
2.2.2.- Neurofilamentos	40
2.2.3.- Ki 67	40
2.2.4.- P 53	41
2.2.5.- Análisis de los datos	41
2.2.6.- Realización de la técnica	41
2.3.- Parámetros clínicos	41
3.- Extracción de ADN.	43
3.1.- Toma de la muestra..	43
3.2.- Disgregación física del tejido.	43
3.3.- Lisis del tejido con Proteinasa K.	44
3.4.- Purificación mediante el método del Fenol/ Cloroformo.	44
3.5.- Precipitación.	44
4.- Extracción de ARN.	46
4.1.- Toma de la muestra.	46
4.2.- Disgregación física del tejido y lisis.	46
4.3.- Purificación del ARN.	47
5.- Tratamiento con DNasa libre de Rnasas	48
5.1.- Tratamiento.	48
5.2.- Purificación	48
6.- Retrotranscripción.	49
7.- Amplificación por PCR.	50
7.1.- PCR β 2microglobulina.	50
7.2.- PCR genes problema incluidos en el estudio	52
7.3.- PCR semicuantitativa	59
7.3.1.- Densitometrado	60
8.- Electroforesis en geles de agarosa.	60
9.- Geles analíticos de acrilamida.	63

10.- Secuenciación.	64
10.1.- Purificación de la reacción de PCR.	64
10.2.- Reacción de secuenciación.	64
10.3.- Purificación.	65
10.4.- Electroforesis capilar.	65
11.- Análisis de secuencias.	66
V. RESULTADOS	67
1.- Descripción de la serie.	67
1.1.- Características clínicas y epidemiológicas	67
1.1.1.- Edad	67
1.1.2.- Sexo	67
1.1.3.- Localización	67
1.1.4.- Extensión enfermedad	68
1.1.5.-Riesgo	69
2.-Histología.	70
2.1.- Tipos histológicos	70
2.2.- Variables histológicas	73
2.2.1.- Hiperplasia vascular	73
2.2.2.-Necrosis tumoral	74
3.- Estudio inmunohistoquímico	76
3.1.- PGFAP	76
3.2.- NEUROFILAMENTOS	76
3.3.- Ki67	79
3.4.- P 53	80
4.- Resultados del estudio molecular	83
4.1.- Genes estudiados	83
4.2.- Estudios de expresión mediante RT-PCR	87
4.3.- PCR semicuantitativa	94
4.4- Búsqueda de mutaciones en el gen RILP	99

VI. DISCUSIÓN	101
1.-Introducción.	101
2.-Meduloblastoma: tumor embrionario de etiopatogenia desconocida, posible gen supresor de tumores en 17p	103
3.- Características clínicas y epidemiológicas de la serie	107
4.- Histopatología	109
4.1.- Hiperplasia vascular	109
4.2.- Necrosis tumoral	110
5.- Estudio inmunohistoquímico	111
5.1.- PGFAP	111
5.2.-Neurofilamentos	112
5.3.- P 53	112
5.4.- Ki67	113
6.- Estudio de expresión de genes alojados en 17p en muestras tumorales de meduloblastoma	116
7.- Estudio de PCR semicuantitativa de los genes RILP y RUTBC	122
8.- Búsqueda de mutaciones del gen RILP	125
VII. CONCLUSIONES	127
VIII. BIBLIOGRAFÍA	129

I. INTRODUCCION

1.- GENES Y CANCER

1.1- Generalidades

La transformación neoplásica es un fenómeno multifactorial que se origina a consecuencia de la alteración o mutación inicial de un gen. Dicha mutación puede inducir la oncogénesis por diferentes vías: alterando el control del ciclo celular, la proliferación y diferenciación celular o la interacción célula a célula, con lo que se produce la transformación de una célula biológicamente normal en neoplásica. En la capacidad de invasión y diseminación de un tumor se verán implicadas nuevas mutaciones [1].

Como es bien sabido, las neoplasias son monoclonales, es decir derivan de una sola célula, aunque esto no significa que las células de un tumor sean genéticamente idénticas pues en el proceso de oncogénesis se acumulan sucesivas alteraciones genéticas. Aquellas células que van adquiriendo alteraciones en su material genético que le confieran una ventaja en su desarrollo serán seleccionadas y mayoritarias en el tumor.

El cáncer es por tanto una enfermedad genética, ya que es consecuencia de alteraciones en la estructura o función de los genes. No obstante, el cáncer no es una enfermedad hereditaria en la mayoría de los casos, ya que las alteraciones genéticas neoplásicas son en su mayoría somáticas y no hereditarias. Únicamente si las mutaciones o cambios en los genes aparecen en las células de la línea germinal se transmiten de manera directa a la descendencia.

El crecimiento y proliferación celular son procesos sometidos a un control estricto que mantiene el equilibrio entre proliferación, diferenciación y apoptosis. El paso de una célula a través del ciclo celular, es un proceso sometido a una regulación estrecha con diversos puntos de control cuya alteración puede traducirse en un exceso de proliferación, fallos en el proceso de muerte celular programada o ausencia de diferenciación. La regulación del ciclo celular es ejercida a través de las quinasas, enzimas capaces de fosforilar proteínas provocando un cambio en la actividad o estructura de las mismas. Las quinasas que coordinan los procesos del ciclo celular son las quinasas dependientes de ciclinas (CDK's), ya que su actividad está regulada por la asociación reversible de otras proteínas, las ciclinas. Durante las distintas fases del ciclo celular se forman y destruyen

diferentes complejos activos de ciclinas y quinasas cuya actividad, a través de la fosforilación de proteínas, dirige el ciclo celular.

El control del ciclo celular se ejerce a varios niveles: en la transcripción de los genes de las ciclinas, en la degradación de las mismas y en la inhibición de su actividad mediante la fosforilación de las CDK's. Otro mecanismo de regulación crucial es el que inhibe directamente la actividad de las CDK's a través de los llamados inhibidores de complejos ciclinas-quinasa dependiente de ciclina (CDIs). Los CDIs funcionan como supresores de tumores ya que bloquean el ciclo de proliferación celular.

Mayoritariamente, la proliferación celular está regulada por factores de crecimiento que bien activan la división celular, la inhiben o regulan la diferenciación. Los factores de crecimiento actúan mediante la unión reversible y con alta afinidad a receptores que se encuentran en la membrana o en el núcleo celular y que en su mayoría poseen actividad quinasa. Como consecuencia de la unión de los factores de crecimiento a sus receptores, se inducen una serie de procesos bioquímicos que se traducen en una señal mitogénica que induce la división celular. Las células neoplásicas pierden la restricción de su crecimiento e incluso son independientes de los factores de crecimiento.

La regulación de la proliferación y diferenciación celular también es ejercida por los contactos intercelulares y con los componentes de la matriz extracelular. Varios componentes de las estructuras de unión intercelular parecen ser producto de genes supresores tumorales. La pérdida de la adhesividad celular es un requisito previo a la capacidad invasiva de una neoplasia y, además, las células cancerosas tienen también alterada su unión a la matriz extracelular.

Por último, la muerte celular programada o apoptosis también juega un papel crucial en la oncogénesis ya que su inhibición puede inducir al desarrollo de células neoplásicas.

1.2.- Tipos de genes implicados en el cáncer

Las mutaciones causantes de los procesos que conducen a la aparición de un cáncer tienen lugar en tres tipos de genes: **proto-oncogenes, genes supresores de tumores y genes de reparación del DNA** [2](revisado de Muñoz et al ,1997).

1.2.1 Oncogenes

Los oncogenes son genes cuya acción promueve positivamente la proliferación celular [3]. En condiciones normales, estos genes se denominan proto-oncogenes y las formas mutantes son los llamados oncogenes, que son excesiva o inapropiadamente activos de forma que un simple alelo mutante puede afectar al fenotipo celular. La mayor parte de los productos de los proto-oncogenes están implicados en la proliferación celular: **factores de crecimiento** o sus receptores, **factores de transcripción** que regulan la expresión de genes esenciales en la proliferación e invasividad celular y de transducción de la señal mitogénica, **componentes del sistema de las ciclinas, quinasas** dependientes de ciclinas e inhibidores de quinasas que regulan el ciclo celular.

La activación de los oncogenes implica una ganancia de función bien cuantitativa o cualitativa. Si la activación es cuantitativa, se produce un incremento de la transcripción y traducción del producto del gen no alterado. La activación cualitativa puede ocurrir como consecuencia de una mutación que da lugar a un producto génico modificado o de un reordenamiento cromosómico que da lugar a un nuevo gen quimérico.

Los tipos de mutaciones que pueden activar un proto-oncogen son múltiples:

- mutación puntual que origina un cambio en un solo aminoácido de la proteína que codifica
- deleción de un fragmento del gen que ocasione la síntesis de una proteína truncada o con función alterada
- amplificación del número de copias de un gen con sobreexpresión de la proteína que codifica
- translocación que implica una nueva localización del proto-oncogen que puede ocasionar la síntesis de proteínas anormales, truncadas o fusionadas.

1.2.2 Genes supresores de tumores

Los genes cuya función normal es controlar el ciclo de división celular evitando el crecimiento excesivo y que promueven el mantenimiento de las características celulares que especifican su localización en un tejido son los genes supresores de tumores (GST) [3].

Su descubrimiento se basó en la existencia de pérdidas de cromosomas, fragmentos de los mismos y deleciones de DNA en las células neoplásicas que sugirieron la existencia de genes que inhiben la aparición de cánceres, y cuya pérdida está implicada en la oncogénesis. Los genes supresores de tumores son **recesivos** en cuanto a la generación de tumores, puesto que se necesita la mutación y/o deleción de los dos alelos del gen **para que la célula se transforme en neoplásica**. Existen sin embargo excepciones a esta regla, por ejemplo, en el gen TP53 que es funcionalmente un gen supresor de tumores, se han descrito mutaciones con un efecto dominante negativo. [4]

Actualmente se conocen por estudios funcionales numerosos genes supresores de tumores [5-15], algunos de los cuales se han encontrado mutados o delecionados en tumores humanos. La función molecular de los productos de dichos genes puede actuar interfiriendo en las moléculas de adhesión celular o bien estar implicados en el control de la progresión del ciclo celular como reguladores negativos.

1.2.3.- Genes de reparación del DNA

Esta tercera categoría de genes que se encuentran con frecuencia mutados en las células cancerosas, no forman parte de las vías de control del ciclo celular como los oncogenes y genes supresores. Estos genes tienen la **función general de asegurar la integridad de la información genética**, y sus mutaciones implican una replicación y reparación del DNA ineficaces. Al igual que los genes supresores de tumores, las mutaciones en los genes de reparación del DNA son **recesivas**.

Dado que el primer evento en el desarrollo de un tumor es una alteración genética, el estudio de las alteraciones moleculares del cáncer es prioritario en el conocimiento de la biología tumoral y de los mecanismos implicados en la génesis, crecimiento y progresión de una neoplasia.

Debido al reciente avance de las técnicas de citogenética y biología molecular, así como el descubrimiento de nuevos genes y secuencias del genoma humano, el estudio a nivel molecular del cáncer nos permite:

- **El reconocimiento de alteraciones específicas con interés diagnóstico o de detección de enfermedad mínima residual.**
- **La determinación de factores genéticos con una implicación pronóstica que puedan ser incluidos en el protocolo de estudio del tumor y que incluso impliquen una modificación de dosis e intensidad del tratamiento.**
- **El descubrimiento de alteraciones que indiquen sensibilidad/resistencia a tratamientos o dianas terapéuticas y diseño de nuevos fármacos.**

En resumen, el estudio a nivel molecular de las neoplasias puede mejorar el diagnóstico, el manejo clínico del enfermo e incluso permite plantear nuevas estrategias terapéuticas [16].

1.3.- Estrategias de búsqueda e identificación de genes implicados en cáncer.

El proceso de identificación de genes implicados en neoplasias humanas comprende diferentes fases;

1.3.1.- Estudios citogenéticos

Las diversas técnicas de citogenética han sido muy útiles a la hora de buscar genes implicados en cáncer. Las células tumorales tienen típicamente cariotipos muy alterados con múltiples pérdidas o ganancias cromosómicas, translocaciones etc. La mayoría de estos cambios son al azar y reflejan una inestabilidad genómica general que forma parte de la carcinogénesis, aunque existen cambios citogenéticos característicos para un tipo de tumor [17-23].

Una alteración cromosómica que se repite en un determinado tipo de tumor puede indicar la localización de un gen implicado en la génesis del mismo [24]. Estos cambios pueden ser numéricos (pérdida o duplicación de un cromosoma entero) o estructurales (traslocaciones, deleciones, inserciones). Las alteraciones numéricas sugieren la posible localización cromosómica de un gen o genes implicados en cáncer. Las alteraciones estructurales permiten una delimitación regional más precisa y son más útiles para la localización de genes. Prácticamente todas las bandas del complemento cromosómico humano están aparentemente implicadas en reordenamientos cromosómicos asociados a neoplasias [25] y están descritos en la literatura múltiples reordenamientos cromosómicos que unen secuencias no relacionadas normalmente. El aislamiento de las secuencias flanqueantes de estos puntos de corte ha permitido la identificación de numerosos genes implicados en tumores. Algunas deleciones detectables citogenéticamente también han indicado la localización de posibles genes supresores de tumores. De esta forma **la citogenética, ofreciendo información sobre qué regiones cromosómicas son importantes en un determinado tipo de tumor, proporciona puntos clave hacia los que dirigir los estudios moleculares** [23].

1.3.2.- Estudios moleculares; establecimiento de región mínima de pérdida

El rápido desarrollo de las técnicas de biología molecular, fundamentalmente la PCR y la secuenciación, más recientemente toda la tecnología de arrays o microchips de DNA y RNA, ha supuesto un gran avance en la identificación

de genes implicados en cáncer. El análisis de las regiones amplificadas, los estudios de ligamiento en casos familiares, los estudios de pérdida de heterocigosis en los tumores, y más recientemente el estudio de alteraciones epigenéticas, han sido claves para la identificación de diversos oncogenes y genes supresores de tumores [26].

Para caracterizar los segmentos cromosómicos afectados se pueden utilizar diversas técnicas de biología molecular. Una de las más fidedignas es el **estudio de pérdida de heterocigosis (LOH)** en el tumor [27-32], que identifica la pérdida de un alelo funcionalmente normal en un locus heterocigoto, es decir, nos sirve para identificar exactamente qué secuencias de DNA han perdido la información genética contenida en uno de sus cromosomas homólogos.

La pérdida de heterocigosis puede ser el resultado de diversos mecanismos, como eventos cromosómicos que afecten a múltiples loci (deleción, recombinación mitótica, pérdida por no disyunción cromosómica) o un evento restringido a un locus (conversión génica o inactivación alélica por factores epigenéticos). De esta forma un locus heterocigoto en origen puede transformarse en:

- homozigoto por recombinación mitótica, conversión génica o pérdida cromosómica con reduplicación
- hemizigoto por deleción o pérdida cromosómica sin reduplicación.
- heterozigoto compuesto por la adquisición de una mutación puntual distinta en el segundo alelo.

Para localizar en el cromosoma la extensión de las pérdidas alélicas tradicionalmente se ha utilizado un panel de microsatélites o marcadores de tipo RFLP (restriction fragment length polymorphism) [27, 29, 33]. Comparando las diferencias en la segregación de estos marcadores polimórficos en el DNA tumoral y el constitucional obtenido a partir de sangre periférica.

Los **genes supresores de tumores son genes recesivos** [3], sin embargo, si se hereda una copia mutante de un gen a través de la línea germinal o bien se adquiere una mutación de forma somática, la pérdida somática subsecuente del alelo restante desenmascara esta mutación, confiriendo un potencial tumorigénico a la célula. Por ello, **cuando en un tipo de tumor se encuentra frecuentemente pérdida de heterocigosis en una región cromosómica, se piensa que esta región puede albergar algún gen supresor de tumores implicado en la génesis del tumor** [15, 34].

Por ello, en el estudio de una determinada neoplasia que se caracteriza por presentar de modo característico pérdidas alélicas, el análisis de extensión de las mismas permite establecer una **región mínima de pérdida** [32, 35, 36], es decir la **región cromosómica más pequeña común a todos los casos con pérdida de material cromosómico, que constituirá el punto de partida para la identificación de los genes implicados.**

1.3.3.- Identificación de genes candidatos: estudio de expresión y caracterización de mutaciones puntuales.

Una vez establecida la región mínima de pérdida, se procede al análisis de aquellos genes localizados en dicha región que sean potencialmente genes supresores, bien por su localización, función u homología con otros genes conocidos.

Para ello pueden utilizarse diferentes metodologías, una de las más sencillas es el estudio de **expresión de dichos genes en el mRNA de las células tumorales** [37]. Cuando en una determinada neoplasia la expresión de un gen se encuentra alterada, podemos en principio pensar en una implicación de dicho gen en la misma. Si la expresión de un gen o genes se encuentra ausente en un tejido en el que debería encontrarse expresión, los consideraremos como posibles candidatos. Esta ausencia de expresión, puede deberse a distintos factores;

- delección del gen
- inactivación por procesos epigenéticos
- mutaciones de parada
- mutaciones que alteran el procesamiento del RNA
- microdeleciones y microinversiones
- alteración en los procesos de regulación génica, etc.

Cuando se detecta la expresión aberrante de un gen se realizan nuevos tipos de estudios para valorar la presencia de mutaciones tales como deleciones, reagrupamientos y mutaciones puntuales, mediante técnicas de hibridación, PCR semicuantitativa, análisis de SSCPs y secuenciación.

2.- TUMORES INFANTILES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

2.1.- Generalidades

2.1.1. Embriología Sistema Nervioso Central

El desarrollo embrionario del sistema nervioso central se inicia al comienzo de la tercera semana de vida intraútero con la formación de la **placa neural**. De ella derivan los pliegues neurales que constituyen al fusionarse en la línea media el tubo neural que forma tres dilataciones o vesículas encefálicas primarias; **prosencefalo, mesencefalo y rombencefalo** o cerebro posterior. El rombencefalo está a su vez constituido por dos partes, el metencefalo que más adelante forma la protuberancia y el cerebelo y el mielencefalo [38].

La pared del tubo neural está constituida por un grueso epitelio pseudoestratificado cuyas células se dividen rápidamente dando lugar a la capa neuroepitelial o neuroepitelio. Una vez se ha cerrado el tubo neural, las células neuroepiteliales se diferencian a neuroblastos, posteriormente a glioblastos y por último a células endimarias.

2.1.2 Cerebelo: embriología y anatomía

En el embrión de 12 semanas la placa cerebelosa que origina el cerebelo y procede del metencefalo, presenta una porción en la **línea media o vermis y dos porciones laterales o hemisferios cerebelosos**. En una etapa inicial dicha placa, está constituida por las capas neurepitelial, del manto y marginal. Posteriormente parte de las células del neurepitelio migran a la superficie cerebelosa y forman la capa granulosa externa localizada en la superficie del córtex cerebeloso. En el sexto mes del desarrollo, la capa granulosa externa libera diferentes tipos celulares que emigran hacia las células de Purkinje en proceso de diferenciación y dan lugar a las diferentes capas del córtex cerebeloso, que alcanza sus dimensiones definitivas después del nacimiento.

El cerebelo así queda constituido por tres compartimentos, **córtex, médula y núcleos profundos**. A su vez el córtex cerebeloso se divide en tres capas; capa molecular, capa de células de Purkinje y capa de células granulares. En el **cerebelo fetal** por tanto existe una **capa adicional granular externa**

localizada en la superficie del córtex cerebeloso, que desaparece al final del primer año de vida (revisado de Langman Embriología Médica) [38].

2.1.3 Neoplasias pediátricas

Las neoplasias de la edad pediátrica difieren en muchos aspectos de las de los adultos; son menos frecuentes, histológicamente se asemejan a estructuras indiferenciadas y no a tejidos plenamente desarrollados y al contrario de los adultos, los factores ambientales no parecen ser los causantes del daño genético en los tumores pediátricos [39].

Actualmente a partir del primer año de vida, el cáncer es la segunda causa de mortalidad infantil tras los accidentes. En la edad pediátrica y [16] las neoplasias del sistema nervioso son las segundas en frecuencia tras las leucemias, representando el 25% de los tumores infantiles [15, 40] siendo los más frecuentes astrocitomas y tumores embrionarios.

2.2.- Clasificación de los tumores del sistema nervioso

A grandes rasgos el tejido nervioso consta fundamentalmente de neuronas encargadas de la transmisión del impulso nervioso y células gliales o de sostén que se encuentran en número muy superior a las neuronas. Las células gliales del SNC se agrupan en cuatro tipos; astrogía que proporciona sostén mecánico, metabólico e iónico a los circuitos neuronales, la oligodendrogía que constituye a grandes rasgos las vainas aislantes de mielina alrededor de las prolongaciones neuronales, las células ependimarias que revisten las cavidades internas del sistema nervioso y la microglía que participa en la inmunidad celular.

Según las últimas revisiones de la OMS [41, 42] los tumores del Sistema Nervioso Central se clasifican según las distintas estirpes celulares de las que proceden;

1. Tumores del tejido neuroepitelial

- Tumores astrocíticos
- Tumores oligodendrogiales
- Tumores oligoastrocíticos
- Tumores ependimarios y de plexos coroideos
- Otros tumores neuroepiteliales
- Tumores neuronales- neuronales gliales
- Tumores de la glándula pineal
- **Tumores embrionarios**

2. Tumores de los nervios craneales y paraespinales

3. Tumores de las meninges

4. Linfomas y neoplasias hematopoyéticas

5. Tumores de las células germinales

6. Tumores de la región sellar

7. Metástasis

2.3.- Tumores embrionarios

Los tumores embrionarios constituyen un conjunto de neoplasias de histogénesis y clasificación aún controvertida [43, 44]. Clínicamente son muy agresivos, suelen aparecer en la primera década de la vida y comparten las siguientes características histológicas: son tumores de células “**pequeñas, redondas y azules**” con elevada celularidad, frecuentes mitosis y presencia de necrosis tumoral al menos focal. Biológicamente, los tumores embrionarios tienen propensión a la diseminación leptomeníngea y por el neuroeje y mal pronóstico[40, 43]. Proceden de la transformación de las células inmaduras o progenitoras del neuroepitelio y pueden presentar diferenciación fenotípica diversa o multipotencial (divergente neuronal-glial)[45] .

Según la última clasificación de la OMS [41] los **tumores embrionarios** se dividen en

- **Meduloblastoma**
- Tumor neurectodérmico primitivo (PNET) supratentorial
- Tumor rabdoide

El término **PNET engloba a los tumores que proceden de las células progenitoras primitivas del neuroepitelio, que comparten similares rasgos histopatológicos y comportamiento clínico agresivo** [41, 42]. Comprenden aproximadamente el 25% de los tumores del SNC en la edad pediátrica [40].

El meduloblastoma es el **PNET** de fosa posterior (cerebelo y cuarto ventrículo) y el más frecuente de ellos (85%) [32, 46, 47]. Histológicamente es indistinguible de los PNET supratentoriales. De modo simplificado, cuando un PNET se localiza en fosa posterior, lo denominaremos meduloblastoma.

3.- MEDULOBLASTOMA

3.1.- Definición

Según el libro de la OMS de los tumores de el sistema nervioso central [41, 42] el meduloblastoma es *“un tumor embrionario del cerebelo, maligno e invasivo, que aparece preferentemente en niños, que muestra predominantemente diferenciación neuronal y tendencia a metastatizar y diseminarse a través del líquido cefalorraquídeo”*.

3.2.- Epidemiología

Es el **tumor embrionario más frecuente y el tumor maligno de fosa posterior más frecuente en niños [48]**. En Europa, representa el 15-20% de los tumores del SNC en la infancia [40]. La edad media de la población infantil suele estar entre los 5 y 9 años [49, 50]. La mayoría de los enfermos de más edad se suelen encontrar entre los 16 y 50 años siendo excepcional su presentación en edades más avanzadas [51]. Su aparición en el periodo neonatal es poco frecuente. La distribución por sexos presenta un claro predominio masculino, en una proporción que oscila entre 1.7:1 y 2:1 según las diferentes publicaciones [52].

3.3.- Etiología y susceptibilidad genética

Su etiología es desconocida.

Aunque no se han encontrado factores ambientales relacionados directamente con este tumor Farwell y cols. observaron un aumento de la incidencia de meduloblastomas entre los años 1955-1961 que se relacionó con la exposición intraútero al **Papovavirus SV40** presente en las vacunas de la polio utilizadas en este periodo [53]. Posteriormente se ha relacionado el **Poliomavirus JC** en la génesis de esta neoplasia, ya que se han descrito del secuencias de DNA viral en los tumores y se ha demostrado por inmunohistoquímica la presencia del antígeno T (oncoproteína viral) en las muestras histológicas del meduloblastoma [54].

Ocasionalmente se desarrollan en el contexto de **otras malformaciones congénitas** como malrotación intestinal, onfalocele y extrofia vesical y el síndrome de Coffin-Siris (retraso mental, retraso de crecimiento postnatal, laxitud ligamentosa, braquidactilia del quinto dedo con ausencia del lecho

ungueal [55]. Otros estudios sugieren que los familiares de los enfermos con meduloblastoma tienen mayor riesgo de desarrollar otros tumores infantiles, fundamentalmente leucemias y linfomas [56]. Sato, en su trabajo sobre 154 tumores del sistema nervioso en neonatos, encontró 12 casos de meduloblastoma asociados a malformaciones en su mayoría encefálicas [57].

La **incidencia familiar** de el meduloblastoma es muy baja y suelen ser tumores **esporádicos**, aunque también se han descrito en el contexto de **síndromes hereditarios: síndrome del Gorlin** [58] [59] (carcinoma basocelular nevoide), **síndrome de Turcot** [60, 61] (poliposis intestinal adenomatosa familiar) y pacientes con mutaciones germinales de el gen P53 [62]. De forma muy excepcional se ha asociado a la Neurofibromatosis [63]. **Se han realizado estudios en los genes alterados en estos síndromes hereditarios no existiendo suficiente evidencia como para implicarlos en la patogenia del tumor.**

3.4.- Histogénesis

Bailey y Cushing reconocen el meduloblastoma como entidad clínico patológica en 1925 considerando que estos tumores derivaban de los “meduloblastos”, células embrionarias indiferenciadas con capacidad de proliferación y diferenciación a espongioblastos y neuroblastos [64]. Dichas células precursoras no se han podido identificar claramente en posteriores estudios neuroanatómicos del SNC [65]. La histogénesis del meduloblastoma ha sido por ello tema de controversia durante 75 años y su origen aún permanece sin resolver [66], ya que en el cerebelo no se ha encontrado ningún tipo celular específico que pueda denominarse “meduloblasto” al que se pueda imputar su génesis.

Se postulan tres posibles hipótesis;

1. En 1970, Kadin propuso la procedencia del meduloblastoma a partir de la capa de **células granulares externa del cerebelo** [67] que persiste hasta el final del primer año de vida, ya que las células del meduloblastoma son histológicamente similares y con frecuencia se observa continuidad entre los agregados de células tumorales subpiales y los restos de esta capa fetal.
2. La segunda hipótesis asume que el meduloblastoma es un PNET y por tanto deriva de las células **stem pluripotenciales** de la matriz subependimaria con capacidad de diferenciación neuronal y glial [68]. El concepto de PNET implica que tanto el meduloblastoma como los PNET

supratentoriales se originan de una célula precursora común, sin embargo y como comentaremos más adelante, a nivel citogenético y molecular muestran diferentes alteraciones, lo cual va en contra de esta hipótesis.

3. Una tercera hipótesis propone que los meduloblastomas **pueden proceder de más de un tipo celular** [45]. En base a estudios de inmunorreactividad en los tumores a la calbindina –D 28K (proteína transportadora de calcio asociada a las neuronas de la matriz ventricular) y la beta-tubulina clase III, se sugiere que los meduloblastomas de tipo clásico proceden de la matriz ventricular/velum medulare, mientras que los de tipo desmoplásico se originan a partir de las células de la capa granular externa del cerebelo [66, 69].

3.5. -Histopatología

3.5.1 Macroscopía

Se localizan usualmente en el vérmis cerebeloso expandiéndose al IV ventrículo, aunque algunos de ellos (sobre todo el tipo desmoplásico y en edad adulta) pueden aparecer en los hemisferios [41, 42].

Se trata de lesiones bien delimitadas, de consistencia blanda y coloración gris rosada, friables y con necrosis e incluso cavitación. En la variante desmoplásica la consistencia puede ser más firme. Con poca frecuencia presentan calcificación o hemorragia masiva.

3.5.2 Microscopía

Son neoplasias de alta densidad celular y elevado índice mitótico, constituidas por células pequeñas, redondas y azules, es decir, **células pequeñas, con muy escaso o nulo citoplasma y límites celulares mal definidos** [42] . Los núcleos son hipercromáticos y característicamente poseen una membrana irregular con forma angulada u ovoide (figura 1). La morfología de las células neoplásicas permite diferenciarlas de las células granulares normales del cerebelo.

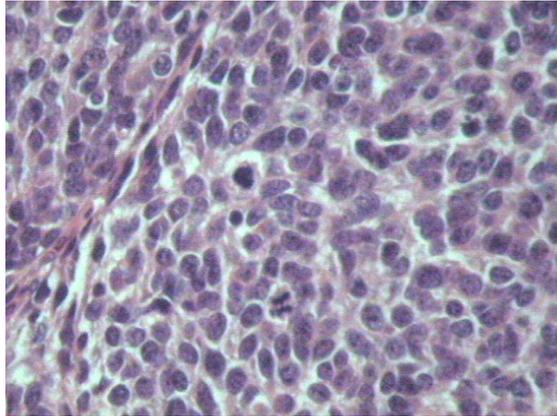


Figura 1: Neoplasia de células pequeñas redondas y azules con escaso citoplasma y frecuentes mitosis (H-E 400 x).

El meduloblastoma es una neoplasia que histológicamente muestra con frecuencia **núcleos apoptóticos** [70] que se reconocen en H-E como pequeñas masas compactas redondeadas y se corresponden a necrosis tumoral individual. La necrosis en pseudoempalizada es más característica de los tumores gliales y se observa de modo infrecuente. En casos muy aislados existe cavitación (típica del astrocitoma pilocítico), hemorragia o calcificación.

Aunque el meduloblastoma es un tumor histológicamente agresivo, por lo general la **proliferación vascular** no es muy llamativa a diferencia de los gliomas de alto grado. El patrón vascular habitual es de vasos de pequeño calibre y paredes finas (figura 2) observándose en muy pocos casos la hiperplasia vascular glomeruloide típica de los gliomas de alto grado [71] [72].

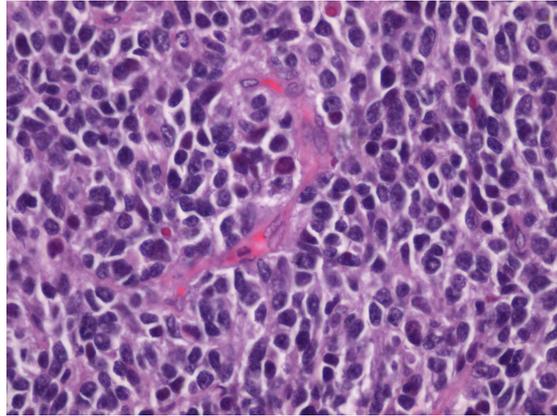


Figura 2: Patrón vascular típico del meduloblastoma con vasos de pequeño calibre y paredes finas (H-E 400 X)

El meduloblastoma es un tumor neuroepitelial indiferenciado con capacidad de diferenciación divergente neuronal-glial [45, 73] mostrando heterogeneidad morfológica e inmunofenotípica.

La **diferenciación neuroblástica** es la predominante e identificable histológicamente si existen rosetas de Homer Wright u ordenamiento radial de las células alrededor de procesos fibrilares [74]. Rara vez se pueden identificar células ganglionares maduras intratumorales [66].

La valoración morfológica de la **diferenciación glial** es más compleja [75, 76]. El estudio inmunohistoquímico es de utilidad para poner de manifiesto la presencia de diferenciación hacia una u otra estirpe aunque debe interpretarse con cautela [77].

Según el último libro de la OMS de Tumores del Sistema Nervioso [41, 42] histológicamente se contemplan las siguientes variantes:

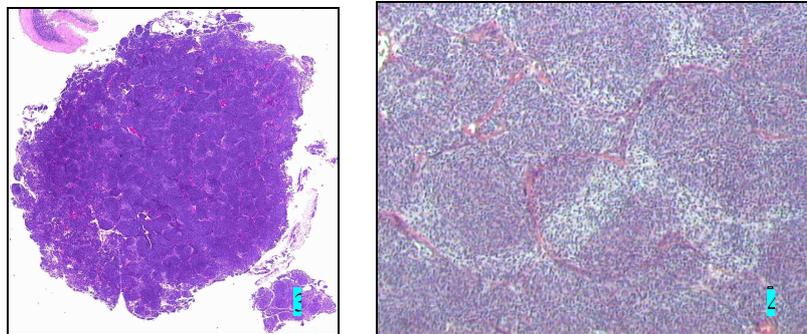
-Clásico

Es la variedad más frecuente. [41, 42] Son tumores muy celulares constituidos por células pequeñas, indiferenciadas, dispuestas en sábana con núcleos densos, hipercromáticos, redondos o angulados y con tendencia a amoldarse. La arquitectura puede ser fasciculada o discretamente fusocelular y los núcleos se disponen en pseudorrosetas perivasculares o empalizadas. El estroma es escaso, con aislados vasos pequeños sin cambios hiperplásicos ni

glomeruloides. Muestra permeación difusa del parénquima en vecindad con extensión subaracnoidea y penetración por espacios subpiales.

-Desmoplásico

Aunque también puede aparecer en niños y en la localización habitual, es la variante más frecuente en la edad adulta y de localización en hemisferios y tiene mejor pronóstico. Macroscópicamente es de consistencia más firme ya que posee un estroma colagenizado que delimita las células tumorales en nódulos. Esta reacción del estroma se ha interpretado como reacción mesenquimal de defensa de las leptomeninges a la permeación tumoral. Histológicamente presenta un patrón micronodular que recuerda al ganglio linfático con hiperplasia folicular (figura 3) mostrando patrón bifásico que alterna sábanas de alta densidad celular e islas pálidas centrales hipocelulares [78](figura 4) y con ausencia de trama reticulínica [70, 74, 79].



Figuras 3 y 4: Imagen panorámica del patrón micronodular característico del tipo desmoplásico (H-E 25 x) con alternancia de en densidad celular con formación de islas pálidas (H-E 200 x).

Las células en las islas pálidas son monomorfas, presentan matriz fibrilar entre ellas y muestran inmunoreactividad para neurofilamentos y tubulina neuronal [66]. Los meduloblastomas que muestran únicamente incremento de colágeno y trama reticulínica sin patrón nodular no se incluyen en esta variante histológica.

-Células grandes

Son muy infrecuentes y de curso clínico muy agresivo. Están constituidos por células grandes, poligonales, de citoplasma eosinófilo con tendencia a

amoldarse y núcleos vesiculosos de prominente nucleolo. El índice mitótico es muy elevado y existe amplia necrosis tumoral. Algunos autores clasifican los meduloblastomas en **anaplásicos** y no anaplásicos en las series publicadas [80] considerándose en las últimas clasificaciones al meduloblastoma anaplásico como un tipo histológico independiente [41]. Está descrita en la literatura inmunorreactividad para **P53** en relación a este tipo histológico [81]. Es el de peor pronóstico y algunos autores defienden que la anaplasia es el rasgo histológico con mayor valor pronóstico en este tumor [82, 83].

-Meduloblastoma con extensa nodularidad y diferenciación neuronal avanzada (también llamado neuroblastoma cerebelar)

Se presenta en menores de tres años y es un tumor con patrón histológico nodular prominente. Las células en los nódulos son uniformes y están inmersas en matriz fibrilar recordando a las células del neurocitoma central. También se pueden observar células ganglionares maduras y ocasionalmente desarrollan maduración en este sentido por lo que se han llegado a considerar un grupo histopatológico diferente [84].

-Otras variantes histológicas incluyen tumores con diferenciación a músculo estriado (**Medulomioblastoma**), tumores con acúmulo de lípidos (**Medulocitoma**) y raras formas papilares y pigmentadas (**Melanocítico**) e incluso puede aparecer diferenciación condroide, lipoblástica o adipocítica.

3.6.- Inmunohistoquímica

El estudio inmunohistoquímico es de utilidad diagnóstica y para determinar la presencia de posible diferenciación (neuronal-glial) en el tumor [45, 69, 73, 85, 86].

3.6.1. –Sinaptofisina

Es un marcador de diferenciación neuronal siendo negativo en tumores gliales y mesenquimales. El meduloblastoma muestra inmunorreactividad de modo característico, siendo mayor la intensidad en los nódulos y rosetas neuroblásticas [80] [78, 87].

3.6.2. -Proteínas de filamentos intermedios (FI)

1. **Nestina:** marcador de células precursoras del SNC que se expresa en las células progenitoras del neuroepitelio durante la embriogénesis y que se negativiza en el curso de la gestación [85]. Está descrita positividad a la nestina en diversos tumores cerebrales [88] (meduloblastoma, astrocitoma, glioblastoma multiforme, ependimoma etc.)
2. **Vimentina** Es un FI intensamente positivo en el meduloblastoma [48] [86].
3. **Proteína gliofibrilar ácida (GFAP):** Su expresión está restringida a los astrocitos. Es el marcador comúnmente empleado para poner de manifiesto la diferenciación glial en una neoplasia [74, 89]. La mayoría de los meduloblastomas muestran positividad focal para GFAP[48, 86]. Aunque algunos estudios plantean la posibilidad de que se trate de astrocitos atrapados, también se ha observado positividad en las metástasis de meduloblastomas tanto en el tipo clásico como en el desmoplásico [90] [76], lo cual pone de manifiesto áreas de diferenciación glial en estas neoplasias [75].
4. **Neurofilamentos (NF):** son indicadores específicos de diferenciación neuronal y su expresión en el meduloblastoma se ha utilizado para identificar células tumorales con dicha diferenciación [85, 91, 92]. En el meduloblastoma desmoplásico es característica la positividad intensa en las **islas pálidas** [66] que se corresponden a áreas de diferenciación neuronal, no obstante en algunos casos de meduloblastomas con rasgos histológicos de diferenciación en este sentido la expresión de neurofilamentos no se observa o es focal [86, 93].

3.6.3. -P53

En las células en condiciones normales el nivel de P-53 es bajo, sin embargo, la mutación del gen que codifica esta proteína produce un acúmulo de la proteína mutante, con mayor vida media y que puede ser

detectada por medios inmunohistoquímicos, aunque debe tenerse en cuenta que fenómenos epigenéticos puede conducir también al acúmulo de esta proteína. Está descrita por diversos autores alteraciones en la expresión inmunohistoquímica de P53 [94, 95] con posibles implicaciones pronósticas [81] [96]. Eberhart refiere en un estudio expresión inmunohistoquímica para P53 más débil a nivel de las islas pálidas del tipo histológico desmoplásico y de mayor intensidad en la periferia de las mismas [70].

3.6.4. -Bcl-2

El proto-oncogen Bcl-2 regula la apoptosis. Se expresa inmunohistoquímicamente en el 30% de los meduloblastomas. Está descrito que tumores con expresión de Bcl-2 muestran rasgos histológicos de diferenciación neuronal [97].

3.6.5. -Otros anticuerpos: proteína S-100, enolasa, moléculas de adhesión neural (NCAM), proteínas de células fotorreceptoras, factor de crecimiento neural (NGF) muestran positividad variable en esta neoplasia [48, 75, 86, 93].

3.6.6.- Ki 67 (MIB-1)

Es un marcador de proliferación celular que se expresa en las células de todas las fases del ciclo celular excepto en G0. Este anticuerpo permite determinar la fracción de crecimiento del tumor (fracción de células que expresan Ki67) [98].

3.7.- Microscopía Electrónica

En las áreas de diferenciación neuroblástica [99] como rosetas o islas pálidas se identifican expansiones citoplásmicas neurita-like y placas de adhesión [100]. No se observan vesículas electrodensas ni sinapsis. En las áreas de diferenciación glial se observan abundantes filamentos intermedios. En las zonas indiferenciadas no existen rasgos ultraestructurales específicos [101].

3.8.- Clínica y comportamiento biológico

Los signos y síntomas más precoces y frecuentes son los derivados del aumento de presión intracraneal a causa de la obstrucción del IV ventrículo [102] ; cefalea, vómitos, letargia y edema de papila. Posteriormente aparecen síntomas más característicos derivados de la propia alteración cerebelar (ataxia y dificultad de la prensión de objetos) o de la afectación de pares craneales y extensión a tronco cerebral.

El curso biológico del meduloblastoma es la diseminación por el líquido cefalorraquídeo al espacio subaracnoideo espinal, cisternas craneales y ventrículos cerebrales [103]. Las metástasis en raquis aparecen entre el 20 y 30 % de los casos siendo las supratentoriales menos habituales.

El meduloblastoma es el tumor del SNC con mayor incidencia de **metástasis extraneurales** [104]. La más frecuente es la ósea con predominio del esqueleto axial [105]. Le siguen en frecuencia metástasis ganglionares, en partes blandas y vísceras. Suelen aparecer en los tres primeros años tras el diagnóstico y en su patogenia está relacionada la cirugía y el uso de procedimientos derivativos [106] [107] [108].

3.9.- Diagnóstico

-TAC: Es el método de imagen más empleado para el diagnóstico inicial [109]. Las características radiológicas descritas por diversos autores definen el meduloblastoma como una masa bien definida, hiperatenuada previamente a la administración de contraste y con captación difusa homogénea tras el mismo que suele asociar edema perilesional e hidrocefalia. La mayoría se sitúan en el vermis medio e inferior [110].

-RMN: Determina con más precisión la extensión del tumor, la relación con estructuras vecinas y su diseminación [111-113]. En las imágenes ponderadas en T1 el tumor se muestra como una masa hipointensa y en T2 la intensidad de señal es variable al igual que la captación de contraste. (figura 5).

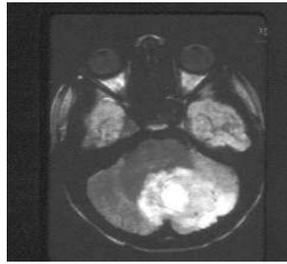


Figura 5: Imagen de RMN en T1 en la que se observa tumoración que afecta a vermis y hemisferio cerebeloso izquierdo.

3.10.- Diagnósticos diferenciales

Se establece en primer lugar con otros tumores de la fosa posterior, fundamentalmente astrocitoma cerebeloso y ependimoma. Dentro de las patologías no tumorales se puede plantear diagnóstico diferencial con absceso cerebral y encefalitis e infarto cerebral.

3.11.- Estadiaje

Chang en 1969 diseñó un sistema de estadiaje para el meduloblastoma adaptando la clasificación TNM a estos tumores, que ha sido aceptado universalmente, aún permanece vigente y figura a continuación.

T1: Tumor de diámetro menor de 3 cm. limitado a la posición típica de la línea media en la vermis, el techo del 4º ventrículo y con menor frecuencia a los hemisferios cerebrales.

T2: Tumor de diámetro mayor de 3 cm. que invade alguna estructura adyacente o que obtura parcialmente el 4º ventrículo.

T3a: Tumor que invade dos estructuras adyacentes o que obtura totalmente el 4º ventrículo con extensión en el acueducto de Silvio, el agujero de Magendie o el agujero de Luschka, produciendo una marcada hidrocefalia interna.

T3b: Tumor que se origina en el suelo del 4º ventrículo o en el tronco del encéfalo llenando el 4º ventrículo.

T4: Tumor que se extiende a través del Acueducto de Silvio hacia el 3 ventrículo del cerebro medio o hacia la parte superior de la médula espinal.

M0: No hay evidencia de metástasis.

M1: Presencia de células tumorales en el líquido cefalorraquídeo.

M2: Presencia de nódulos en el cerebro, espacio subaracnoideo cerebral, 3 ventrículo o ventrículos laterales.

M3: Presencia de nódulos en el espacio subaracnoideo espinal.

M4: Metástasis extraneuroaxial.

3.12.- Factores pronósticos:

1. **Edad:** para un gran número de autores los pacientes con menor edad (menores de tres años) presentan un comportamiento más desfavorable [114] aunque no existe unanimidad al respecto ya que otros autores no han encontrado relación entre edad y pronóstico [115] [116].
2. **Extensión tumoral:** la presencia de diseminación (células tumorales en LCR, siembra nodular en cerebelo, espacio subaracnoideo o espinal y metástasis extraneurales) es el factor pronóstico más determinante y consensado por diversos autores [117].
3. **Tipo histológico:** el meduloblastoma de **tipo desmoplásico** es el que presenta mayor supervivencia en la mayoría de las series estudiadas [118, 119]. En una serie de meduloblastomas con **extensa nodularidad**, también se ha referido mejor supervivencia relativa. Por el contrario el meduloblastoma variante de células grandes (anaplásico) es el que presenta comportamiento clínico más agresivo. La presencia de hiperplasia vascular, necrosis tumoral y elevado índice de proliferación celular se relacionan con peor pronóstico. La **diferenciación celular** en estos tumores ha sido propósito de estudio de numerosos trabajos aunque hay poco acuerdo sobre su significación pronóstica. Algunos autores han observado mejores supervivencias en tumores indiferenciados [52] [120], otros mantienen que la presencia de diferenciación o positividad para GFAP es un factor de buen pronóstico [121] y otros grupos de trabajo defienden lo contrario existiendo un tercer grupo

de autores no encuentran significación pronóstica a este respecto [122].

4. **Contenido de DNA:** está descrito en el meduloblastoma que los tumores aneuploides tienen mejor pronóstico [123] al igual que ocurre en el neuroblastoma. Esto difiere del concepto general de otras neoplasias, sobre todo en adultos, en los que suele obtenerse mejor resultado en los tumores diploides.
5. Como se comentará más adelante, el meduloblastoma presenta **alteraciones de modo característico en el brazo corto del cromosoma 17**. Diversos estudios evalúan la pérdida de heterocigosis (LOH) en 17p como factor pronóstico con resultados controvertidos. Algunos trabajos muestran correlación entre LOH en 17p y peor respuesta al tratamiento [124] y supervivencias cortas, mientras que otros investigadores no muestran relación entre estos dos parámetros [125, 126].
6. **Amplificación de MYC:** Algunos estudios muestran que los meduloblastomas con amplificación de C-MYC [127] fueron resistentes al tratamiento y mostraron peores supervivencias. [46, 83, 128]

3.13.- Tratamiento

1. **-Cirugía:** La cirugía es el primer paso en la estrategia terapéutica del meduloblastoma [129] ya que permite confirmar el diagnóstico y resuelve la hipertensión intracraneal [130].
2. **-Radioterapia:** Se irradia según los casos, todo el cerebro, raquis y fosa posterior [131]. Supone un incremento notable de la supervivencia [132] [133] .
3. **-Quimioterapia:** Las principales drogas utilizadas son inhibidores mitótico y agentes alquilantes. Las pautas del tratamiento quimioterápico son complejas y no son el propósito del presente trabajo por lo que no entraremos en ellas.

3.14.- Supervivencia

La supervivencia obtenida en este tumor ha ido mejorando a lo largo del tiempo aunque aún no se han obtenido los buenos resultados de otros tumores infantiles. Entre los años 40-60 las tasas de supervivencia eran muy bajas (4-31%) [134] y aunque han aumentado progresivamente gracias a las

mejoras de los procedimientos quirúrgicos y de anestesia, y la incorporación de quimioterapia y radioterapia al tratamiento, en la actualidad las cifras de supervivencia a los 5 años oscilan entre 40-60% disminuyendo hasta un 20% a los 10 años en los casos desfavorables [135] [136].

4.-ALTERACIONES GENÉTICAS DESCRITAS EN MEDULOBLASTOMA; POSIBLE GEN SUPRESOR DE TUMORES EN 17p.

4.1.-Alteraciones citogenéticas

La localización regional de los genes implicados en la formación y progresión de tumores comienza con los estudios citogenéticos. Una vez se ha encontrado una alteración de forma repetitiva en un determinado tipo de tumor, se considera que la región cromosómica implicada debe albergar algún gen importante en la oncogénesis. Las alteraciones que implican ganancia de material se consideran indicativas de la presencia de oncogenes, mientras que las pérdidas de material cromosómico se consideran indicativas de la presencia de genes supresores de tumores. De este modo, **los estudios citogenéticos ponen de manifiesto los puntos del genoma hacia los que deben dirigirse los estudios moleculares** y son cruciales a la hora de abordar el análisis genético de una determinada neoplasia.

Los estudios citogenéticos del meduloblastoma muestran que la mayoría de estos tumores tiene líneas celulares diploides, aunque también se han descrito algunos casos con líneas triploides o tetraploides. La mayoría de los meduloblastomas presentan reordenamientos cromosómicos estructurales, siendo **muy frecuentes las alteraciones del cromosoma 17** [36, 137-143] normalmente como un **isocromosoma 17q** [138, 139, 144, 145]. Esta alteración supone la pérdida de material genético de los brazos cortos del cromosoma 17 y la duplicación de los brazos largos.

Los hallazgos citogenéticos más característicos en las diversas series estudiadas [137, 138, 140, 146] pueden resumirse de la siguiente manera:

1.-Un buen número de casos presenta cariotipos normales, aunque dicha proporción es muy variable según las series estudiadas, mientras que la mayoría de los restantes presentan cariotipos muy complejos, frecuentemente poliploides, con numerosas alteraciones tanto numéricas como estructurales, que en conjunto implican a casi todos los cromosomas, siendo muy escasos los que presentan alteraciones simples.

2.-La alteración que se encuentra con más frecuencia en todas las series es el **isocromosoma 17q** (i17q) [141] [147] [35], aunque las proporciones también son variables (12-57%). Aunque el i17q es el mecanismo más frecuente de pérdida de 17p en meduloblastoma, en un pequeño porcentaje de los casos, existe pérdida completa o parcial de 17p como consecuencia de delección intersticial, traslocación balanceada o monosomía del 17. [142].

3.-La siguiente alteración más prevalente implica el cromosoma 1, con deleciones y traslocaciones desequilibradas que afectan al brazo corto (1p) [137].

4.-La pérdida de un cromosoma 22 como única alteración se encuentra con bastante frecuencia; incluso algunos autores [148] sugieren que la monosomía del 22 se asocia al tumor rabdoide.

5.-Otras alteraciones descritas, aunque de forma menos repetitiva implican a las regiones cromosómicas 6q, 9q, 11p y 11q [30].

Algunos autores consideran la presencia de un i(17q) como un factor pronóstico desfavorable [124] [149], aunque en otras series los resultados no muestran relación con la supervivencia [126] o incluso se asocian a mejor pronóstico.

4.2.- Alteraciones moleculares, estudios de pérdida de heterocigosis (LOH)

Estudios citogenéticos y moleculares de estos tumores presentan con frecuencia (entre 15-50%) y de manera característica, pérdida de material genético en el brazo corto del cromosoma 17 (17p), por lo que se supone existe un gen o genes en esta región cuya pérdida podría estar implicada en el desarrollo del tumor [15, 31, 33, 37, 142, 150-153].

El estudio de las pérdidas de 17p en meduloblastomas, el análisis de la extensión de las mismas y la delimitación de la región mínima de pérdida, han sido objetivo común de diversos grupos investigadores bien con marcadores del tipo RFLP (*restriction fragment length polymorphism*) o mediante análisis con microsátélites [29]. Sin embargo, la puesta en común de los resultados obtenidos por los diversos grupos plantea dificultades. Por una parte, el hecho de que los marcadores polimórficos utilizados por distintos grupos no son siempre los mismos, y por otra parte, la falta de integración en su día de los diversos mapas genéticos y la discordancia en cuanto a la posición relativa de algunos marcadores, dificulta esta tarea.

La frecuencia de pérdida de heterocigosis (LOH) en 17p varía en las distintas series revisadas. Los primeros estudios de LOH localizaron la región de pérdida en 17p12-p13.1 [35] y 17p11.2-17pter [154]. Dado que el gen **TP53** está localizado en esta región cromosómica se consideró en un principio que podría ser el gen responsable. Sin embargo, y como se comenta posteriormente en este trabajo, dicho gen se ha descartado en la actualidad como posible candidato. Por una parte, las mutaciones en este gen son muy poco frecuentes [47, 62, 155, 156]. En segundo lugar, estudios de localización por delección han mostrado que la región más pequeña frecuentemente delecionada en meduloblastoma está situada cerca del telómero, en la banda p13.3, distal a la localización cromosómica del gen TP53 [33, 37].

El **isocromosoma 17q** se ha demostrado también con la técnica de **Hibridación In Situ con Fluorescencia (FISH)** [157-159]. Estudios de **Hibridación Genómica Comparada (CGH)** ponen de manifiesto un mayor grado de desequilibrios genómicos de los esperados, siendo las ganancias más frecuentes que las pérdidas [160-162]. Se confirma que la pérdida de 17p con ganancia en 17q es la alteración más frecuente [143, 163], también se observan con frecuencia pérdidas en cromosoma 10q (41%) y 11 (41%) y ganancias del cromosoma 7 (44%). También se ha descrito mediante análisis con CHG **amplificación de MYC** hasta en el 20% de los casos [46].

4.3. – Región mínima de pérdida

El presente trabajo continúa una línea de investigación sobre tumores pediátricos del Sistema Nervioso Central. Se dispone de una serie de muestras de sangre periférica y tumor de 16 meduloblastomas en los que se ha estudiado LOH mediante microsatélites previamente, constatándose LOH en 17p en un 54% de los meduloblastomas. La región mínima común a todos los casos con pérdida en nuestra serie se localizó a nivel subtelomérico en 17p (13.3) en el intervalo D17S849 – 17pter [36] (figura 6) (Tesis Doctoral de Carmen Orellana Alonso “Implicación del cromosoma 17, de las regiones cromosómicas 1p y 10q, y de los genes TP 53 y Nmyc en el desarrollo de los tumores infantiles del sistema nervioso” Valencia 1999).

Esta región ocupa aproximadamente 2400 Kb. En el momento de iniciarse este trabajo (Mayo 2000), atendiendo a la base de datos del NCBI, se localizaban en la región candidata una serie de genes y secuencias codificantes que se valoraron para el presente estudio. De estos genes no se conocía en todos su función aunque sí el mRNA que expresan.

4.4.- Genes de la región

La primera aproximación para la localización de un posible gen supresor de tumores implicado en el meduloblastoma, consistió en **el estudio de la región mínima de pérdida y de los genes localizados en la misma**. En nuestro caso, la región se situó en la zona subtelomérica del brazo corto del **cromosoma 17 (17p13.3)** [36]. En dicha región cromosómica existen diversos posibles genes candidatos debido a su función, localización u homología con otros genes conocidos [153]. En un primer paso se procedió al análisis de la información disponible en las bases de datos y en la bibliografía. Algunos de ellos ya habían sido estudiados previamente por otros autores e incluso descartados como genes supresores de tumores implicados en el meduloblastoma.

Se descartaron de entrada los siguientes genes por motivos que pasamos a detallar a continuación:

-El **gen LIS1 (Lisencefalia tipo 1)** fue estudiado por Koch en 1996 [37] en una serie de 35 meduloblastomas de los que 16 mostraron LOH en 17 p13.3. El estudio de expresión de ARNm de dicho gen mediante RT-PCR descartó

su implicación en el tumor. Pietsch en 1997 analiza las pérdidas alélicas con microsatélites en una serie de 27 casos encontrando LOH en 17p13.3 en el 47% de los tumores y excluyendo a dicho gen como posible candidato [31].

-El **gen TP 53** localizado en esta región, en un principio se consideró un gen supresor candidato, pero diversas líneas experimentales han descartado esta hipótesis, ya que las mutaciones de este gen son muy poco frecuentes incluso en los casos con pérdida de heterocigosis [47, 155, 156]. Además, los estudios de localización por delección han mostrado que la región más pequeña frecuentemente delecionada en meduloblastomas está localizada distalmente a la localización cromosómica de este gen [33].

-El **gen ABR (Active BCR related)** propuesto en 1994 por Mc Donald como posible gen candidato, es descartado posteriormente [32] al quedar fuera de la región mínima de pérdida. En este último trabajo se propone a los genes **DPH1 e HIC-1 (hipermetilated in human cancer)** como posibles genes supresores implicados en meduloblastoma [150, 164].

-El **RPH3AL (rabphilin-3A-like)** también localizado en la región es un gen implicado en la regulación de la exocitosis endocrina y está descrita en la literatura ausencia de mutaciones por secuenciación en una serie de 33 casos de meduloblastoma [165].

Con posterioridad al presente trabajo se han realizado estudios de otros genes en esta región y en otras regiones cromosómicas que serán comentados en la discusión.

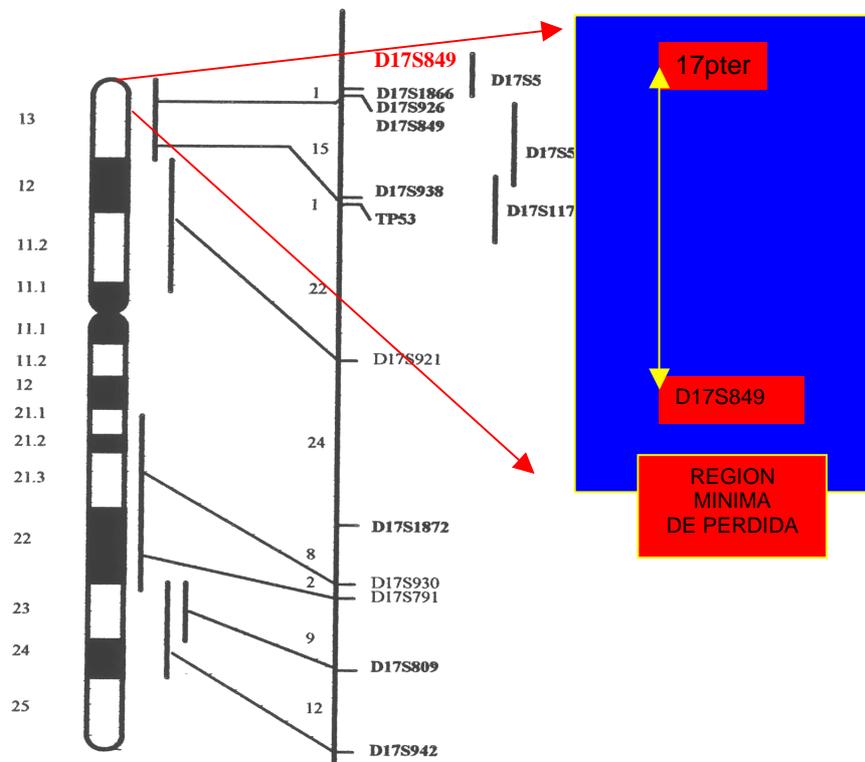


Figura 6: Imagen esquemática del cromosoma 17 en la que se encuentra señalada la región mínima de pérdida de localización subtelo mérica en 17p (13.3).

II. HIPÓTESIS DE TRABAJO

Diversos estudios moleculares sobre meduloblastoma han demostrado pérdida de heterocigosis (LOH) en el brazo corto del cromosoma 17 en un 35- 50% de los casos, según las series. **Ello sugiere la existencia de un gen supresor de tumores localizado en 17p con una importancia significativa en la génesis o progresión del tumor.**

Proponemos el estudio en las células tumorales del RNA mensajero de genes localizados en la región candidata para valorar su expresión y con ello su posible implicación en la patogenia del meduloblastoma. La ausencia de expresión, o una expresión anómala, nos conducirá a implicar dicho gen en la etiopatogenia del tumor. Hay que considerar además que muchas mutaciones deletéreas (mutaciones de parada, mutaciones que alteran el procesamiento del RNA, microdeleciones, microinversiones) causan indirectamente una pérdida de expresión del gen. Por el contrario, la expresión normal de estos genes en el meduloblastoma nos conduciría a la búsqueda de nuevos genes en esta región.

III. OBJETIVOS

El presente trabajo se realizó entre los años 2001-2002 a partir de una serie de muestras de sangre periférica y tumor de 16 meduloblastomas. En estos tumores se había estudiado previamente las alteraciones de 17p mediante pérdida de heterocigosis con microsatélites y establecido la región mínima común de pérdida [36]. Mediante el presente estudio se pretende continuar esta línea de investigación sobre tumores pediátricos del Sistema Nervioso asumiendo la hipótesis de trabajo mencionada.

En concreto, el objetivo último consiste en la identificación de un posible gen supresor de tumores localizado en el brazo corto del cromosoma 17 implicado en la etiopatogenia del meduloblastoma, mediante el estudio del mRNA de los genes ubicados en la región candidata definida previamente mediante estudios de pérdida de heterocigosis. Para ello, se pretende valorar:

- Estudio de posibles cambios expresión de genes ubicados en la región candidata en meduloblastomas.
- En aquellos casos que se observe una expresión alterada de uno o varios genes en los tumores, identificar las causas de ausencia de expresión (mutaciones, metilación).
- Además se ha realizado un estudio retrospectivo de las características histológicas de los tumores de la serie y estudio inmunohistoquímico en los mismos de Ki67, P53, Neurofilamentos y Proteína Gliofibrilar Ácida (PGFAP).

IV. MATERIAL Y METODOS

1.- MUESTRAS DE TUMOR

1.1. Obtención de las muestras

Para la realización del presente trabajo se han utilizado 16 muestras tumorales de meduloblastoma procedentes del Banco de Tumores Infantiles del Hospital Universitario La Fe.

Las muestras tumorales se obtuvieron en la mayoría de los casos de la biopsia excisional en el quirófano de Neurocirugía, siendo trasladadas de forma inmediata y en fresco al departamento de Anatomía Patológica en un contenedor estéril. Todos los especímenes fueron debidamente clasificados e identificados para su posterior localización, procesado y utilización en los diferentes procesos del presente estudio.

Las muestras se recogieron atendiendo a las siguientes recomendaciones establecidas para el almacenaje de tejidos en bancos de tumores [166]:

- No interferir con el diagnóstico anatomopatológico, fenotípico o molecular. Es decir, sólo se almacenó el excedente de tejido no necesario para el correcto diagnóstico y análisis de factores pronósticos en el tumor.
- La toma de la muestra para su almacenaje se realizó por parte de personal especializado. En nuestro caso, el anatomopatólogo encargado del posterior diagnóstico fue el encargado de la selección, separación y congelación del tejido.
- La toma se realizó garantizando la futura utilización del mismo.

Las pautas de actuación dispuestas por el banco de tumores son las siguientes.

1.1.1 Traslado del tejido tumoral

La rapidez en el traslado del tejido tumoral y el procesado previo a la congelación es de vital importancia para la adecuada conservación del mismo. El tiempo entre la cirugía y el almacenamiento de la muestra no debe ser superior a los 30 minutos, preferentemente a temperatura y condiciones que eviten la degradación del RNA. La calidad de las muestras depende en gran medida de la rapidez y la forma de obtención, así como el

procesamiento y el tipo de transporte hasta el banco de tumores. Estas variables son especialmente importantes si se precisa obtener ARN a partir del tejido tumoral. Las muestras tumorales son transportadas en un contenedor estéril al departamento de patología, donde el patólogo separa una pequeña porción para congelar y le resto para los procedimientos diagnósticos estándar.

1.1.2 Preservación del tejido

Para la preservación del tejido se utiliza nitrógeno líquido a -160°C para evitar la formación de cristales y posteriormente se conservan adecuadamente identificados en congelador a -80°C . Este congelador dispone de dispositivo de alarma para garantizar la preservación de las muestras.

1.2.-Base de datos

Todos los casos se centralizan en la Unidad de Oncología Pediátrica donde además se registran los siguientes datos; nombre, fecha de nacimiento, fecha de diagnóstico, código de biopsia y SNOMED, tipo de muestra (tumor, médula ósea, LCR,..) y fecha de obtención, número de registro y localización en frigorífico y caja). Estos datos se procesan en una base de datos Excell y tienen un acceso restringido según la ley de Protección Oficial de Datos.

1.3.- Aspectos éticos

En el consentimiento informado de la cirugía se añade una cláusula según la cual el enfermo o sus familiares es conocedor de que su “tejido o material biológico” puede ser utilizado para investigación.

2.- DESCRIPCIÓN DE LA SERIE

El presente estudio incluye un total de **16 casos pediátricos de meduloblastoma**. Todos los pacientes fueron ingresados y tratados en el Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Universitario La Fe de Valencia entre los años 1992- 2000. El diagnóstico anatomopatológico se realizó en el servicio de Anatomía Patológica de este hospital.

Hay que añadir 4 casos en los que únicamente se disponía de DNA genómico, no quedando muestra tumoral para la realización de estudios de expresión. Este material fue utilizado para el estudio de PCR en condiciones semicuantitativas.

Todos los casos han sido tratados siguiendo los protocolos terapéuticos de la SIOP (*Internacional Society of Paediatric Oncology*) y han sido centralizados en la Unidad de Oncología Pediátrica.

De todos ellos se ha realizado estudio de parámetros histológicos, estudio inmunohistoquímico y recogida de datos clínicos.

2.1.- Histopatología

El diagnóstico histológico se realizó tras la exéresis del tumor en todos los casos. Una vez realizada la revisión macroscópica, las piezas quirúrgicas se fijaron en formol y tras el tallado se incluyeron en bloques de parafina.

Se ha utilizado el material de archivo del servicio. Se realizaron nuevos cortes histológicos de todos los bloques. De cada uno se realizaron 5 cortes de 5 micras. Una de ellas se tiñó con hematoxilina-eosina (H-E) según el protocolo rutinario de tinción utilizado en el servicio de Anatomía Patológica y los cortes restantes han sido utilizados para inmunohistoquímica.

Los casos han sido diagnosticados según los criterios microscópicos convencionales para el diagnóstico de meduloblastoma. Además se evaluaron los siguientes parámetros histológicos.

- tipo histológico**
- hiperplasia vascular**
 - presente
 - ausente

-necrosis tumoral

leve; focos de necrosis que interesan menos del 25% del volumen tumoral

moderada; necrosis que afecta al 25-50% del tejido

intensa; si interesa a más del 50% del volumen tumoral

2.2.- Estudio inmunohistoquímico

Las restantes preparaciones fueron utilizadas para estudio inmunohistoquímico para Proteína Gliofibrilar Ácida (PGFAP) y Neurofilamentos con el fin de analizar diferenciación neuronal y/o glial en estas neoplasias. También se determinó el índice de proliferación celular con análisis de Ki67 y se estudiaron inmunohistoquímicamente alteraciones en P53.

Se han utilizado para el estudio anticuerpos mono y policlonales comercializados con el objetivo de obtener resultados contrastados y homologados.

2.2.1.- PGFAP (Proteína Gliofibrilar Ácida, Dako corporation)

La proteína gliofibrilar ácida es uno de los cinco tipos principales de filamentos intermedios citoplasmáticos. Se encuentra presente en los astrocitos, células endimarias y oligodendrocitos sean normales, reactivos o neoplásicos. El anticuerpo utilizado es de tipo monoclonal de ratón (IgG1, kappa).

2.2.2.- NFP (Proteína del neurofilamento, Dako corporation)

Los neurofilamentos constituyen el filamento intermedio de las neuronas y de sus prolongaciones y se expresan en tumores de origen neuronal o que presentan diferenciación neuronal, tales como el neuroblastoma, meduloblastoma y retinoblastoma entre otros. El anticuerpo monoclonal de ratón (IgG1, kappa) reacciona con componentes de 70 KD y 200 KD que se encuentran presentes en las tres subunidades polipeptídicas que forman parte de los neurofilamentos.

2.2.3.- Ki-67 (Dako corporation)

Para su determinación se utiliza un anticuerpo monoclonal (IgG1, Kappa) MIB-1 de ratón el cual se dirige contra el antígeno nuclear nativo (Ki-67) expresado únicamente por las células proliferantes. Este antígeno se corresponde a una proteína nuclear no histona que se expresa en las fases G1, G2, M y S del ciclo celular.

2.2.4.- P53 (Dako corporation).

Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal (IgG1, Kappa) de ratón el cual marca un epítipo en la fracción N-terminal de la proteína P-53 humana. El anticuerpo reacciona conjuntamente con la fracción salvaje y mutante de la P-53 humana.

2.2.5.- Análisis de los datos inmunohistoquímicos

Presencia o ausencia de células positivas para los diferentes anticuerpos empleados clasificados como positivos o negativos.

Valoración de la intensidad de células positivas:

1. Mínima positividad: cuando existen células positivas de forma ocasional.
2. Ligera positividad: cuando existen en 10-35% de células positivas (+).
3. Moderada positividad: cuando el porcentaje de células positivas oscila entre 35 y el 75% (+ +)
4. Intensa positividad: cuando la densidad de células positivas oscila entre 75-100% (+ + +).

Únicamente se valoraron como positivas aquellas tinciones visibles en células con núcleo tumoral (hipercromático grande y pleomórfico). Se descartan las tinciones en prolongaciones citoplasmáticas en las que el núcleo no era tumoral o no estaba presente.

2.2.6.- Realización de la técnica

Las técnicas inmunohistoquímicas se realizaron con autoinmunoteñidor (Dako) según el procedimiento de rutina del servicio.

2.3.-Parámetros clínicos

La revisión de datos clínicos se llevó a cabo mediante el estudio retrospectivo de las historias de los enfermos. Se evaluaron los siguientes parámetros.

- edad
- sexo
- localización
- estadio
- riesgo

Descripción de las variables:

-Para la clasificación por **estadios** se ha empleado el estadiaje propuesto por Chang que hemos descrito anteriormente en el apartado 3.11 de la introducción.

-Los grupos de riesgo se dividen en **riesgo estandar y alto riesgo**. Desde un punto de vista práctico, los tumores de riesgo alto son los que presentan alguna de estas características; multifocalidad, diseminación por LCR, resección quirúrgica incompleta.

Riesgo Estándar

Edad mayor 2-3 años
Cirugía completa o casi completa
T1-T3a
M0

Alto riesgo

Edad menor 2 años
Resección incompleta
T3b-T4, afectación tronco
M1-M3

3.- EXTRACCIÓN DE ADN

El objetivo de una extracción de DNA es la obtención de la máxima cantidad posible sin menoscabo de una buena calidad. Las técnicas utilizadas actualmente son relativamente sencillas y en las mismas es necesario evitar toda destrucción enzimática o mecánica de los ácidos nucleicos, ya que aunque son estables en la célula intacta llegan a ser muy vulnerables a la digestión por las nucleasas endógenas una vez que la célula es lisada.

El método de elección para la extracción en nuestro caso consistió en el protocolo clásico de lisis mediante Proteinasa K y la posterior purificación mediante Fenol/Cloroformo. A continuación pasamos a describir detalladamente cada uno de los pasos utilizados.

3.1.- Toma de la muestra

Un pequeño fragmento de tejido tumoral congelado fue separado de la pieza principal. La toma de la muestra se produjo en una cámara de flujo laminar para garantizar condiciones de máxima asepsia. Todo el material utilizado fue material estéril desechable o material previamente esterilizado. La elección del fragmento para el estudio se hizo tras la revisión macroscópica de la pieza con el objetivo de evitar fragmentos hemáticos, necróticos o de tejido no tumoral. Es de vital importancia para los estudios posteriores que el DNA obtenido sea de la máxima calidad y que proceda únicamente de tejido tumoral y no de restos de tejido normal adherido al tumor.

3.2.- Disgregación física del tejido

El fragmento fue depositado en una placa petri estéril donde se procedió a la disgregación física del mismo con la ayuda de una hoja de bisturí. La fragmentación física del tejido contribuye a una mejor lisis química posterior del mismo.

3.3.- Lisis del tejido con Proteinasa K

El tejido disgregado se recogió en un tubo de microcentrífuga tipo eppendorf y se le añadieron 400µl de la solución de la siguiente solución:

Tris 10mM pH 10.5
EDTA 1mM

NaCl 0.15mM

Tras el homogeneizado, se le añadieron 20µl de SDS 10% y 10 µl de Proteinasa K (10mg/ml). El tubo se selló con parafilm e incubó durante la noche a 56°C. En las primeras horas de tratamiento se homogeneizó la muestra periódicamente para favorecer la lisis del tejido.

3.4.- Purificación mediante el método del Fenol/Cloroformo.

Tras la lisis se centrifugaron los tubos en una microcentrífuga para la recogida del volumen evaporado en la tapa del tubo. De esta manera evitamos salpicaduras y posibles contaminaciones al abrir el tubo. Tras este paso se procedió a la fenolización. Los detalles de la misma se describen a continuación.

- a.- Añadir al tubo 1 volumen de fenol/cloroformo isoamílico 24:1 (V/V) y agitar.
- b.- Centrifugar 2 minutos a 12000 r.p.m. en una microcentrífuga.
- c.- Recuperar la fase acuosa (superior) por aspiración con una micropipeta y pasarla a un tubo de microcentrífuga nuevo perfectamente rotulado.
- d.- Repetir los tres pasos anteriores (a, b y c).
- e.- Añadir 1 volumen de cloroformo isoamílico 24:1 agitar.
- f.- Centrifugar 2 minutos a 12000 r.p.m. en una microcentrífuga.
- g.- Recuperar la fase acuosa (superior) por aspiración con una micropipeta y pasarla a un tubo de microcentrífuga nuevo perfectamente rotulado.
- h.- Repetir los tres pasos anteriores (e, f y g).

La fenolización, es un proceso de extrema importancia en la extracción del DNA. Lo que se consigue con el mismo es la eliminación de proteínas, lípidos, enzimas celulares, etc. que podrían degradar el DNAo inhibir posteriores procesos en los que vamos a utilizar el ADN. Además en DNAobtenido es de una gran pureza.

3.5.- Precipitación.

- Añadir 8% NaCl 5M al tubo.
- Añadir 2 volúmenes de etanol frío (2V/V).

- Mover suavemente el tubo. El DNA precipita en forma de filamentos que se agregan y forman una especie de medusa visible a simple vista en pocos segundos.
- La medusa, si es visible y de un tamaño considerable, se recupera con una pipeta pasteur de vidrio con el extremo cerrado con forma de anzuelo.
- Lavar la medusa dos veces con etanol al 70% frío.
- Resuspender en Tris/EDTA 10/1 agitando los tubos suavemente durante al menos 2 horas a temperatura ambiente.

En el caso de que la medusa sea muy pequeña o esté disgregada se procederá a seguir esta segunda alternativa al protocolo descrito:

- Centrifugar a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 15 minutos.
- Desechar el sobrenadante por volcado.
- Añadir 300 µl de etanol al 70%
- Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos.
- Decantar el sobrenadante y secar el pellet.
- Resuspender en Tris/EDTA 10/1 agitando los tubos suavemente durante al menos 2 horas a temperatura ambiente.

Una vez resuspendido el DNA se cuantificó y se comprobó su calidad mediante electroforesis en geles de agarosa. Los DNA obtenidos se conservaron congelados a -20°C hasta su utilización posterior.

4.- EXTRACCIÓN DE ARN

La extracción de ARN es un proceso relativamente sencillo pero con una serie de peculiaridades que lo hacen ciertamente especial. La inestabilidad del ARN junto con la presencia de enzimas RNasas que lo degradan rápidamente hacen que se tengan que tomar una serie de precauciones en todo el procesado. Estas precauciones consisten en realizar la extracción en un ambiente extremadamente limpio y aséptico, en nuestro caso la extracción se realiza en una campana de flujo laminar para cultivos. Otra precaución a tomar es la utilización de material libre de RNasas de uso exclusivo para el manejo de ARN. Todo el material, como puntas, pipetas, tubos y soluciones, deberán cumplir estas condiciones.

El método de elección en nuestro caso fue la utilización de un Kit comercial, concretamente el RNasy mini kit de la casa Quiagen cuyo protocolo pasamos a detallar:

4.1.- Toma de la muestra

Un pequeño fragmento de tejido tumoral congelado, fue separado de la pieza principal evitando la descongelación de la misma. La toma de la muestra se produjo en las mismas condiciones descritas anteriormente en la extracción del ADN. Además el material utilizado estaba libre de RNasas. Para la elección del fragmento utilizado en la extracción también se siguieron los criterios anteriormente descritos.

4.2.- Disgregación física del tejido y lisis.

El fragmento fue depositado en una placa petri estéril donde se procedió a la disgregación física del mismo con la ayuda de una hoja de bisturí. En este caso se procedió a una disgregación total del mismo añadiendo la solución de lisis directamente a la placa antes de la recogida del tejido disgregado. La solución de lisis además del lisado propio del tejido ayuda a la estabilización del ARN, que como ya hemos comentado es una molécula altamente inestable.

La lisis celular se realiza con el tampón RLT en presencia de β -mercaptoetanol.

El lisado del tejido se puede almacenar a -80°C o seguir con el protocolo de purificación.

4.3.- Purificación del ARN.

A continuación detallamos el protocolo utilizado en nuestro caso siguiendo las recomendaciones del fabricante con alguna modificación:

- A $350\mu\text{l}$ del lisado celular se le añade $350\mu\text{l}$ de EtOH 70% libre de RNasas.
- Mezclar bien y aplicar a la columna.
- Centrifugar 15 seg a 10.000 rpm.
- Desechar eluido y añadir $700\mu\text{l}$ de RW.
- Centrifugar a 10.000 rpm 15 seg.
- Cambiar la columna a un tubo de elución nuevo.
- Aplicar $500\mu\text{l}$ de RPE con Etanol.
- Centrifugar 15 seg a 10.000 rpm.
- Desechar eluido.
- Aplicar otros $500\mu\text{l}$ de RPE.
- Centrifugar 2 min a 13.000 rpm.
- Pasar la columna al tubo donde irá finalmente el RNA.
- Aplicar $50\mu\text{l}$ de H_2O sin hacer burbujas en la columna.
- Centrifugar 1 min a 10.000 rpm.
- Congelar el RNA a -80°C .

5.- TRATAMIENTO CON DNasaI LIBRE DE RNasas.

En el aislamiento del ARN es frecuente arrastrar cantidades variables de ADN. El diseño posterior de los experimentos viene condicionado por la existencia de DNA en la muestra de ARN extraída. En multitud de ocasiones no es posible diseñar experimentos basados en PCR que sean capaces de discernir si el producto amplificado proviene de DNAmolde o de ADNc producto de la retrotranscripción del ARN. Algunos ejemplos son la existencia de genes donde sólo existe un exón o que se quiera amplificar una zona del gen que proviene de un solo exón.

Para evitar este tipo de problemas existen diferentes soluciones, algunos Kits de extracción de RNA introducen en la extracción la presencia de DNasas para la degradación del DNA durante la extracción. En nuestro caso el método de elección consistió en el tratamiento del ARN tras la extracción. El protocolo utilizado se detalla a continuación.

5.1.- Tratamiento del ARN con DNasa I libre de RNasas.

Un total de 30µl de ARN procedentes de la extracción se utilizaron para el tratamiento con la DNasa. La mezcla de reacción fue la siguiente:

- 30 µl ARN
- 10 µl de tampón de PCR de la polimerasa Taq Gold (*Applied Biosystems*)
- 6 µl MgCl₂ 25 mM (concentración final 1,5 mM)
- 1 µl de enzima (10 unidades) (*Roche*)
- H₂O libre de RNasas hasta 100 µl (53 µl)

La reacción se incubó durante 12 minutos a 37 °C en un bloque seco.

Tras finalizar la reacción se procedió a la inactivación del enzima con la solución de lisis RLT, del kit de extracción de ARN utilizado anteriormente.

5.2.- Purificación.

La purificación del ARN se realizó siguiendo el protocolo descrito anteriormente en el punto 3.3 del apartado de material y métodos.

6.- RETROTRANSCRIPCIÓN.

Para los estudios de expresión de los genes mediante métodos de PCR es necesaria la obtención de una cantidad suficiente de ADNc, este tipo de DNA se genera por retrotranscripción a partir del RNA extraído de los tumores. Este proceso se llevó a cabo con el TF GeneAmp Gold RNA Core Kit (*Applied Biosystems*), siguiendo las instrucciones del fabricante con pequeñas modificaciones. Mediante este método se obtuvo ADNc de la totalidad de los tumores estudiados.

El proceso utilizado se detalla a continuación:

Mezcla de reacción

Tampón (5X)	8 μ l
MgCl ₂ (25 mM)	4 μ l
dNTP's (10 mM)	4 μ l
Ditiotreitol	4 μ l
Hexámeros al azar (50 μ m)	1 μ l
Poli T (50 μ m)	1 μ l
Inhibidor de Rnasas (20 u/ μ l)	1 μ l
MMLV (retrotranscriptasa) (50 u/ μ l)	0,6 μ l
H ₂ O libre de RNasas	6,4 μ l
RNA	10 μ l

De esta forma, 10 μ l de ARN se retrotranscribieron en un volumen total de 40 μ l. El programa empleado para la reacción fue el siguiente:

25°C 15 minutos
42°C 30 minutos

Tras la reacción, los tubos se centrifugaron brevemente para llevar al fondo del tubo las gotas evaporadas en la tapa y automáticamente se congelaron a -20°C.

El ADNc es una molécula poco estable, por esta razón es imprescindible guardarlo siempre a -20°C y disminuir en la medida de lo posible los ciclos de congelación y descongelación.

7.- AMPLIFICACIÓN POR PCR.

En este apartado pasamos a describir los diferentes protocolos utilizados para la amplificación mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) de los fragmentos de los diferentes genes estudiados en el presente trabajo. También se presentan las diferentes secuencias nucleotídicas de los cebadores diseñados para cada uno de los genes. Los cebadores fueron suministrados por diferentes casas comerciales.

7.1.- PCR β 2-microglobulina.

Para comprobar la integridad del ARN aislado así como el funcionamiento correcto de la retrotranscripción se procedió en cada uno de los casos a la amplificación mediante PCR de un fragmento de un gen de expresión constitutiva. En nuestro caso se utilizó un fragmento de 333 pares de bases de la β 2-microglobulina humana.

Es necesaria la realización de este tipo de estudio en cualquier proceso en el que existan diferentes procedimientos con efectividades variables individuales, como puede ser tanto la extracción del ARN como la propia retrotranscripción. Además, debido a la peculiaridad de nuestro estudio, es más necesaria esta comprobación, ya que la ausencia de expresión del resto de genes que planteamos en el estudio ha de deberse a que realmente no existe expresión o está disminuida y no a la falta de ARN de partida o algún fallo durante la retrotranscripción.

Los cebadores utilizados así como las condiciones de PCR utilizadas se describen a continuación.

Cebador	Secuencia 5'→3'
BETA2 D	CTCGCGCTACTCTCTTTTCTGG
BETA2 R	GCTTACATGTCTCGATCCCACTAAA

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme <i>Fermentas</i>)	2,5 μ l
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 μ l

dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador BETA2 D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador BETA2 R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme <i>Fermentas</i> 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Programa de PCR:

95°C 5 minutos

95°C 30 segundos	} x 35 ciclos
59°C 30 segundos	
72°C 30 segundos	

72°C 7 minutos

7.2.- PCR genes problema incluidos en el estudio.

Una vez seleccionados los genes para el desarrollo del estudio se procedió a la amplificación por PCR de las secuencias dianas de dichos genes. Para todos los casos se procedió a la optimización de las condiciones de amplificación para cada uno de los genes. En las tablas que se presentan a continuación, se detallan los oligonucleótidos, las mezclas de reacción y las condiciones de la amplificación.

Gen DPH2

Cebador	Secuencia 5'→3'
DPH2L1 D	CTGCTCCTACATCCAGCTCC
DPH2L1 R	AGTACAGGCAGGGCCCTTAT

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,5 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,3

Programa de PCR:

95°C	5 minutos	
95°C	30 segundos	} x 35 ciclos
60°C	30 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	5 minutos	

Gen RUTBC1

Cebador	Secuencia 5'→3'
RUTBC1 D	TTTGTTGACAAATGTTGTTTATTGG
RUTBC1 R	ACGTGTGGCCATTGTGTG

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Programa de PCR:

94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	} x 35 ciclos
60°C	30 segundos	
72°C	30 segundos	
72°C	5 minutos	

Gen PITPN

Cebador	Secuencia 5'→3'
PITPN D	GATCTGGAAYYGCAGCCCAC
PITPN R	TCTGAGTGCTAGTCAGTTTGGGA

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Programa de PCR:

94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	} x 35 ciclos
55°C	30 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	5 minutos	

Gen MNT

Cebador	Secuencia 5'→3'
MNT D	TGCTGCGGACGGCGCTG
MNT R	CTCCATATCCTCGTCTATGT

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Programa de PCR:

94°C	5 minutos	
94°C	30 segundos	} x 35 ciclos
55°C	30 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	5 minutos	

Gen RILP

Cebadores y condiciones para los estudios de expresión:

Cebador	Secuencia 5'→3'
T96691A	TCTCATTTCATGGATGGG
T96691B	GAAGGATGTGTGGCCTC

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Programa de PCR:

95°C	5 minutos	
95°C	30 segundos	} x 35 ciclos
50°C	30 segundos	
72°C	45 segundos	
72°C	5 minutos	

Cebadores y condiciones de PCR para los estudios de búsqueda de mutaciones en la región codificante del gen RILP. Los cebadores impares son directos y los pares reversos.

Cebador	Secuencia 5'→3'
RILP 1	CGGAAGTGTTTCGCTTTTCC
RILP 2	CTCCCTGCGGAGGCGCT
RILP 3	CTGCAGGTGTCGGCGCAG


```

1321 gaatcctctg aggatgagac cagcagccct gcaccagca agctaggggg agaagaggag
1381 gccaaccac agtctccagc tctgatccg ccctgttctg ccctccacga acacctttgt
1441 ctgggggect cagccgccc agaggcctga cttaggggtc tggctgtga aggatgtgtg
1501 gctcCodón de paradaaaatg aggcagggc tcccgcttc acagccctcg ccaggggtct gcccRILP 8aatcc
1561 tggcctgcat cagggcagga cggggtctca gccacctcc ctctctacgt ctctgtaccg
1621 agcctctggg gccagatata agagtgcctc tctgagtctc agtttccca tccatgaaat
1681 gagagctgac tgcctagctc ccagggcttt gtgcagacgg cctgagctca tgtaataaag
1741 aactgcccgt aatacaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaggccgc
1801 ctggccara
    
```

En las 4 reacciones de PCR se utilizó la misma mezcla de reacción, salvo los cebadores, que se utilizaron apareados de la siguiente manera:

- A.- RILP 1/RILP2
- B.- RILP 3/RILP4
- C.- RILP 5/RILP6
- D.- RILP 7/RILP8

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,75 µl
dNTP's (10 mM)	0,5 µl
Cebador D (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador R (10 pmol/µl)	1 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Los programas de PCR utilizados en cada caso fueron los que se detallan seguidamente:

Programa de PCR A (RILP1/RILP2)

```

94°C   5 minutos
96°C   1 minuto
60°C   30 segundos
72°C   45 segundos
    } x 35 ciclos
    
```

75°C 5 minutos

Programa de PCR B y C (RILP3/RILP4 y RILP5/RILP6)

94°C 5 minutos

96°C	1 minuto	} x 35 ciclos
62°C	30 segundos	
72°C	1 minuto	

75°C 5 minutos

Programa de PCR D (RILP7/RILP8)

94°C 5 minutos

96°C	1 minuto	} x 35 ciclos
62°C	30 segundos	

75°C 5 minutos

7.3.- PCR semicuantitativa.

Para la amplificación simultánea de los genes RUTBC1 y RILP en condiciones semi-cuantitativas, se emplearon las siguientes condiciones:

Mezcla de reacción

Tampón (10X Netzyme Fermentas)	2,5 µl
MgCl ₂ (50 mM)	0,5 µl
dNTP's (10 Mm)	0,5 µl
Cebador T96691A (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador T96691A (10 pmol/µl)	1 µl
Cebador RUTBC1 D (10 pmol/µl)	0,75 µl
Cebador RUTBC1 R (10 pmol/µl)	0,75 µl
Taq polimerasa (Netzyme Fermentas 5 U/µl)	0,2 µl
ADNc	1,5 µl
H ₂ O hasta 25 µl	17,55

Programa de PCR RUTBC1-RILP

94°C 5 minutos
 94°C 30 segundos } x 30 ciclos
 52°C 30 segundos }
 75°C 5 minutos

7.3.1.- Densitometrado

Para definir la variación normal en la relación de intensidades de los dos genes estudiados por PCR semicuantitativa, se analizaron 3 muestras procedentes de DNA genómico de sangre periférica (de donantes sanos) como controles normales.

Tras electroforesis de los productos de PCR en geles de poliacrilamida, se procedió a digitalizar la imagen de dichos geles y su posterior análisis mediante el programa informático informático Intelligent Quantifier versión 2.1 (Bio Image). Una vez seleccionadas las bandas correspondientes a ambos fragmentos, se obtuvieron los valores tanto de la intensidad absoluta de cada una de ellas, como los de la intensidad relativa (porcentaje de la intensidad, integrada con el área, de la banda con respecto a la carrera). Con estos datos se procedió a calcular la relación de intensidades tanto absoluta como relativa en las muestras. La intensidad relativa se obtiene a partir de la relación entre las intensidades absolutas de ambas bandas de la siguiente forma:

$$RI_{(RILP/RUTBC1)} = I_{RILP} / (I_{RILP} + I_{RUTBC1})$$

Se debe señalar que se estudiaron cinco casos en los que se realizó la PCR semicuantitativa en genómico pero no se pudo estudiar la expresión de los genes seleccionados al no disponer de muestra en condiciones apropiadas.

8.- ELECTROFORESIS EN GELES DE AGAROSA.

La electroforesis es la técnica más utilizada para el análisis de DNA. En nuestro caso se utilizaron dos tipos de electroforesis, la electroforesis en geles de agarosa y las electroforesis en geles de poliacrilamida. En este apartado describiremos la utilización de geles de agarosa que se utilizaron para la comprobación de todas las PCR realizadas, así como para la comprobación de la calidad y cantidad de DNA obtenido tras la extracción del mismo.

Los geles de agarosa utilizados fueron, salvo excepciones, a una concentración del 1% en tampón TBE. Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales utilizando como tampón electroforético también TBE. Tras la electroforesis se procedió a la tinción de los geles en un tampón de TBE con Bromuro de Etidio, tras lo cual se observaron y fotografiaron exponiéndolos a un transiluminador de luz ultravioleta.

Gel de agarosa al 1%:

1 gr de agarosa
100 ml TBE 1X.

Tampón de carga 6X:

Se utilizó para dar densidad a la muestra y así poder ser cargada en los geles y además se le añade un colorante (azul de bromofenol) que nos permite controlar la electroforesis.

0,05% de azul de bromofenol
100 mM EDTA 0,5 M pH 8.0
50% glicerol

TBE 1X:

Se utilizó como tampón de electroforesis, tampón de tinción con BrEt y para la preparación de los geles de agarosa.

89 mM Tris
89 mM Ácido Bórico
2 mM EDTA

Bromuro de Etidio:

Tinción de los geles de agarosa.

0,5 µg/ml en TBE.

9.- GELES ANALÍTICOS DE POLIACRILAMIDA.

En todos los casos, los productos de PCR amplificados, tras su comprobación en geles de agarosa, se sometieron a electroforesis en geles analíticos de poliacrilamida. En este apartado describiremos brevemente los geles y soluciones utilizadas, así como el método rápido de tinción con plata utilizado para el revelado de los mismos.

Se prepararon geles de poliacrilamida no desnaturalizantes al 12%, la composición de dichos geles es la siguiente:

- Agua destilada
- TBE
- acrilamida:bisacrilamida (19:1)
- Persulfato amónico
- Temed

Tampón de electroforesis: TBE 1X

Tras la electroforesis se procedió al revelado utilizando el siguiente protocolo:

Método rápido de tinción con plata:

- 1.- Fijación con etanol al 10% durante 10 minutos.
- 2.- Oxidación: Lavar durante 3 minutos con HNO₃ al 1%.
- 3.- Lavar brevemente el gel con agua destilada dos veces.
- 4.- Tinción con plata. Teñir el gel con AgNO₃ 12 mM durante 20 minutos.
- 5.- Lavar brevemente el gel con agua destilada dos veces.
- 6.- Añadir revelador (29,6 gr de Na₂CO₃, 540 µl de Formaldehído al 37% en 1 litro de H₂O) y esperar a que se forme un precipitado negrozco, decantar y añadir revelador nuevo. Este revelador lo mantenemos hasta que se visualizan todas las bandas de DNA con la intensidad deseada.
- 7.- La reacción se detiene con ácido acético al 10% durante 5 minutos.

10.- SECUENCIACIÓN.

El método de secuenciación utilizado está basado en el método de los desoxinucleótidos (método de Sanger). El kit utilizado fue el BigDye terminator 1.1 Cycle sequencing kit (*Applied Biosystems*), que incorpora en una única mezcla todos los componentes necesarios para la secuenciación, excepto el DNA y el cebador. En esta mezcla se incluyen los cuatro dNTPs, una polimerasa, el tampón de reacción y los cuatro didesoxinucleótidos marcados cada uno con distinto fluorocromo.

10.1.- Tratamiento de la reacción de PCR.

Previamente a la realización de la reacción de secuenciación, es necesario purificar los productos de PCR que se pretende secuenciar. Con dicho proceso se eliminan los restos de dNTPs sobrantes y secuencias de DNA de cadena sencilla (restos de oligonucleótidos). El método utilizado es una reacción enzimática con la mezcla de enzimas ExoSap IT (USB). El protocolo utilizado fue el siguiente:

Mezcla de reacción:

2 μ l de ExoSap

8 μ l de producto de PCR

Incubación:

15 minutos a 37 °C

15 minutos a 80 °C

10.2.- Reacción de secuenciación.

La mezcla de reacción utilizada fue la siguiente:

Reactivos	Cantidad
PREMIX	2 μ l
Producto de PCR tratado (10-30 ng/ μ l)	5 μ l

Cebador (3,2 pmoles)	1 μ l
Tampón 5X	2 μ l

Programa:	94°C	3'	
	96°C	10''	
	50°C	6''	25 ciclos
	60°C	4'	
	refrigerar		

10.3.- Purificación.

Existen diferentes métodos de purificación, en nuestro caso se utilizó la precipitación. En este proceso se consiguen eliminar los restos de sales, oligonucleótidos y fluorocromos no incorporados previamente al producto de la reacción (cadenas de ADN).

Precipitación con etanol y Acetato sódico:

- Añadir a los 10 μ l de la reacción de secuenciación 40 μ l de H₂O para aumentar el volumen.
- Pasar todo el volumen a un tubo de microcentrífuga de 1,5 ml.
- Añadir 5 μ l de AcNa 3M (pH 5,2) y 110 μ l de Etanol absoluto
- Centrifugar 20 minutos a 13.000 rpm
- Eliminar totalmente el sobrenadante.
- Lavar con 250 μ l de etanol al 70%.
- Centrifugar 5 minutos a 13.000 rpm.
- Eliminar sobrenadante.
- Secar.

10.4.- Electroforesis capilar.

A cada reacción de secuenciación se le añadió 25 μ l de TSR (tampón de secuenciación) y se desnaturalizaron a 95°C durante 3 minutos. La electroforesis capilar se realizó en el secuenciador automático ABI 310 de Applied Biosystems con las condiciones estándar.

Tras la electroforesis, las secuencias fueron examinadas y procesadas con la ayuda del programa Sequencing Analysis.

11.- ANÁLISIS DE SECUENCIAS.

Las secuencias se obtuvieron en dos formatos diferentes, el electroforegrama y la secuencia en formato texto. Tras el análisis de los electroforegramas se procedió al alineamiento de las mismas con las secuencias consenso obtenidas de las bases de datos. Los algoritmos utilizados fueron el BLAST (Basic Local Alignment Search Tool).

V. RESULTADOS

1. -DESCRIPCIÓN DE LA SERIE

El presente estudio incluye un total de 16 casos de meduloblastoma. Todos los pacientes fueron ingresados y tratados en el Servicio de Oncología Pediátrica del Hospital Universitario La Fe de Valencia entre los años 1992 y 2000. El diagnóstico anatomopatológico se realizó, siguiendo los criterios microscópicos convencionales en el Servicio de Anatomía Patológica del mismo hospital.

1.1.- Características clínicas y epidemiológicas

1.1.1- Edad

La edad media de toda la serie es de 6,1 años, mediana de 6,1 y rango entre 0 y 12,2 años. Por sexos la edad media de los varones es de 6,15 y la de las mujeres de 6,11.

Estos datos son coincidentes con los hallazgos de la literatura que sitúan el pico de máxima incidencia en la población general entre los 5 y 9 años.

1.1.2.- Sexo

Once casos se corresponden a varones y cinco a mujeres con un predominio masculino de la serie con relación hombre mujer 2,2:1 lo cual está dentro del rango descrito en la bibliografía (entre 1,7:1 y 2,2:1).

1.1.3.- Localización

La localización tumoral más frecuente de la serie presente en 14 casos (87,5%) es en el **vermis cerebeloso**, lo cual es habitual en esta neoplasia ya que al menos el 75% de meduloblastomas se sitúan en esta localización. Todos los casos situados en vermis en la serie, son de **tipo histológico clásico**.

En **hemisferios** existen dos casos que son de tipo histológico **desmoplásico**. La frecuencia de localización del meduloblastoma en hemisferios cerebelosos se incrementa con la edad. En concreto en nuestra serie los dos

casos de meduloblastoma de localización hemisférica se dan en los enfermos de más edad (11,9 y 12,2 años) y además son de tipo histológico desmoplásico también asociado a localización lateral.

1.1.4.- Extensión de la enfermedad según el estadiaje de Chang

Siete casos de la serie se diagnosticaron en estadio T2 y los nueve restantes en T3. Nuestra serie no incluye ningún caso en T1 o T4 al diagnóstico.

En cuanto a la diseminación, 6 casos no presentan diseminación al diagnóstico (M0), 6 casos se encuentran en estadio M1 (células tumorales en LCR) y 4 en M2 (siembra nodular en cerebelo, espacio subaracnoideo cerebral o en III o ventrículos laterales).

El 50% de enfermos mostraron diseminación en el SNC en el momento del diagnóstico.

1.1.5.- Riesgo

Desde un punto de vista clínico se subdividen estos tumores en **riesgo estándar y riesgo alto**.

Los tumores de riesgo alto presentan alguna de las siguientes características: tumor multifocal, diseminación por LCR, resección quirúrgica incompleta o edad menor a tres años.

Dado que en nuestra serie existe un elevado porcentaje de casos con presencia de diseminación por LCR la mayoría de tumores son de alto riesgo (12 casos) siendo los 4 restantes de riesgo estándar. La media de edad de éstos últimos fue de 9,3 años, frente a los 5,1 de los pacientes con alto riesgo.

Los resultados clínico epidemiológicos se encuentran reflejados en la tabla 1.

Tabla 1: Rasgos clínico epidemiológicos de la serie.

TUMOR	EDAD	SEXO	LOCALIZACION	TIPO HISTOLOGICO	ESTADIO	RIESGO
223	12,2	M	CENTRAL	CLASICO	T2M1	ALTO
179	5	M	CENTRAL	CLASICO	T2M0	ESTAND
137	6,3	F	CENTRAL	CLASICO	T3aM1	ALTO
126	4,5	M	CENTRAL	CLASICO	T3M2	ALTO
112	8'35	M	CENTRAL	CLASICO	T3bM0	ALTO
101	1,2	M	CENTRAL	CLASICO	T2M2	ALTO
92	2.08	M	CENTRAL	CLASICO	T3aM2	ALTO
76	11,9	F	LATERAL	DESMOPLASICO	T2M0	ESTAND
75	12,2	M	LATERAL	DESMOPLASICO	T2M0	ESTAND
73	8,9	F	CENTRAL	CLASICO	T3M2	ALTO
67	3,8	F	CENTRAL	CLASICO	T3bM1	ALTO
56	8,2	M	CENTRAL	CLASICO	T2M0	ESTAND
50	5,8	M	CENTRAL	CLASICO	T3aM0	ALTO
44	7,5	M	CENTRAL	CLASICO	T3aM1	ALTO
42	0,7	M	CENTRAL	CLASICO	T2aM1	ALTO
19	0	F	CENTRAL	CLASICO	T3aM1	ALTO

2.- HISTOPATOLOGÍA

2.1.- Tipo histológico

El tipo histológico más frecuente es el **tipo clásico** presente en 14 tumores (**87,5 %**) figuras (7,8,9,10) tipo **desmoplásico** (**12,5 %**) figuras (11,12,13, 14 ,15 ,16). Estos datos son coincidentes con lo descrito en la literatura.

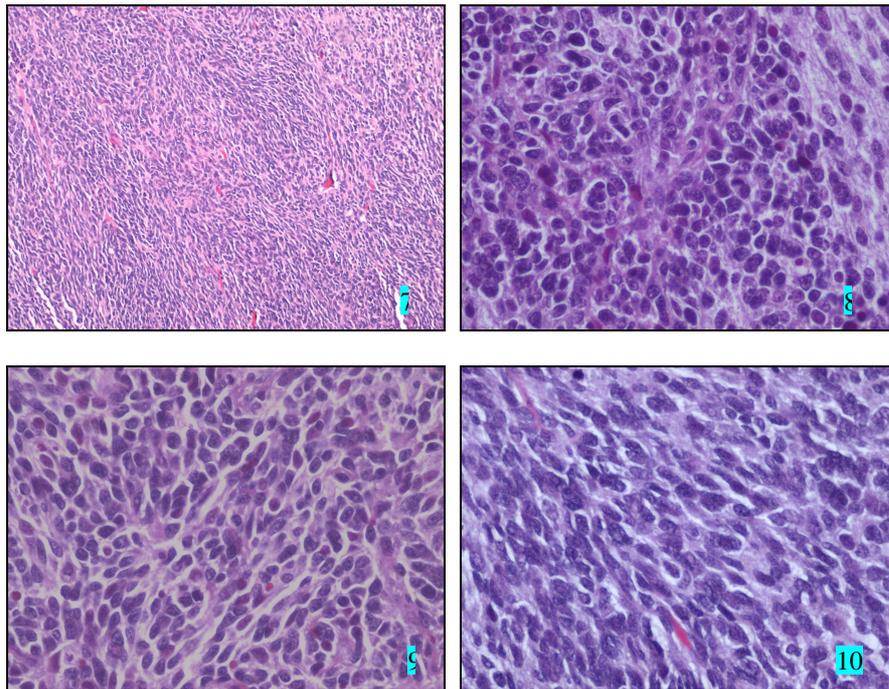


Figura 7: Neoplasia densamente celular constituida por células pequeñas indiferenciadas con presencia de vasos capilares de paredes finas (H-E 200x).

Figura 8: Detalle de células pequeñas redondas indiferenciadas con disposición radial inmersas en delicada matriz fibirlar (H-E 400X).

Figuras 9 y 10: En este caso las células son discretamente fusiformes o anguladas de núcleos atípicos basófilos y escaso citoplasma (H-E 400x).

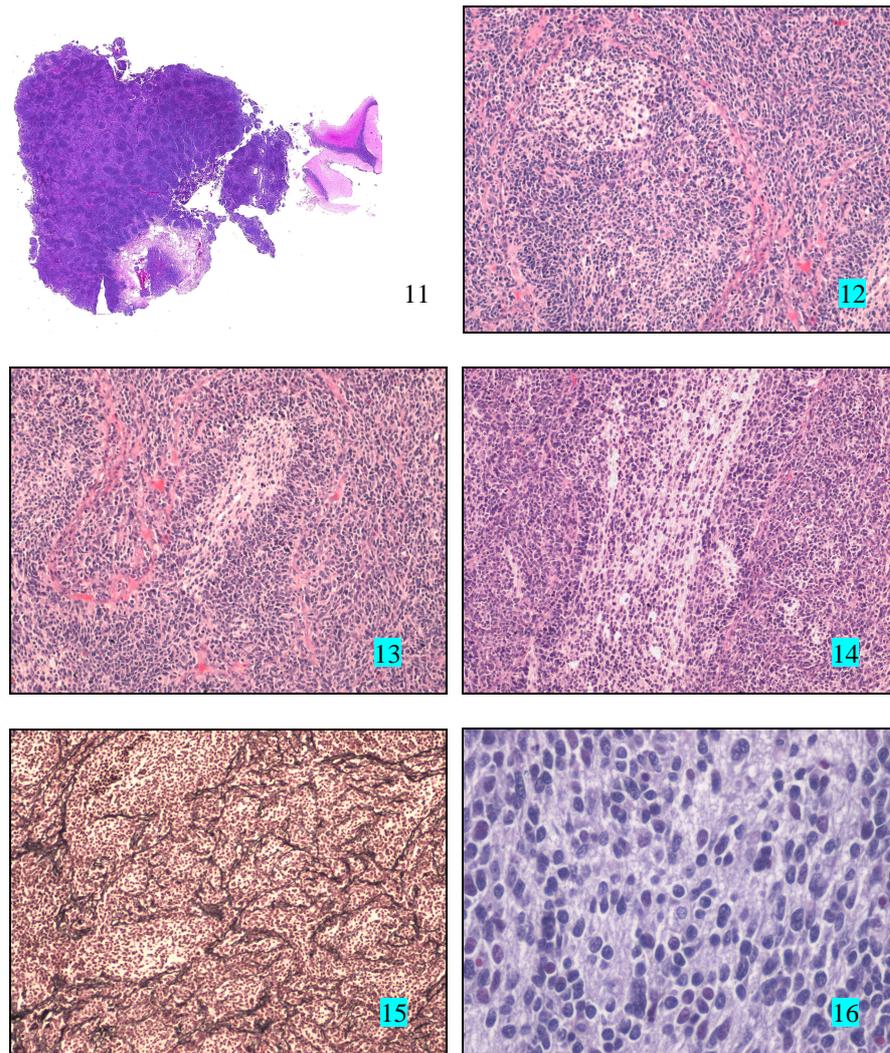


Figura 11: Imagen panorámica de meduloblastoma de tipo desmoplásico con típico patrón micronodular (H-E 25x).

Figuras 12 y 13: Detalle de los nódulos con presencia de áreas de menor densidad celular o islas pálidas (H-E 200X).

Figura 14: Disposición lineal de las células inmersas en delicada matriz fibrilar con mayor uniformidad los núcleos (H-E 200x).

Figura 15: Patrón nodular característico con presencia de áreas libres de reticulina (Reticulina 200x).

Figura 16: Detalle de isla pálida con células redondas con discreta atipia celular inmersas en matriz fibrilar (H-E 400X).

No se encuentran otros tipos histológicos en nuestra serie.

Como ya se ha comentado, el **meduloblastoma de tipo desmoplásico** es más frecuente en enfermos de mayor edad y se localiza con mayor frecuencia en los **hemisferios** cerebelosos como se corresponde en nuestra serie. A su vez se ha descrito que este tipo histológico es de mejor pronóstico que el tipo clásico. En nuestros enfermos los casos de tipo desmoplásico se clasificaron en el grupo de riesgo estándar y no presentaron diseminación al diagnóstico (M0).

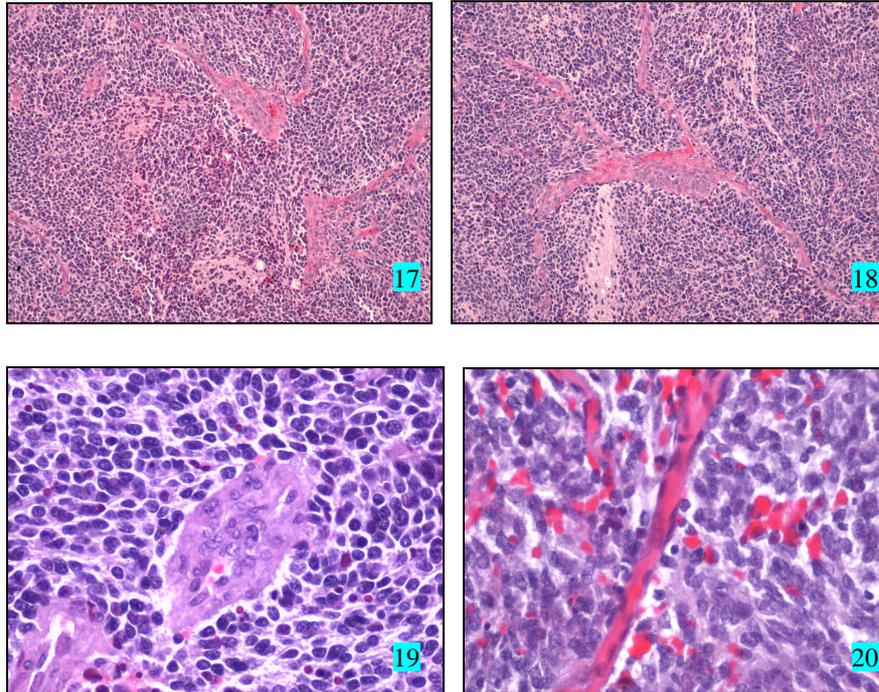
La relación entre el tipo histológico y las variables clínico epidemiológicas se encuentra reflejada en la tabla 1.

2.- Variables histológicas

2.2.1 -Hiperplasia vascular:

Aunque el meduloblastoma es un tumor histológicamente agresivo, el patrón vascular habitual es de vasos de pequeño calibre y paredes finas observándose en muy pocos casos la hiperplasia vascular glomeruloide típica de los gliomas de alto grado.

La hiperplasia vascular en nuestra serie se observó únicamente en 2 casos (12,5 %) figuras (17, 18, 19, 20).



Figuras 17 y 18: Presencia de vasos ramificados con hiperplasia endotelial (H-E 200 X).

Figura 19: Detalle de hiperplasia vascular glomeruloide (H-E 400x).

Figura 20: Patrón vascular habitual del meduloblastoma con vasos capilares de paredes finas (H-E 400x).

2.2.2 -Necrosis tumoral:

El meduloblastoma es una neoplasia que histológicamente muestra con frecuencia núcleos apoptóticos (foto H-E) que se reconocen en H-E como pequeñas masas compactas redondeadas y se corresponden a necrosis tumoral individual. La presencia de amplias áreas de necrosis geográfica se observa en menor grado. La necrosis en pseudoempalizada es más característica de los tumores gliales aunque también se puede observar. En casos muy aislados existe cavitación (típica del astrocitoma pilocítico), hemorragia o calcificación.

Se objetivó **necrosis tumoral en 8 de los casos (50%)**. En dos de ellos fue muy intensa, 4 casos se cuantificó como moderada y en los dos restantes fue leve.

Estos resultados se encuentran reflejados en la tabla 2.

Tabla 2: Variables histológicas de la serie.

TUMOR	TIPO HISTOLOGICO	HIPERPLASIA VASCULAR	NECROSIS
223	CLASICO	NO	NO
179	CLASICO	NO	MODERADA
137	CLASICO	NO	NO
125	CLASICO	NO	MODERADA
112	CLASICO	NO	NO
101	CLASICO	NO	LEVE
92	CLASICO	SI	INTENSA
76	DESMOLASICO	NO	NO
75	DESMOPLASICO	NO	NO
73	CLASICO	NO	NO
67	CLASICO	NO	MODERADA
56	CLASICO	NO	NO
50	CLASICO	NO	MODERADA
44	CLASICO	NO	NO
42	CLASICO	SI	INTENSA
19	CLASICO	NO	LEVE

3.- ESTUDIO INMUNOHISTOQUÍMICO

El meduloblastoma es un tumor neuroepitelial indiferenciado con capacidad de diferenciación divergente neuronal-glial.

El estudio inmunohistoquímico es de utilidad para poner de manifiesto la presencia de diferenciación hacia una u otra estirpe, no obstante, debe interpretarse con cautela.

3.1 -PGFAP

Como ya se ha comentado previamente la PGFAP es un filamento intermedio presente fundamentalmente en los astrocitos y es el marcador comúnmente empleado para poner de manifiesto la diferenciación glial en una neoplasia.

En nuestra serie se constató positividad en 10 casos (68,7%). Únicamente se valoraron como positivas aquellas tinciones visibles en células con núcleo tumoral (hipercromático grande y pleomórfico) descartándose las tinciones en prolongaciones citoplasmáticas en las que el núcleo no era tumoral o no estaba presente.

En su mayoría la positividad fue leve (7 casos) y en los restantes moderada. En ningún caso fue intensa. En 8 de los casos los tumores fueron de tipo clásico (figura 22). Los dos tumores de tipo **desmoplásico** mostraron positividad moderada y localizada en las **islas pálidas** de los nódulos(fig 21).

Positividad para PGFAP (68,7 %de casos)

- 1.-leve; siete casos**
- 2.-moderada; tres casos**
- 3.-intensa; ninguno**

3.2. -Neurofilamentos (NF)

Son **filamentos intermedios indicadores específicos de diferenciación neuronal.**

23

La **diferenciación neuroblástica** es la predominante en meduloblastoma e identificable histológicamente si existen rosetas de Homer Wright, ordenamiento radial de las células alrededor de procesos fibrilares y en las islas pálidas típicas del tipo desmoplásico con células monomorfas

dispuestas entre matriz fibrilar. Rara vez se pueden identificar células ganglionares maduras.

No obstante en algunos casos de meduloblastomas con rasgos histológicos de diferenciación en este sentido la expresión de neurofilamentos no se observa o es focal.

En el presente estudio existen **4 casos con positividad a NF (25 %)**.

En los dos casos de tipo **desmoplásico**, la positividad se localiza en las islas pálidas y es de intensidad moderada (figuras 23 y 24).

Los dos casos restantes con positividad a este anticuerpo se dan en dos tumores de tipo clásico, uno de ellos con intensidad moderada y otro leve.

Positividad para NF (25% de casos)

1.-leve; un caso

2.-moderada; tres casos

3.-intensa; ninguno

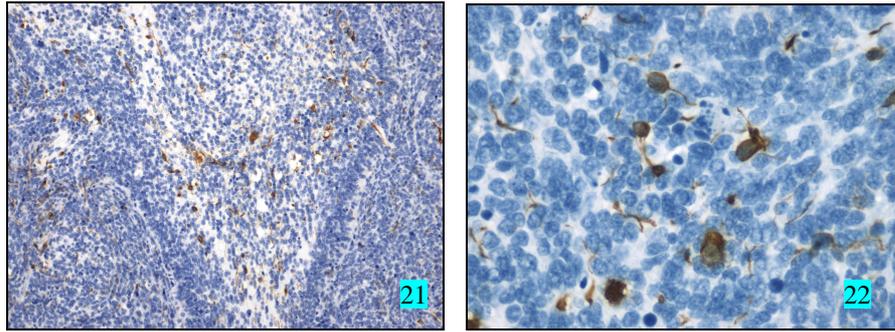


Figura 21: Imagen de meduloblastoma de tipo desmoplásico con presencia de positividad inmunohistoquímica para PGFAP predominante en las islas pálidas (PGFAP 200x).

Figura 22: Detalle de positividad inmunohistoquímica focal para PGFAP en meduloblastoma de tipo clásico (PGFAP 400x).

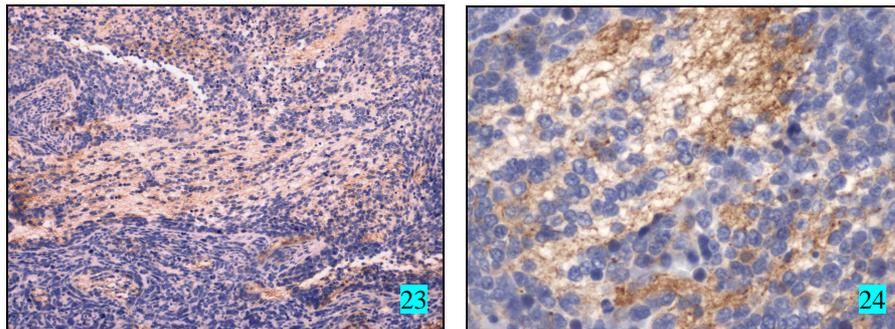


Figura 23: Area de diferenciación neuroblástica con positividad inmunohistoquímica para Neurofilamentos (NF 200x).

Figura 24: Detalle de positividad focal para neurofilamentos (NF 400 x).

3.3. -KI67

Es un **marcador de proliferación celular** que se expresa en las células en todas las fases del ciclo excepto G0.

El meduloblastoma es una neoplasia de elevada agresividad histológica con frecuentes mitosis y en la que cabe esperar altos índices de proliferación celular.

En nuestra serie en **tres casos (18,75%) el Ki67 fue intenso con más del 75% de núcleos tumorales positivos**. Estos casos asociaban además las siguientes características;

- tipo clásico
- necrosis tumoral moderada-intensa
- curso clínico agresivo con diseminación por LCR o extensión supratentorial.
- hiperplasia vascular en dos casos
- positividad inmunohistoquímica para P53

En **nueve (56,25%) se presentó positividad para este anticuerpo entre el 35 y 75% de núcleos tumorales (++)**.

En los **cuatro casos restantes el marcaje nuclear fue inferior al 35% (+)** y se encontró en casos que no asociaban necrosis tumoral.

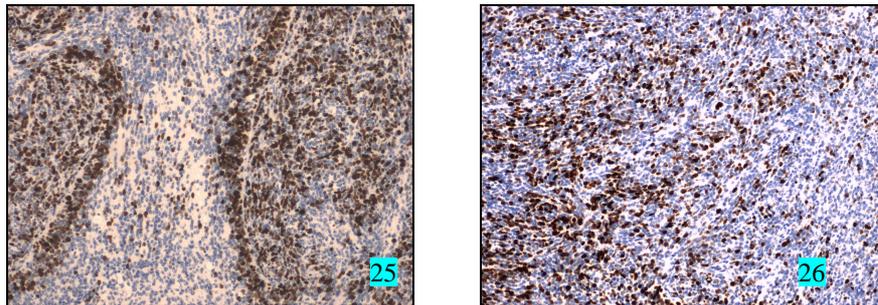


Figura 25: Inmunohistoquímica para Ki67 en meduloblastoma de tipo desmoplásico con mayor positividad en las áreas que rodean las islas pálidas (Ki-67 200x).

Figura 26: Meduloblastoma de tipo clásico con intensa positividad para Ki67 de distribución heterogénea (Ki- 67 200x).

3.4.- P53

La proteína P53 en nuestra serie se encuentra alterada en **seis casos (37,5%) todos ellos de tipo clásico. En tres de ellos** como se ha comentado previamente, **se asocia a otras variables de agresividad histológica** (necrosis tumoral, elevado índice de proliferación celular, hiperplasia vascular en dos casos) **y a curso clínico muy agresivo** (estadio T2 y T3 con diseminación al diagnóstico).

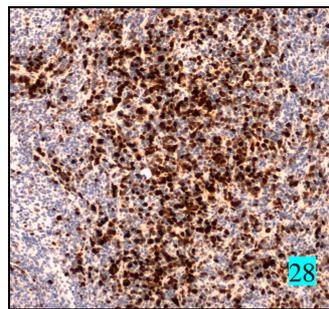
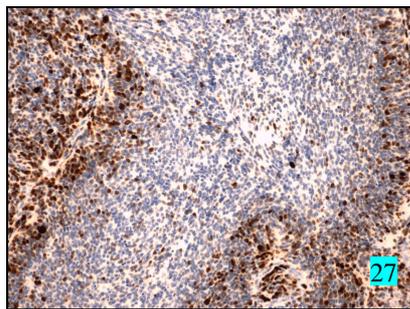


Figura 27: Estudio inmunohistoquímico para P53 mostrando patrón de positividad heterogéneo (P53 200 x).

Figura 28: Meduloblastoma de tipo clásico con intensa y difusa expresión inmunohistoquímica para P53 (P53 200x).

Tabla 3: Resultados del estudio Inmunohistoquímico en relación con otras variables histológicas y con el estadio tumoral.

TUMOR	TIPO HISTOLOGICO	HIPERPLASIA VASCULAR	NECROSIS	PGFAP	NF	P53	Ki67	ESTADIO
223	CLASICO	NO	NO	+	-	-	+	T2MI
179	CLASICO	NO	MODERADA	++	+	-	++	T2M0
137	CLASICO	NO	NO	+	-	-	+	T3aM1
125	CLASICO	NO	MODERADA	-	-	+	++	T3M2
112	CLASICO	NO	NO	+	-	-	+	T3bM0
101	CLASICO	NO	LEVE	+	-	-	++	T2M2
92	CLASICO	SI	INTENSA	-	-	++	+++	T3aM2
76	DESMOLASICO	NO	NO	++	++	-	++	T2M0
75	DESMOPLASICO	NO	NO	++	++	-	+	T2M0
73	CLASICO	NO	NO	+	-	-	++	T3M2
67	CLASICO	NO	MODERADA	+	-	++	+++	T3bM1
56	CLASICO	NO	NO	+	++	-	++	T2M0
50	CLASICO	NO	MODERADA	-	-	+	++	T3aM0
44	CLASICO	NO	NO	-	-	-	++	T3aM1
42	CLASICO	SI	INTENSA	-	-	+++	+++	T2aM1
19	CLASICO	NO	LEVE	-	-	++	++	T3aM1

En resumen al análisis de datos histológicos e histoquímicos de nuestra serie:

- 1. La serie incluye 14 casos de tipo clásico (87,5%) y 2 casos de tipo desmoplásico (12,5%). No se encuentran otros tipos histológicos.**
- 2. Se observa hiperplasia vascular en 2 casos que asociaban intensa necrosis tumoral y elevado índice de proliferación celular.**
- 3. Se constata necrosis tumoral en el 50% de los casos.**
- 4. Los meduloblastomas de tipo desmoplásico no presentan necrosis tumoral, hiperplasia vascular ni positividad inmunohistoquímica para P53 y el índice de proliferación celular que presentan es en un caso leve y otro moderado. Cursan sin diseminación al diagnóstico.**
- 5. -Se encuentra expresión de neurofilamentos y PGFAP en las islas pálidas de los tumores de tipo desmoplásico así como en estadios T2 sin diseminación en general.**
- 6. -Existen tres casos de tipo clásico que asocian criterios de agresividad histológica (necrosis intensa, hiperplasia vascular, elevado índice de proliferación) con inmunorreactividad para P 53 y práctica ausencia de expresión de neurofilamentos y PGFAP. Estos casos presentaron curso clínico agresivo.**
- 7. -Proporción ligeramente superior en nuestra serie de casos con expresión de PGFAP**
- 8. -La expresión de neurofilamentos se encuentra entre los límites de lo publicado en la literatura.**
- 9. -La positividad inmunohistoquímica para P53 se asocia a “criterios de alto riesgo”**

4. RESULTADOS DEL ESTUDIO MOLECULAR

4.1.- Genes estudiados

Tras el estudio de los genes localizados en la zona mínima de pérdida y la exclusión de los genes de los cuales se conocía la no implicación en el meduloblastoma se decidió abordar el análisis de los siguientes genes: **RUTBC1, MNT, PITPN, DPH1, y la EST T96691 que en el transcurso del trabajo se identificó como parte del gen RILP.** El gen HIC-1 (hipermethylated in cancer 1) fue estudiado pero debido a las dificultades técnicas para su estudio, los resultados obtenidos no se consideran fiables, por lo que no se presentan.

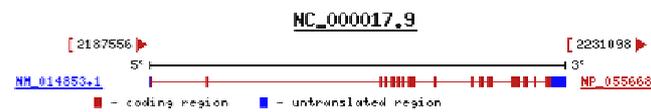
Algunos de estos genes codifican proteínas potencialmente relacionadas con el desarrollo de neoplasias. En otros casos el criterio de selección se basa en su localización u homologías encontradas en las bases de datos ya que existe poca información sobre sus características o función.

En el siguiente apartado se realiza una breve descripción sobre la localización, estructura, proteína que codifican y otras características conocidas de cada gen estudiado (NCBI Entrez Gene).

1. RUTBC1: (RUTBC1, RUN and TBC1 domain containing 1)

Este gen es buen candidato a gen supresor ya que presenta homología con otras secuencias que codifican para un dominio un RUN que podría jugar un papel importante en rutas de señalización de GTPasas similares a RAS así como para un dominio TBC con posible actividad inductora de GTPasas similares a RAB (NCBI Entrez Gene) [153].

Regiones genómicas, transcritos y productos:



Contexto Genómico

chromosome: 17; **Location:** 17p13.3



2. MNT: (MAX binding protein, ROX, MAD6, MXD6)

El grupo Myc/Max/Mad comprende un grupo de factores reguladores de la transcripción que co-interaccionan en la activación o inhibición de la misma. Este gen codifica una proteína miembro de este grupo con acción antagonista de la activación transcripcional Myc-dependiente [167]. Por tanto está implicado en los procesos de regulación de la proliferación celular y progresión en el ciclo celular.

Sommer en 1999 en una serie de 44 casos no encuentra alteración de la expresión de dicho gen en mRNA ni mutaciones con análisis de SSCP, sin embargo en un estudio posterior [152] se constata reducción de la expresión de dicho gen en 6 de 14 casos de meduloblastoma y es considerado como posible gen supresor implicado en este tumor.

Regiones genómicas, transcritos y productos:



Contexto Genómico:

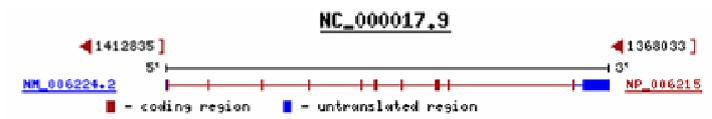
chromosome: 17; Location: 17p13.3



3. PITPN: (PHOSPHATIDYLINOSITOL TRANSFER PROTEIN, ALPHA)

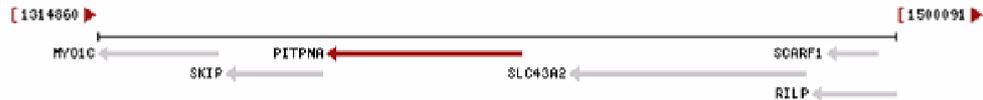
Es un miembro del grupo de proteínas citosólicas que participa en la transferencia de fosfolípidos entre membranas celulares (actividad transportadora de fosfatidilcolina, y fosfatidilinositol) que intervienen en el metabolismo lipídico y en la percepción visual [168-170].

Regiones genómicas, transcritos y productos:



Contexto Genómico:

chromosome: 17; Location: 17p13.3

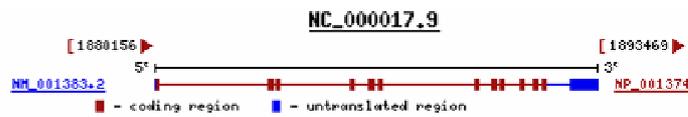


4. DPH1: (DPH2L, OVCA 1, FLJ33211.)

Codifica la proteína “*diphtheria toxin resistance for diphthamide biosynthesis-like*”. Es un gen supresor candidato en relación al cáncer de ovario.[153, 171-173].

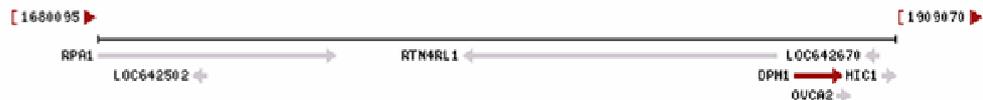
Dado que se encuentra localizado en la región y que se ha descrito como posible gen supresor en relación a otras neoplasias, fue seleccionado para su estudio.

Regiones genómicas, transcritos y productos:



Contexto Genómico:

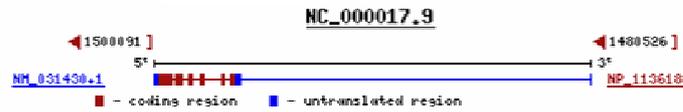
chromosome: 17; Location: 17p13.3



5. RILP: (RAB-INTERACTING LYSOSOMAL PROTEIN)

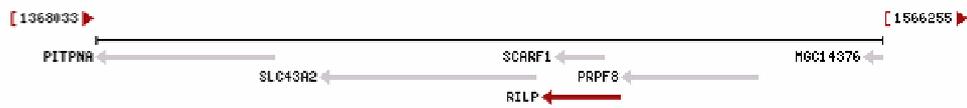
El dominio c-terminal de RILP interacciona con la GTPasa Rab 7 regulando el transporte endocítico celular. Posee por tanto un papel en la regulación lisosómica a nivel de la fusión, transporte y degradación de vesículas lisosómicas [174, 175].

Regiones genómicas, transcritos y productos:



Contexto Genómico:

chromosome: 17; Location: 17p13.3



4.2.- Estudios de expresión mediante RT-PCR

La aproximación utilizada para el estudio de la posible implicación de los genes seleccionados como posibles genes supresores de tumores en el meduloblastoma fue la RT-PCR. Mediante este tipo de tecnología, lo que se pretendía averiguar era la posible pérdida de expresión de los genes en los tumores, para relacionarlo con una posible vía de activación del ciclo celular por la inactivación del gen supresor de tumores.

Tras la extracción de ARN de los tumores se procedió a la retrotranscripción del ARN a DNacomplementario (ADNc) y la comprobación de la efectividad de estos procesos mediante la amplificación por PCR de un gen de expresión constitutiva que en nuestro caso fue la β 2microglobulina. Este paso lo consideramos de vital importancia en el proceso, ya que en el posterior estudio de expresión, la ausencia de la misma pretendemos que se deba a la ausencia real de expresión de los genes y no a problemas técnicos derivados de la falta de ARN tras la extracción o un fallo en la retrotranscripción.

Como se observa en la figura 29, este fenómeno se produjo en algunos casos, en los que fue necesario la repetición de la retrotranscripción y/o la extracción. En el caso de no obtener la suficiente cantidad de ARN debido al mal estado de la pieza tumoral, se eliminó el tumor del estudio. Finalmente se obtuvo buenos resultados de los 16 tumores de la serie final que se incluye en el presente trabajo.

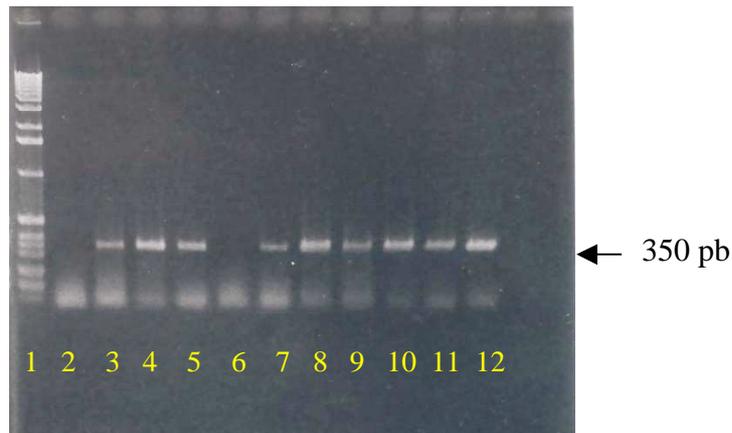


Figura 29: Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. El gel muestra el producto de PCR obtenido tras la amplificación con oligonucleótidos específicos de parte de la región transcrita del **gen β 2microglobulina** en un total de 10 muestras de DNAc obtenidas a partir de la retrotranscripción de ARN de muestras tumorales de meduloblastoma. La imagen nos muestra la ausencia de amplificación en una de las muestras, lo que demuestra que no es apta para el estudio posterior de expresión génica de los genes problema. Carreras: 1- marcador de pesos moleculares; 2- control negativo de la PCR, 3-12- Muestras tumorales.

La segunda fase del trabajo consistió en el estudio de la **expresión génica de los 5 genes seleccionados (RUTBC1, MNT, PITPN, DPH1 y RILP) mediante amplificación por PCR de secuencias específicas de los diferentes genes**. Para ello se diseñaron oligonucleótidos específicos de cada uno de los genes, que hemos descrito previamente en el apartado de materiales y métodos. Para el diseño de los mismos se obtuvieron las secuencias de ARN mensajero de las bases de datos (NCBI) y se intentó que dichos oligonucleótidos estuvieran situados entre dos exones diferentes para evitar la posible amplificación de DNAGenómico contaminante tras la extracción de ARN, o al menos la distinción de los dos productos de PCR resultantes por el tamaño del amplicón obtenido.

Como en algunos casos la estructura génica no estaba bien definida, se decidió tratar los ARN previamente a la retrotranscripción con una enzima con actividad DNasa para la eliminación del posible DNAGenómico contaminante tras la extracción del ARN. De esta manera nos permitió tener

la seguridad, en el estudio de expresión posterior, de que los productos de PCR obtenidos se debían a la expresión del gen que pretendíamos estudiar.

Los productos de PCR obtenidos se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa y se tiñeron posteriormente con bromuro de etidio. Con el fin de aumentar la sensibilidad y tener una mayor resolución en la separación de las bandas, en aquellos genes que mostraron pérdida de expresión, dichos productos de PCR se sometieron a electroforesis en poliacrilamida. La tinción en este segundo caso consistió en un revelado con el método rápido de tinción con plata descrito anteriormente. En las figuras 30 y 31 mostramos un ejemplo de los resultados obtenidos para el gen MNT.



Figura 30: La figura muestra el resultado obtenido tras la amplificación por PCR de un fragmento del gen MNT. La figura 2 corresponde a la imagen obtenida tras la electroforesis en un gel de agarosa. Carreras: 1.- marcador de pesos moleculares; 2.- control negativo de la PCR; 3 a 15 muestras tumorales

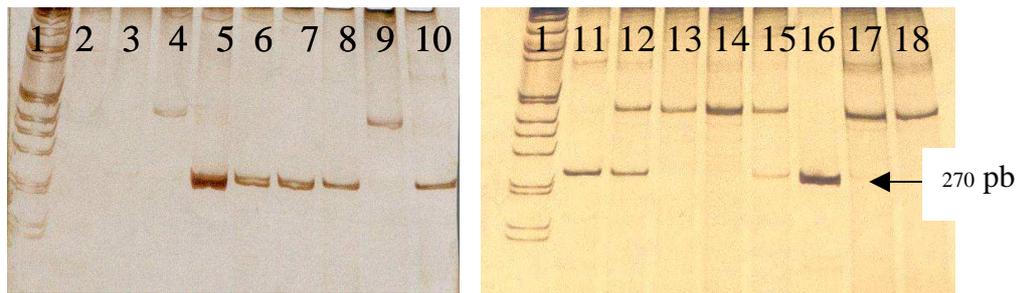


Figura 31: Electroforesis en gel de poliacrilamida del producto de amplificación del gen **MNT** tras retrotranscripción del RNA tumoral. La banda superior (de unas 450 pb) se interpretó como un artefacto de la amplificación probablemente debido a la amplificación inespecífica de una secuencia homóloga, dado que se aprecia especialmente en aquellas muestras negativas para MNT. 1: marcador de pesos moleculares; 2: control negativo de la PCR; 5-8, 10, 11, 12 y 16: muestras tumorales positivas para MNT; 3, 15 y 17 muestras débilmente positivas.

Los resultados obtenidos para el estudio de expresión de la totalidad de los 5 genes, así como la relación con la pérdida de heterocigosis en 17p, obtenida en un estudio anterior (*“Implicación del cromosoma 17, de las regiones cromosómicas 1p, 10q y de los genes TP 53 y Nmyc en el desarrollo de tumores infantiles del sistema nervioso.”* Carmen Orellana Alonso, Tesis Doctoral, Valencia, 1999 [36]) se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 4: Presencia/ausencia de expresión de los genes estudiados y relación con LOH.

TUMOR	Genes estudiados					LOH
	RUTBC1	DPH2	PITPN	MNT	RILP	
223	+	+	+	+	-	NO ESTUDIADA
179	+	+	+	+	-	NO ESTUDIADA
137	+	+	-	-	-	NO ESTUDIADA
125	+	+	+	+	-	NO ESTUDIADA
112	-	+	+	+	-	LOH
101	-	+	+	-	+	NO LOH
92	+(DEBIL)	+	+	+	-	NO LOH
76	+	+	+	+	-	NO LOH
75	+	+	+	+	+	LOH
73	+(DEBIL)	+	+	+	+(DEBIL)	LOH
67	-	+	+	+	+(DEBIL)	LOH
56	-	+	+	+	+(DEBIL)	LOH
50	-	+	+	+	+	LOH
44	-	+	+	-	-	LOH
42	-	-	-	+	-	NO LOH
19	+	+	+	+	-	NO ESTUDIADA
NO EXPRESAN	7 /16	1/16	2/16	3/16	10/16	

En la tabla se señala como + la presencia de expresión detectada mediante RT-PCR, en cada uno de los tumores estudiados y con un - la ausencia de la misma. En la columna de LOH (pérdida de heterocigosis) se resalta la pérdida o no pérdida de heterocigosis en aquellos tumores en los que se conocía por un análisis previo. Del resto de los tumores, tal y como se indica, se desconoce si presentan LOH en 17p o no.

Como se puede observar en la tabla, los genes **RUTBC1** y **RILP** fueron los que más pérdidas de expresión presentaron en los tumores, no observándose en ningún caso la pérdida total de expresión de ninguno de los genes estudiados. En el caso del gen RUTBC1, la pérdida de expresión se produjo en un 43.75% de los tumores. El gen RILP mostró una pérdida mayor de expresión, en concreto se perdía en un 62,5% de los casos. A estos hay que añadir otros casos que presentaron una reducción significativa del nivel de expresión, que no afectaba al resto de los genes. En consecuencia, se detectó una clara disminución de expresión de estos dos genes en un 56% y 81% de la serie respectivamente. **Al estudiar la correlación entre la pérdida de expresión de los mismos y la LOH, no encontramos una correlación significativa entre ambos eventos**

(test exacto de Fisher, $p > 0,1$; $p = 0,46$ RUTBC1, $p = 0,19$ RILP).

En el resto de los genes estudiados, la expresión de los mismos se conservaba en la mayoría de los tumores, llevándonos a descartarlos como candidatos a estar implicados como genes supresores de tumores en el meduloblastoma.

Como resumen de los resultados del estudio de expresión de los genes;

1.-No se observa pérdida total de expresión de ningún gen.

2.-El gen RILP pierde la expresión en 10 de los 16 casos (62,5%) y en 3 casos la expresión se encuentra disminuida. Por tanto la expresión se encuentra alterada en el 81% de los casos para este gen.

3.-El gen RUTBC1 pierde la expresión en 7 de los casos (43,7%) y presenta expresión disminuida en 2. En total, presenta expresión alterada en el 50% de los casos.

4.-Dada la pérdida de expresión significativa de los genes RUTBC1 y RILP, ambos son considerados genes supresores candidatos.

5.-No existe correlación entre la pérdida de expresión de los genes RUTBC1 y RILP y la presencia de LOH.

6.-Los genes MNT, DPH2 y PITPN conservan la expresión en la mayor parte de los tumores, por lo cual, en principio se descartan como genes supresores candidatos.

4.3.- PCR SEMICUANTITATIVA

Los resultados obtenidos hasta el momento sugerían que entre los genes estudiados, los principales candidatos para continuar el estudio eran el gen RUTBC1 y el gen RILP. Para la elección del gen que sería objeto de la posterior búsqueda de mutaciones puntuales decidimos **investigar cual de los dos genes mostraba un mayor nivel de pérdida (delección) en el DNAgénomico en nuestra serie de tumores.**

Para el desarrollo de este objetivo se diseñó una PCR semi-cuantitativa realizada sobre DNAgénomico total de los tumores. El experimento consistió en **amplificar simultáneamente dos regiones genómicas de los genes RILP y RUTBC1 en condiciones semi-cuantitativas**, es decir, disminuyendo el número de ciclos de forma que la amplificación por PCR de ambas secuencias no alcance el nivel de saturación, sino haciéndola finalizar durante su fase exponencial de replicación. La optimización de la PCR se realizó utilizando como DNAmolde muestras procedentes de controles normales sanos (sangre periférica de pacientes ajenos a este estudio que no padecían ninguna enfermedad neoplásica). Se realizaron varias pruebas con el fin de determinar el número de ciclos óptimo para obtener una cantidad de producto de la PCR detectable sin llegar al punto de saturación de la reacción y no comprometer la relación de cantidades de ambos productos (ver figura 32).



Figura 32: Gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio que muestra el resultado de la **PCR dúplex** en condiciones semi-cuantitativas de los genes **RILP y RUTBC1**. Carrera 1: marcador de pesos moleculares; 2: control negativo de la PCR; 3 a 5: muestras control; 6 a 15: muestras tumorales.

Densitometrado

Para definir la variación normal en la relación de intensidades de ambos genes, se analizaron tres muestras control. Se resolvieron los productos de PCR en geles de poliacrilamida que se digitalizaron mediante el escaneado de los geles, una vez revelados. Las intensidades relativas (densitometrado) de las bandas correspondientes a ambos fragmentos se analizaron mediante el programa informático Intelligent Quantifier versión 2.1 (Bio Image).

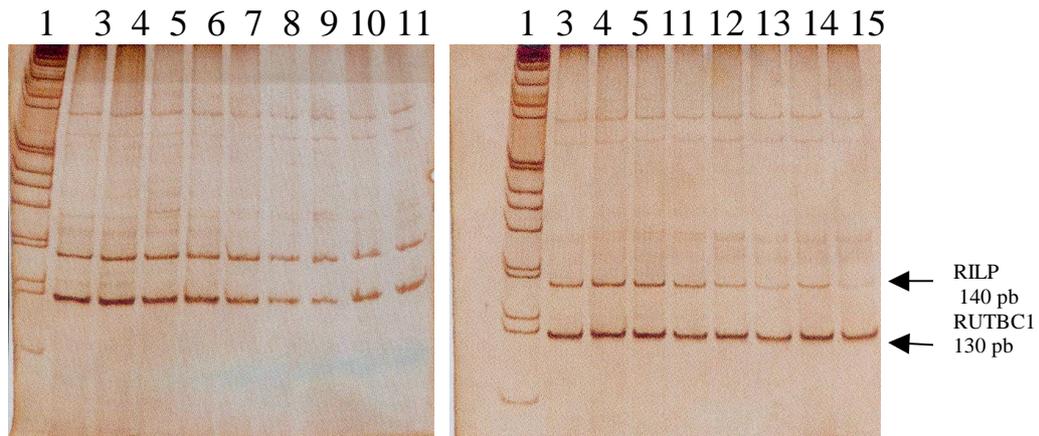


Figura 33: - Geles de poliacrilamida a partir de los cuales se realizó el densitometrado. Carrera 1: marcador de pesos moleculares; 3 a 5: muestras control; 6 a 15: muestras tumorales. Obsérvese cómo en las carreras 13 a 15 se aprecia visualmente una intensidad relativa del fragmento correspondiente al gen RILP claramente inferior.

Con el análisis informático se obtuvieron los valores tanto de la intensidad absoluta como de la relativa. El rango de valores correspondiente a la intensidad relativa entre ambos genes obtenido en las muestras control fue el siguiente:

$$RI_{(RILP/RUTBC1)} = 0,37-0,63.$$

Dicho rango fue el que se tomó como referencia para el posterior análisis de los resultados obtenidos tras la amplificación de la serie de tumores.

Un ejemplo del análisis de las intensidades obtenidas para los pares de bandas en diferentes tumores se muestra en la figura 5. Los resultados obtenidos tras el densitometrado, así como el ratio entre las intensidades (RILP/RUTBC1), se muestran en la Tabla 5.

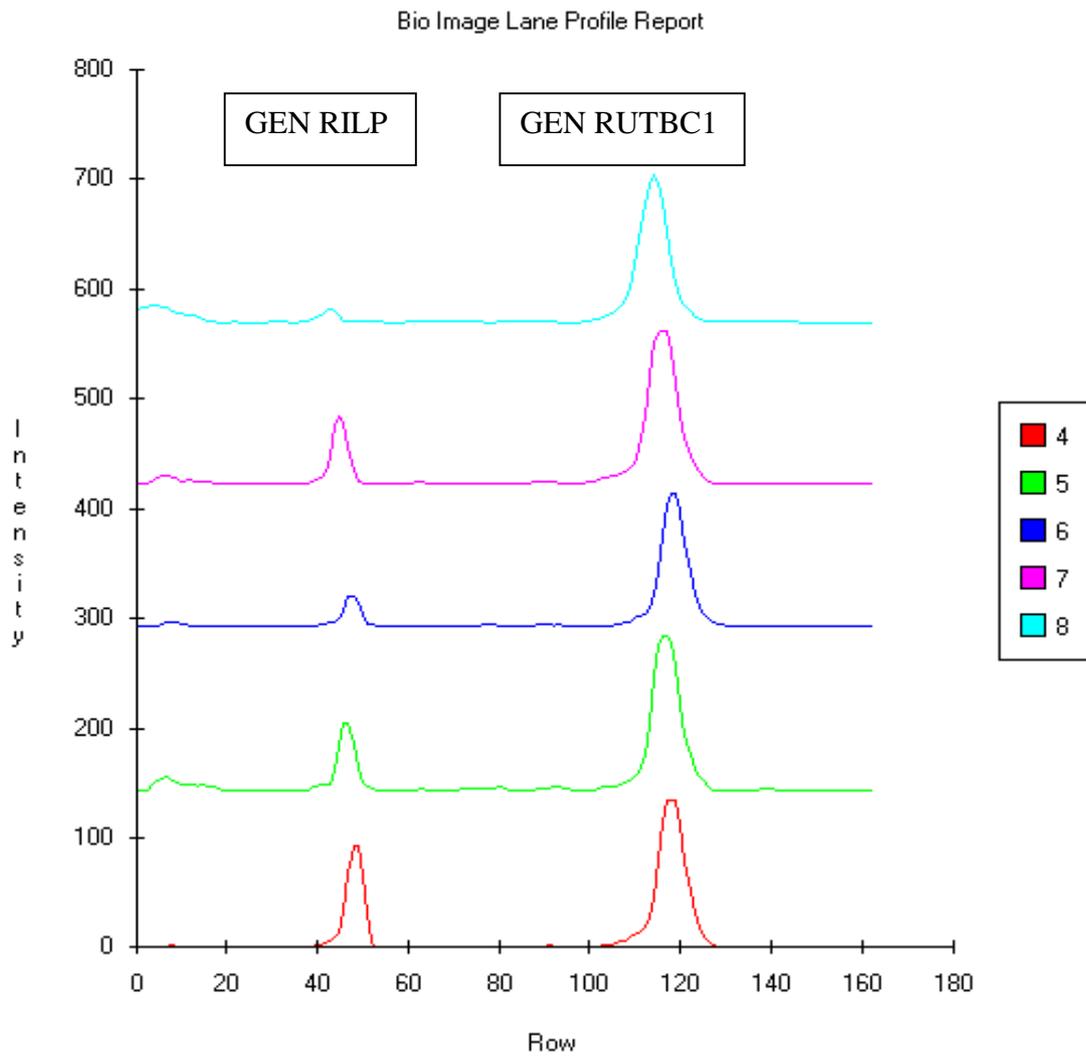


Figura 34: Curvas de densitometrado obtenidas para 5 muestras tumorales diferentes. Los picos reflejan la intensidad absoluta de las bandas obtenidas tras la electroforesis de los fragmentos amplificados simultáneamente en la misma reacción de PCR, y su posterior escaneado. Los valores de intensidad absoluta se obtienen por la medición del área bajo la curva obtenida, a partir de los cuales el programa calcula la intensidad relativa de cada pico.

Tabla 5: Resultados obtenidos tras el cálculo de las intensidades en el densitometrado de las bandas de PCR. En la última columna se muestra la intensidad relativa entre ambos genes, para los que el rango de variación normal en las mismas condiciones de amplificación resultó ser de 0,37 a 0,63.

MUESTRA	INTENSIDAD RILP	INTENSIDAD RUTBC1	RATIO (RILP/ RUTBC1)
112	0,91	116,42	0,007
104	22,35	153,83	0,14
101	5,23	93,23	0,05
92	19,50	50,81	0,12
75	54,29	143,23	0,37
73	96,60	172,73	0,55
44	94,08	168,34	0,55
76	61,12	150,52	0,4
56	19,82	34,30	0,57
50	23,74	53,28	0,44
42	33,99	30,39	1,11
34	24,39	34,36	0,70
19	66,35	95,12	0,69
15	56,05	125,20	0,44
11	75,10	155,39	0,48
PROMEDIO	43,56	105,06	0,44

Se debe señalar que se estudiaron cuatro casos en los que se realizó la PCR semicuantitativa en genómico pero no se pudo estudiar la expresión de los genes seleccionados al no disponer de muestra en condiciones apropiadas (**casos 104, 34, 15, 11**).

Como se puede observar en la tabla;

- existen 10 casos tumorales (75, 73, 44, 76, 56, 50, 34, 19, 15, 11) que muestran una intensidad relativa en el mismo rango que los controles
- una muestra tumoral (42) tiene un aumento significativo de intensidad relativa
- existen cuatro tumores donde la relación de intensidades es significativamente menor en el gen RILP (112, 104, 101, 92).

Esto nos indicaría que **el gen RILP se pierde en un mayor número de casos en los tumores de meduloblastoma que el gen RUTBC1. Estos resultados apuntarían como un mejor candidato a gen supresor de tumores en meduloblastoma al gen RILP.**

4.4.- Búsqueda de mutaciones del gen RILP

La última parte del estudio consistió en el análisis de mutaciones en la región codificante del gen RILP. **La hipótesis de trabajo consistía en asumir que aquellos tumores con pérdida de heterocigosis para este gen, que además mantuvieran un cierto nivel de expresión del mismo, podrían presentar mutaciones puntuales causantes de una pérdida de función del alelo remanente.** Para ello se diseñaron oligonucleótidos que cubrieran toda la región codificante del gen, utilizando como referencia la secuencia del ARN mensajero publicada en la base de datos (NCBI). Las PCRs por lo tanto se realizaron utilizando como molde el ADNc procedente de los tumores. El diseño de los oligonucleótidos sobre la secuencia de ARNm se muestra en el apartado de material y métodos.

La secuenciación se realizó en un total de 5 tumores seleccionados por presentar LOH en 17p (44, 73, 75, 99 y 102), dado que en los tumores restantes no se expresa este gen, no se disponía de muestra de ARNm, o bien la ausencia de LOH supone una menor probabilidad de que presentaran mutaciones puntuales.

En todos los casos se amplificó mediante PCR cada uno de los fragmentos que cubrían la totalidad de la región codificante y posteriormente se realizó una secuenciación automática en ambos sentidos de los mismos.

En la figura 35 podemos observar algún ejemplo de las secuencias obtenidas.

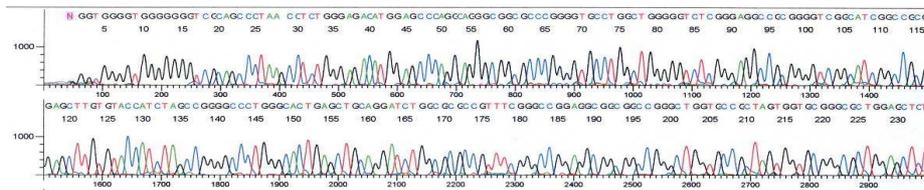


Figura 35: Secuencia obtenida tras la amplificación por PCR del primer fragmento del cDNA del Gen RILP y la posterior secuenciación automática por electroforesis capilar fluorescente.

Tras la revisión y análisis mediante programas informáticos (BLAST) de cada una de las secuencias, no se encontraron cambios en las mismas respecto de la secuencia normal del gen.

La ausencia de mutaciones por lo tanto nos llevaría a pensar que el gen RILP no estaría implicado como gen supresor de tumores en el meduloblastoma.

VI. DISCUSIÓN

1-INTRODUCCIÓN

El estudio de las bases moleculares del cáncer es primordial para conocer la biología tumoral y los eventos que acompañan al inicio, desarrollo y diseminación de una neoplasia [176]. El entendimiento de las alteraciones biológicas y moleculares del cáncer proporciona información de alteraciones específicas con interés diagnóstico, pronóstico, marcadores de enfermedad mínima residual o alteraciones que impliquen una modificación terapéutica (resistencia o sensibilidad a fármacos, nuevas dianas terapéuticas, modificación de dosis e intensidad de tratamiento) [1].

La incorporación de nuevas técnicas moleculares como FISH, RT-PCR y SKY y CGH, han permitido mejoras significativas en el diagnóstico y estudio de determinados tipo de neoplasias, al ser más precisas, rápidas, sensibles y específicas que el cariotipo y con la ventaja añadida de precisar escasa muestra para su realización. En concreto, existen numerosos trabajos publicados acerca del análisis molecular del meduloblastoma con estas metodologías [160-163, 177-181].

El descubrimiento de alteraciones moleculares que indiquen dianas terapéuticas y diseño de nuevos fármacos son el punto de mira de la investigación oncológica actualmente, esperando alcanzar una mayor efectividad y selectividad tisular y menores efectos adversos que las terapias convencionales [16].

Los tumores pediátricos son idóneos para la búsqueda e identificación de genes implicados en el desarrollo de una neoplasia [137, 176]. Ello es debido a dos circunstancias: en las neoplasias infantiles los factores ambientales tienen menor importancia que en las neoplasias de los adultos ya que el tiempo de exposición a ellos es menor y en los estudios citogenéticos y moleculares realizados en estos tumores, las alteraciones encontradas suelen ser menores y más constantes [137], lo cual permite definir regiones génicas para la realización de estudios moleculares. Por otra parte, los tumores infantiles son en general muy quimiosensibles, ya que en su mayoría son tumores embrionarios o indiferenciados [44]. El descubrimiento de alteraciones moleculares que permitan seleccionar los tratamientos o aplicar nuevas terapias es de vital importancia.

No obstante, la aplicación de estas nuevas tecnologías en tejido tumoral es problemática a causa de diferentes aspectos:

- precisa disponer de material tisular en condiciones óptimas y estandarizadas
- el material tumoral para la realización de estudios moleculares en neoplasias infantiles es todavía escaso dado que son tumores infrecuentes y, en general, no se dispone de series amplias
- la calidad de las muestras depende en gran medida de la rapidez y la forma de obtención, así como el procesamiento y el transporte de las mismas.
- existe variación de las técnicas aplicadas en los estudios de investigación sobre todo si las muestras proceden de diferentes hospitales.

Por ello, la creación de **redes y bancos de tumores** es primordial para mejorar la disponibilidad y calidad del material [166].

La infraestructura idónea para la obtención y preservación de las muestras tumorales junto a una actitud abierta e inquieta hacia la investigación y aplicación de nuevas metodologías, han hecho posible la realización del presente trabajo.

2.-MEDULOBLASTOMA: TUMOR EMBRIONARIO DE ETIOPATOGENIA DESCONOCIDA. POSIBLE GEN SUPRESOR DE TUMORES EN 17p

Las neoplasias infantiles han adquirido en las últimas décadas una importancia progresiva en el ámbito de la pediatría. A partir del primer año de vida, el cáncer es actualmente la segunda causa de mortalidad infantil tras los accidentes. La leucemia es la neoplasia pediátrica más frecuente seguida de los tumores del SNC y los linfomas [16].

El meduloblastoma es el tumor maligno del sistema nervioso central más frecuente en la infancia [27, 32, 47] [82]. El comportamiento biológico del meduloblastoma es agresivo con tendencia a metastatizar y diseminarse a través del líquido cefalorraquídeo [182]. En los últimos 20 años han existido indudables progresos que han hecho aumentar la supervivencia de este tumor [40] [183] [184-188], pero es difícil el control de los tumores diseminados y de las recaídas [189-192]. La supervivencia a los 5 años es algo mayor del 50%, y la toxicidad de los tratamientos y las secuelas que producen son muy severas [193-195]. Por ello se precisa realizar nuevos estudios en este tipo de neoplasia con la finalidad de mejorar las terapias y/o manejo del tumor [196, 197].

Histopatológicamente es un **tumor embrionario** que se incluye según la clasificación de la OMS de los tumores del Sistema Nervioso Central entre los **Tumores Neuroectodérmicos Primitivos (PNET)** [41] [42]. El meduloblastoma constituye el 85 % de los PNET y es de localización cerebelosa.

Los **tumores embrionarios** son tumores primitivos, clínicamente agresivos que ocurren mayoritariamente durante la primera década de la vida [43] [44]. Son distintos de los tumores anaplásicos que comúnmente surgen en el Sistema Nervioso Central de los adultos aunque pueden tener en común algunos rasgos histopatológicos.

Todos los tumores embrionarios independientemente de su histogénesis comparten las siguientes características [41, 42];

- elevada celularidad siendo constituidos fundamentalmente por células pequeñas redondas y azules
- frecuentes mitosis
- necrosis al menos focal

- tendencia a diseminación leptomenígea y metástasis a través del LCR
- curso clínico agresivo

Existe evidencia que los eventos oncogénicos y las células diana afectas en la transformación neoplásica de los tumores embrionarios son diferentes de las bases de transformación maligna y progresión en los gliomas anaplásicos [198-200]. Estos tumores surgen de la **transformación de las células neuroepiteliales indiferenciadas e inmaduras y merecen ser considerados como tumores diferentes en cuanto a clasificación histológica y comportamiento biológico**. Diversas poblaciones celulares en el sistema nervioso central inmaduro son dianas en la transformación neoplásica. Al tratarse de células inmaduras poseen diferentes capacidades de diferenciación [117], incluyendo la bipotencial (neuronal-gliial) [73, 201, 202], por ello la interpretación inmunohistoquímica en estas neoplasias debe realizarse con cautela.

Sin embargo existen tumores embrionarios con rasgos distintivos que sí permiten diferenciarlos como entidades clínico patológicas definidas: neuroblastoma cerebral, retinoblastoma, ependimoblastoma, meduloblastoma y meduloepitelioma [41, 42].

El termino de PNET abraza el concepto de que estos tumores surgen de las células neuroepiteliales primitivas del neuroeje y que pueden presentar diferenciación fenotípica diversa ya que proceden de la transformación de células inmaduras [117]. La transformación neoplásica de estas poblaciones de células embrionarias se asume que se encuentra más en relación a eventos genéticamente determinados [29, 32, 66, 137, 176], que a la incidencia de factores ambientales (radiación,tóxicos, infecciones virales) como sucede en las neoplasias de los adultos.

La etiopatogenia de los tumores embrionarios y en concreto del meduloblastoma es, por tanto, desconocida y su histogénesis controvertida, sin embargo, existen muy diversas publicaciones en la literatura en relación a esta cuestión y desde diferentes puntos de vista.

Siguiendo el razonamiento que en las neoplasias embrionarias la incidencia de los factores ambientales no es la base de la transformación neoplásica, no se han demostrado **factores ambientales** relacionados directamente con este tumor, aunque se constató un aumento de la incidencia de meduloblastoma en relación a la exposición intraútero al **Papovavirus SV40** presente en las

vacunas de la polio utilizadas durante los años 1955-1961. Posteriormente diversos autores [54, 203-205] han constatado, con diferentes metodologías, la presencia de secuencias genómicas de virus JC y de la onco-proteína viral antígeno T mediante inmunohistoquímica en meduloblastoma, sugiriendo que la infección por este virus puede jugar un papel en el desarrollo de la neoplasia, pero no se ha podido demostrar hasta la fecha una implicación directa en la etiopatogenia del tumor [206].

Aunque el meduloblastoma suele ser un tumor esporádico, se ha descrito la presencia de meduloblastoma en casos aislados de gemelos homo y dicigóticos [207] y asociado a otros tumores cerebrales [208], tumor de Wilms [209] y tumor rabdoide renal [210]. Además existen dos síndromes hereditarios, **síndrome de Gorlin y de Turcot**, que cursan con elevada incidencia de meduloblastomas [211]. En el **síndrome de Gorlin** (carcinoma basocelular nevoide) existe predisposición a desarrollar carcinomas basocelulares y meduloblastoma de tipo desmoplásico [59] [212] [213]. Estos enfermos presentan mutaciones germinales del gen PTCH (Patched), localizado en 9q22, que suponen una inactivación del mismo. El gen PTCH codifica un receptor de membrana que juega un papel importante en el desarrollo embrionario del SNC. La señal Sonic hedgehog (Shh) es producida por las células de Purkinje y regula la proliferación de las células de la capa granular del cerebelo con receptores Patched. Alteraciones en los genes y proteínas que regulan esta ruta pueden implicar una proliferación celular descontrolada de las células progenitoras del cerebelo. Se han observado mutaciones del gen PTCH en aproximadamente el 8% de los meduloblastomas esporádicos [212] y preferentemente en los de tipo desmoplásico.

En el **síndrome de Turcot** (poliposis intestinal adenomatosa familiar) existen mutaciones germinales del gen APC [214]. Este gen también aparece frecuentemente mutado en el cáncer de colon esporádico y está alterado en aproximadamente el 13% de los meduloblastomas esporádicos [215-217]. De modo muy infrecuente el meduloblastoma puede aparecer en pacientes con **mutaciones germinales del gen P53** [62].

Sin embargo, las mutaciones encontradas en estos síndromes hereditarios no parecen tener una gran relevancia en la etiopatogenia del meduloblastoma esporádico, por lo que se precisa de nuevos estudios moleculares para la identificación de nuevos genes o alteraciones implicadas en la biología de esta neoplasia.

Diversos estudios han demostrado que a nivel citogenético y molecular el meduloblastoma se caracteriza por pérdida de material genético en el brazo corto del cromosoma 17 presente aproximadamente en el 50% de los casos, por lo que se supone existe un gen supresor de tumores alojado en esta región cuya pérdida estaría implicada en el desarrollo del tumor [15, 27, 28, 126, 142, 200].

El estudio de pérdidas en 17p, el análisis de las mismas y de los genes alojados en esta región [31, 33, 37, 150-152, 165] es el principal punto de partida en el estudio molecular de esta neoplasia y han sido propósito de estudio de diversos autores y grupos investigadores.

El presente trabajo continúa una línea de investigación iniciada en el año 2000 en el Hospital Universitario La Fe sobre alteraciones citogenéticas y moleculares de los tumores pediátricos del Sistema Nervioso Central [36]. El trabajo ha sido el fruto de la colaboración interdisciplinaria con los servicios de Oncología Pediátrica, Neurocirugía, Anatomía Patológica y la Unidad de Genética de este hospital que han permitido una adecuada obtención, conservación y estudio del material.

Esta infraestructura ha permitido disponer de 16 casos de meduloblastoma en condiciones adecuadas para la realización de estudios moleculares. El tamaño de la serie es equiparable al tamaño muestral de diversos estudios publicados sobre alteraciones moleculares en este tumor por lo que podemos considerarla como adecuada o representativa.

En este estudio;

1. se han valorado las características histológicas de una serie de 16 meduloblastomas y se ha realizado un estudio inmunohistoquímico de P53, Neurofilamentos, Proteína Gliofibrilar Ácida y Ki67
2. se ha realizado un estudio molecular en las muestras tumorales tratando de identificar un posible gen supresor de tumores localizado en el brazo corto del cromosoma 17 implicado en la etiopatogenia del meduloblastoma

3.-CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y EPIDEMIOLÓGICAS DE LA SERIE

El presente trabajo se basa en un estudio retrospectivo con casos procedentes de un solo centro. El factor geográfico no supone un sesgo en este tipo de tumores ya que no existe clara incidencia de factores ambientales que pudieran estar geográficamente determinados.

Las características clínicas y epidemiológicas de los enfermos, en rasgos generales, concuerdan con las comunicadas en la bibliografía.

- La **mediana de edad** de la serie es de 6,1 años, el pico de mayor incidencia es entre 5 y 9 años [49, 50, 218]. No obstante, hay que tener en cuenta que nuestra serie incluye únicamente casos pediátricos.
- La **distribución por sexos** muestra un predominio masculino con relación hombre :mujer 2,2:1 dentro del rango descrito por otros autores [52, 219-221].
- La **localización tumoral** más frecuente es en el vermis cerebeloso, como es habitual, ya que el 75% de los meduloblastomas se sitúan en esta localización [41, 42]. Los dos casos que aparecen en localización lateral (hemisferios cerebelosos) son de tipo histológico desmoplásico y en los niños de mayor edad (11,9 y 12,2 años).
- En cuanto a la **extensión de la enfermedad** no se encuentra en nuestra serie ningún caso en T1 o T4 al diagnóstico. Todos ellos se diagnosticaron en T3 (nueve casos) y T2 (siete casos). Estos datos se podrían justificar de la siguiente manera: en estadio T1 la neoplasia no suele dar sintomatología, ya que los síntomas iniciales de la enfermedad son debidos fundamentalmente a la hipertensión intracraneal (nauseas, vómitos, cefalea) y no acontecen cuando el tumor es pequeño. Tampoco se realiza screening de estas neoplasias ya que son muy infrecuentes con lo que es dificultoso el diagnóstico en estadios tempranos. De igual manera, es muy raro el diagnóstico en estadio T4 ya que la sintomatología neurológica aparece previamente.
- El 50% de los casos presentaron **diseminación en el SNC al diagnóstico** [182]. Este porcentaje se encuentra en el rango de lo esperable aunque ligeramente elevado. Ello puede ser debido al tamaño muestral. Se desechó la posible existencia de otros factores, genéticos o ambientales, específicos de nuestra población y que

impliquen una mayor riesgo de diseminación al diagnóstico, ya que el resto de variables clínico-patológicas se encuentra dentro de los rangos descritos.

- Dado que en nuestros casos existe un elevado porcentaje con diseminación tumoral por LCR, la mayoría de los casos se corresponden a **tumores de alto riesgo**.

4. HISTOPATOLOGÍA

Todos los casos han sido diagnosticados según los criterios microscópicos convencionales descritos para el meduloblastoma. Se trata, por tanto, de tumores indiferenciados de células pequeñas, redondas y azules, con elevada densidad celular y actividad mitótica y presencia de necrosis tumoral.

La distribución por tipos histológicos de la serie entra en lo esperable para el tamaño muestral. **El 87,5 % de los casos son de tipo histológico clásico y dos casos (12,5%) son de tipo desmoplásico. Estos porcentajes concuerdan con lo descrito en la literatura [41, 42].**

No se encuentran otros tipos histológicos en nuestra serie probablemente debido al tamaño de la muestra.

Como se ha comentado previamente, según las fuentes consultadas, el meduloblastoma de tipo desmoplásico se localiza más frecuentemente en hemisferios cerebelosos y en niños de mayor edad. Los dos casos de este tipo presentes en nuestra serie son de localización hemisférica y en los enfermos de mayor edad (11 y 12 años) de la serie.

A su vez se ha descrito que este tipo histológico es de mejor pronóstico que el tipo clásico. En nuestros enfermos los casos de tipo desmoplásico se clasificaron en el grupo de riesgo estándar y no presentaron diseminación al diagnóstico (M0).

Otras variables histológicas revisadas han sido la hiperplasia vascular y necrosis tumoral.

4.1.- Hiperplasia vascular

En el meduloblastoma el patrón vascular habitual es de vasos de pequeño calibre y paredes finas observándose muy aisladamente la hiperplasia vascular glomeruloide típica de los gliomas de alto grado [72, 82].

En nuestra serie, solo se ha constatado hiperplasia vascular en dos casos (12,5%) que además presentaron elevado índice de proliferación celular e intensa necrosis tumoral y metástasis al diagnóstico. En la valoración del grado histológico de las neoplasias del sistema nervioso central del adulto, la proliferación vascular es indicador de agresividad histológica. Extrapolando este dato, los dos casos de meduloblastoma que en nuestra serie han mostrado proliferación vascular asocian rasgos histológicos de agresividad como intensa necrosis y Ki 67 elevado.

4.2.- Necrosis tumoral

La necrosis tumoral individual y la presencia de núcleos apoptóticos es un rasgo histológico característico del meduloblastoma [222-224]. También se han descrito de modo aislado la presencia de amplia necrosis tumoral e incluso quistificación de modo infrecuente.

En nuestros casos la valoración histológica de la necrosis tumoral entra en el rango de lo esperable.

Cabe destacar que existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de positividad para P53 y necrosis tumoral ($p= 0,007$) como se comenta más adelante.

5.- INMUNOHISTOQUÍMIA

Ya que el meduloblastoma es un tumor embrionario que procede de la **transformación de las células neuroepiteliales indiferenciadas e inmaduras** [44, 45] con diferenciación fenotípica diversa incluyendo la bipotencial (neuronal-glial) [45, 73, 76, 86, 117, 225], la interpretación inmunohistoquímica del meduloblastoma debe realizarse con cautela ya que puede mostrar heterogeneidad inmunofenotípica [226].

En el presente trabajo se ha valorado la expresión inmunohistoquímica de PGFAP, Neurofilamentos, P53 y Ki 67.

5.1.-PGFAP

La presencia de diferenciación glial en el meduloblastoma es un tema controvertido , aunque se han objetivado células incuestionablemente tumorales positivas para PGFAP, tanto en el tipo clásico, como en el desmoplásico o en las metástasis extraneurales de meduloblastoma [90]). El estudio inmunohistoquímico para la PGFAP es de difícil valoración ya que es complejo establecer si las células inmunoreactivas son neoplásicas, astrocitos reactivos o atrapados en el tumor [45].

En los **distintos estudios publicados se constata positividad entre el 25-60%** de los casos [80, 86, 96, 202, 227]. A grandes rasgos se puede considerar que la positividad focal en células claramente tumorales se corresponde a diferenciación y que una positividad intensa y difusa suele ser debida a una gliosis reactiva.

En el presente trabajo se han valorado como positivas las tinciones en células con núcleo claramente tumoral.

Se ha constatado positividad inmunohistoquímica para PGFAP en 10 de los casos (68,7%). Este dato es un tanto superior a lo reflejado en la bibliografía, pero consideramos que no es debido a una mala interpretación de la gliosis reactiva o glía atrapada. En la mayoría de los casos la positividad fue leve y no se ha objetivado ningún caso con positividad intensa.

Los dos casos de tipo desmoplásico han mostrado positividad moderada localizada en las islas pálidas de los nódulos, que se corresponden a áreas de mayor diferenciación, como se refiere en la literatura [74, 78, 80, 93, 228].

Hemos observado en nuestra serie que la expresión de PGFAP se encuentra asociada en general a ausencia de necrosis tumoral. Una posible hipótesis para justificar este dato sería que si la expresión de PGFAP indica diferenciación, a mayor diferenciación menor agresividad histológica.

Jans y Tohyama constatan en sus series relación entre la expresión inmunohistoquímica para GFAP y mal pronóstico [48] [76], sin embargo otros autores, no encuentran relación significativa entre el inmunofenotipo del meduloblastoma y la supervivencia [117].

5.2.- NEUROFILAMENTOS

Aunque el meduloblastoma es un tumor con diferenciación neuronal predominante [45, 74], para este marcador se han descrito positivities muy variables desde muy bajas [86, 93], a mayores del 30% de células tumorales en la bibliografía revisada [48, 76, 99, 202]. En general, la positividad a este anticuerpo **se encuentra relacionada con la nodularidad del tumor y el tipo histológico desmoplásico**, siendo casi inexistente en los meduloblastomas de células grandes [80].

En nuestro trabajo se ha constatado positividad inmunohistoquímica para NF en 4 casos (25%) coincidiendo en el rango descrito por otros autores. De los casos positivos, dos se corresponden al tipo desmoplásico y a nivel de las islas pálidas que, como es conocido, se corresponden a áreas de mayor diferenciación en el tumor. Los dos casos positivos restantes son de tipo clásico. Ya que en nuestra serie no se encuentran otros tipos histológicos no podemos aportar datos en este sentido.

5.3. -P53

Aunque la proteína P53 aparece mutada muy infrecuentemente en este tumor [47], diversos autores han constatado una asociación significativa entre la expresión inmunohistoquímica de P53 y un mal pronóstico.

Eberhart, en un estudio de tumores cerebrales embrionarios que incluye 64 meduloblastomas, describe positividad inmunohistoquímica para P53 en el 18% de meduloblastomas “no anaplásicos” y en el 45% de los de tipo “anaplásico” (células grandes), asociandola a inferiores supervivencias [81]. Otros autores constatan la relación entre expresión inmunohistoquímica para P53 y mal pronóstico [94, 96, 229] tanto en meduloblastoma como en PNET supratentoriales.

En nuestra serie hemos observado una relación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica de p53 y la presencia de necrosis tumoral. Este dato apoyaría la hipótesis de que la expresión de P53 es un marcador de agresividad en esta neoplasia. A su vez, en nuestros casos la expresión inmunohistoquímica de esta proteína se asocia a Ki 67 elevados.

5.4.- Ki67

La fracción de crecimiento del meduloblastoma, que se constata por la fracción de células que expresan Ki-67, es con frecuencia mayor al 20% de la población tumoral [80, 98, 230, 231]. En las áreas más activas el índice de proliferación celular puede superar el 50% existiendo considerable variabilidad regional en el propio tumor. En los meduloblastomas de tipo clásico, los núcleos positivos para Ki67 se encuentran distribuidos de manera homogénea, en los de tipo desmoplásico se encuentra menor proporción de núcleos Ki-67 positivos a nivel de las islas pálidas [98, 232].

En nuestra serie, hemos constatado elevados índices de proliferación celular de modo que 12 de los 16 tumores mostraron positividad en más del 35% de los núcleos tumorales. Ya que la mayor parte de nuestros casos son de tipo clásico, la expresión de Ki67 presenta predominantemente una distribución homogénea.

Los dos casos de tipo desmoplásico mostraron, como se refiere en la literatura, menor proporción de núcleos positivos a nivel de las islas pálidas.

Contrastando los datos epidemiológicos, histológicos, inmunohistoquímicos y la diseminación tumoral hemos observado que la muestra es representativa y los datos histológicos e inmunohistoquímicos concuerdan con lo descrito en la literatura:

1. Se constata en nuestros casos que los meduloblastomas de tipo desmoplásico son más frecuentes en localización cerebelosa lateral y en niños de más edad
 - a. Ambos casos cursan sin diseminación al diagnóstico y son de riesgo estándar
 - b. No muestran necrosis tumoral ni hiperplasia vascular
 - c. Ki67 es leve en un caso y moderado en el restante
 - d. La inmunohistoquímica para P53 es negativa
 - e. Inmunohistoquímicamente, se constata la positividad para NF y PGFAP en las islas pálidas de los nódulos

En conjunto, los marcadores biológicos y clínicos de los dos casos de tipo desmoplásico, son de buen pronóstico.

2. En nuestra serie se observa una mayor frecuencia de casos PGFAP positivos que lo descrito en la literatura. Aunque no se observa una relación estadísticamente significativa, se observa mayor frecuencia de casos PGFAP positivos en tumores en estadíos T2 y sin metástasis al diagnóstico.
3. La expresión de NF se encuentra entre los límites de lo referido en la literatura. Se observa una relación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica para NF y
 - 3.a. el estadío T2 frente a T3 ($p = 0,01$)
 - 3.b. ausencia de metástasis al diagnóstico ($p = 0,008$)
4. Hemos observado que la intensa positividad para Ki67 se asocia a
 - a. presencia de positividad inmunohistoquímica para P53
 - b. diseminación por LCR al diagnóstico y/o extensión supratentorial
 - c. marcadores histológicos de agresividad; necrosis tumoral moderada intensa e hiperplasia vascular
5. Existe una relación estadísticamente significativa entre la presencia de positividad para P53 y necrosis tumoral ($p = 0,007$)

Estos resultados aparecen reflejados en la tabla 6.

Tabla 6: Relación entre el estadiaje, diseminación tumoral y necrosis con el estudio inmuno-histoquímico. A la izquierda se indican las relaciones significativas (o cercanas a la significación) mediante el test exacto de Fischer.

	PGFAP		P=0,12	NF		P=0,01	P53		P=0,12	Ki67		
	-	+		-	+		-	+		leve	moderada	intensa
T2	1	6		3	4		6	1		2	4	1
T3	5	4		9	0		4	5		2	5	2
M0	1	5	P=0,21	2	4	P=0,008 (M0 vs M1/2)	5	1		2	3	0
M1	3	3		6	0		3	3		2	2	2
M2	2	2		4	0		2	2		0	3	1
NECROSIS LEVE	2	8	P=0,09	7	3		9	1	P=0,007	4	6	0
MODERADA/INTENSA	4	2		5	1		1	5		0	6	0

6.-ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES LOCALIZADOS EN 17p EN MUESTRAS TUMORALES DE MEDULOBLASTOMA.

Los estudios citogenéticos en meduloblastoma presentan frecuentes pérdidas de material genético en el brazo corto del cromosoma 17 (17p)[36, 137-141, 147, 164] A nivel molecular el meduloblastoma se caracteriza por la pérdida de heterocigosis (LOH) en un 30-50% de los casos [27-30, 32, 154, 233]. Nuestra hipótesis de trabajo se basa en la posible existencia de un gen supresor de tumores en esta región implicado en la biología de esta neoplasia [15, 31, 33, 37, 150-152, 164, 165]

El estudio de la expresión de un gen en el mRNA de las células tumorales, es una estrategia que nos permite abordar la posible implicación de ese gen en relación a una neoplasia. Si un gen muestra alterada su expresión en tejido tumoral puede ser un indicador de que existe una relación entre el gen y el tumor.

La pérdida de expresión de un gen puede deberse a diferentes factores (deleción, inactivación epigenética, mutaciones puntuales, microdeleciones, microinversiones, alteración de la regulación génica, etc). Por ello, si se detecta una expresión aberrante de un gen, se han de realizar nuevos estudios para valorar estos eventos.

El presente trabajo se ha realizado a partir de una serie de 16 muestras de meduloblastoma en las que se había estudiado previamente la pérdida de heterocigosis de 17p mediante microsatélites y determinado una región mínima de pérdida común a todos los tumores de nuestra serie [36]. Las series publicadas permiten delimitar la región mínima común de pérdida en 17p13.3 coincidiendo con los resultados de nuestro trabajo [153].

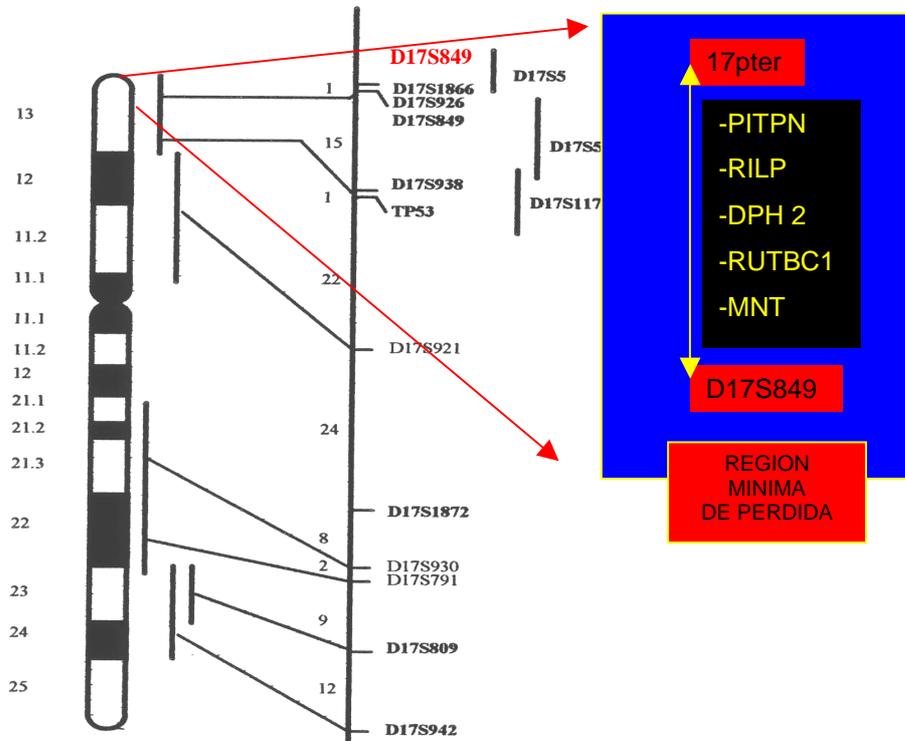


Figura 36: Esquema del cromosoma 17 y localización de la región mínima de pérdida (subtelomérica en 17p13.3) y de los genes estudiados en el presente trabajo.

En la región subtelomérica del cromosoma 17 se localizan diversos genes candidatos debido a su localización, función u homología con otros genes conocidos. Algunos de ellos habían sido estudiados previamente al presente trabajo por otros autores descartándose como genes supresores candidatos.

En concreto, el gen **LIS1** [31, 37], el gen **ABR** [32], **RPH3AL** [165] y el gen **TP53** [33, 47, 155, 156] ya habían sido estudiados previamente.

El gen **HIC** (hypermethylated in cancer) es un gen supresor candidato localizado en 17p13.3 que frecuentemente presenta pérdidas alélicas en cáncer de mama y otras neoplasias, estando también descritas alteraciones de este gen en meduloblastoma [150, 164]. En nuestro estudio las dificultades técnicas no nos han permitido valorar los resultados.

En nuestro trabajo se han seleccionado los genes DPH2, RUTBC1, MNT, RLIP y PTIPN como posibles genes supresores candidatos alojados en la región crítica y se ha estudiado su expresión mediante RT-PCR.

El criterio de selección se ha basado en algunos de ellos simplemente en la localización o en homologías encontradas con otros genes, ya que de la mayoría se desconoce su función exacta.

El gen **MNT** posee función reguladora de la transcripción [167] y por tanto podría ser un buen candidato a gen supresor de tumores que además, ya había sido estudiado por otros autores y con metodologías similares a la nuestra.

Sommer en 1999 [151], estudió la expresión del gen **MNT** en una serie de 44 casos de meduloblastoma no encontrando alteración de la expresión del gen ni mutaciones con análisis de SSCP. Posteriormente en 2004 Cvekl [152] constata reducción de la expresión de dicho gen en 6 de 14 casos de meduloblastoma, considerándolo posible gen supresor implicado en este tumor.

En nuestra serie de acuerdo con lo descrito por Sommer, la expresión de **MNT** se conserva en 13 de 16 casos y por tanto en el presente trabajo es descartado como posible gen candidato.

El gen **DPH1** (también llamado **DPH2L** y **OVCA2**) es un posible gen supresor [171] en relación al cáncer de ovario [153, 172, 173] aunque no hemos encontrado ninguna publicación en las bases de datos en que sea estudiado en el meduloblastoma (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). En el estudio de expresión en nuestras muestras tumorales este gen se perdió únicamente en un caso (1/16) por lo que fue descartado como gen candidato.

Es escasa la información existente sobre el sobre el gen **PITPN** (NCBI Entrez Gene). Forma parte de un grupo de proteínas citosólicas que participa en la transferencia de fosfolípidos en las membranas celulares [168-170] y no

hemos constatado ningún estudio de este gen en relación al meduloblastoma. En el estudio de expresión del gen en las muestras tumorales, esta se pierde únicamente en 2 casos y por tanto también es descartado como posible gen implicado en el meduloblastoma.

Los dos genes que han mostrado una mayor pérdida de expresión son RUTBC1 y RILP.

El gen RUTBC1, dada su homología, podría ser un buen gen supresor candidato ya que en su estructura contiene un dominio RUN y un dominio TBC con posible acción sobre GTPasas similares a RAB (NCBI Entrez Gene).

El gen RILP, mediante su dominio C-terminal, interacciona con la GTPasa Rab 7 y posee un papel en la regulación de las vesículas lisosómicas [174, 175] . No sería descabellado suponer que estas vesículas transmiten señales intracelulares y transmembrana que pueden tener importancia en la fisiología y metabolismo celular, y por tanto ser un buen candidato a gen supresor.

El gen **RUTBC1** pierde la expresión en 7/16 casos y si añadimos los casos con expresión disminuida, la expresión de este gen se encuentra alterada en el 50% de ellos.

En cuanto al gen **RILP**, que es el que mayor pérdida de expresión muestra de los genes estudiados en este trabajo, se pierde en 10 casos del total y en 3 casos se encuentra expresión muy disminuida. Aunando ambos datos, la expresión de este gen está alterada en el 80% de los casos.

Ambos genes han sido considerados posibles genes supresores candidatos dada:

- su localización cromosómica
- un patrón de expresión alterada en las muestras tumorales
- su homología o posible función

No hemos encontrado en las fuentes consultadas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) estudios que relacionen estos dos genes con el meduloblastoma. En cuanto a la localización cromosómica de los genes, el orden de los genes desde el extremo de 17p sería: PITPN>RILP>DPH2>RUTBC1>MNT. Todos ellos están situados entre 1,36 y 2,25 megabases desde el telómero de 17p

El resumen de los resultados obtenidos del estudio de expresión se encuentra reflejado en la tabla 7.

Tabla 7: Estudio de expresión de los genes estudiados en las muestras tumorales, los genes se han dispuesto según su localización cromosómica desde el extremo 17p. No se aprecia un patrón determinado de pérdida en función de dicha localización.

TUMOR	Genes estudiados				
	PITPN	RILP	DPH2	RUTBC1	MNT
223	+	-	+	+	+
179	+	-	+	+	+
137	-	-	+	+	-
125	+	-	+	+	+
112	+	-	+	-	+
101	+	+	+	-	-
92	+	-	+	+ (DEBIL)	+
76	+	-	+	+	+
75	+	+	+	+	+
73	+	+ (DEBIL)	+	+ (DEBIL)	+
67	+	+ (DEBIL)	+	-	+
56	+	+ (DEBIL)	+	-	+
50	+	+	+	-	+
44	+	-	+	-	-
42	-	-	-	-	+
19	+	-	+	+	+
NO EXPRESAN	2 /16	10/16	1/16	7/16	3/16

Se analizó una posible asociación entre la ausencia de expresión de los genes candidatos (RUTBC1 y RILP) y la pérdida de heterocigosis en 17p13 (Tablas 8 y 9). Observamos que no existe correlación significativa entre

ambos eventos, a pesar de que cabría esperar que ambos estuvieran relacionados. Se podría pensar que si la pérdida de heterocigosis en esta región se debe a una pérdida física de material cromosómico debería afectar al nivel de expresión de los genes localizados en la misma. Sin embargo, la pérdida de heterocigosis, detectada mediante la pérdida de alelos de marcadores microsatélite, también puede haberse producido por recombinación mitótica o conversión génica que no implican la pérdida física de copias del gen. Esto explicaría que algunos tumores con pérdida de heterocigosis puedan mantener el nivel de expresión de los genes en el rango de lo normal. No obstante, es importante recalcar que el pequeño tamaño muestral no permite extraer conclusiones definitivas

Tabla 8

	EXPRESION RUTBC1	NO EXPRESION DE RUTBC1
LOH	2	5
NO LOH	2	2

Test exacto de Fisher p= 0,46

Tabla 9

	EXPRESION RILP	NO EXPRESION DE RILP
LOH	5	2
NO LOH	1	3

Test exacto de Fisher p= 0,19

7.- ESTUDIO DE PCR SEMICUANTITATIVA DE LOS GENES RILP y RUTBC1

Una vez seleccionados los genes RUTBC1 y RILP como posibles genes candidatos en base a estudios previos de expresión, se ha realizado un estudio para evaluar cual de los dos genes presentaba un mayor grado de pérdida en el DNA genómico de nuestra serie de tumores. Para ello, se realizó una PCR semi-cuantitativa sobre DNA genómico total de los tumores, amplificando simultáneamente dos fragmentos pertenecientes a los genes RILP y RUTBC1 en condiciones semicuantitativas.

Tras la realización de la PCR en condiciones semicuantitativas para los dos genes en las muestras tumorales, se constata que la relación de intensidades es significativamente menor para el gen RILP, y por tanto aparentemente se pierde en un mayor número de casos en las muestras de meduloblastoma que el gen RUTBC1. Esto concuerda con la mayor frecuencia de pérdida de expresión del gen RILP frente a la de RUTBC1. Por otra parte, no necesariamente el gen que se pierde con más frecuencia es el implicado en el desarrollo tumoral. Actualmente sabemos que existen variaciones en el número de copias (CNVs) que afectan a genes enteros y que no son sino variantes polimórficas en la dosis de determinados genes. Estos polimorfismos son especialmente frecuentes en las regiones subteloméricas, donde se alojan los genes estudiados [234, 235].

Comparando los ratios con el estudio de expresión y LOH (ver tabla 10):

- 1.- El caso que presenta un incremento significativo de la intensidad relativa (que podría deberse a delección de RUTBC1, pero no de RILP) muestra pérdida de expresión de ambos genes y no presenta LOH.
- 2.- De los 3 casos en que la relación de intensidades es significativamente menor, en dos de ellos (112 y 92) se observa pérdida de expresión del gen RILP, en el restante (101) la expresión de RILP se conserva. Sólo el caso 112 presenta LOH. (no se aprecia relación entre estos eventos)
- 3.- De los 6 casos con un ratio en el mismo rango que los controles se observaron 4 casos con expresión alterada de RILP (19, 56, 73, 76) y 2 casos que mantienen la expresión (50 y 75). Además, 4 de ellos presentan LOH, 1 no muestra LOH y en el restante no se ha estudiado.

El hecho de no encontrar correlación entre nuestro estudio y el previamente realizado sobre la LOH en estos mismos casos, se puede explicar por dos motivos: por un lado, la pérdida de heterocigosis no siempre implica pérdida de material, y por otra parte, teniendo en cuenta la proximidad entre ambos genes lo más probable sería que la pérdida de heterocigosis les afecte por igual, salvo que un segundo evento, como una pequeña microdelección, originase una pérdida completa (en homocigosis) de uno de los dos genes.

Tabla 10: En la siguiente tabla se contrastan los resultados obtenidos del estudio de expresión de los genes RUTBC1 y RILP en las muestras tumorales, la pérdida de heterocigosis en 17p (no estudiada en todos los casos) y la intensidad relativa obtenida del estudio en DNAGenómico de ambos genes en condiciones semicuantitativas (no estudiado en todos los casos al no disponerse de material).

TUMOR	EXPRESION RUTBC1	EXPRESION RILP	LOH	RATIO RILP/RUTBC1 (0,37 - 0,63)
223	+	-	NO ESTUDIADA	NO ESTUDIADA
179	+	-	NO ESTUDIADA	NO ESTUDIADA
137	+	-	NO ESTUDIADA	NO ESTUDIADA
125	+	-	NO ESTUDIADA	NO ESTUDIADA
112	-	-	LOH	0,007
101	-	+	NO LOH	0,05
92	+(DEBIL)	-	NO LOH	0,12
76	+	-	NO LOH	0,4
75	+	+	LOH	0,37
73	+(DEBIL)	+(DEBIL)	LOH	0,55
67	-	+(DEBIL)	LOH	NO ESTUDIADA
56	-	+(DEBIL)	LOH	0,57
50	-	+	LOH	0,44
44	-	-	LOH	NO ESTUDIADA
42	-	-	NO LOH	1,11
19	+	-	NO ESTUDIADA	0,69
NO EXPRESAN	7 /16	10/16		

8.- BÚSQUEDA DE MUTACIONES DEL GEN RILP

Para finalizar el trabajo, se ha realizado un análisis de mutaciones en la región codificante del gen RILP. Asumiendo que aquellos tumores con pérdida de heterocigosis para este gen, que además mantuvieran un cierto nivel de expresión del mismo, podrían presentar mutaciones puntuales causantes de una pérdida de función del alelo remanente, se secuenciaron cinco tumores seleccionados por presentar LOH en 17p a partir del correspondiente DNAGenómico.

La secuenciación automática por electroforesis capilar fluorescente y posterior análisis computacional (BLAST) de las muestras no mostraron mutaciones. Por tanto, **el gen RILP muy probablemente, no es un gen implicado en la patogenia del meduloblastoma.**

Los resultados moleculares obtenidos de este trabajo, aunque no han permitido cumplir los objetivos en toda su extensión, son válidos. El planteamiento de este estudio de cara a la identificación del gen supresor de tumores implicado en el meduloblastoma tal vez es muy ambicioso. Queda pues, una puerta abierta para continuar este trabajo en el estudio de nuevos genes en relación a esta neoplasia.

Nota añadida con posterioridad

Con posterioridad al presente trabajo se han abierto nuevas líneas de investigación que estudian la posible implicación del **gen REN** en la patogenia del meduloblastoma. Lo cual supondría una confirmación de los resultados del presente trabajo.

Como ya se ha comentado, durante el desarrollo inicial del cerebelo, las células granulares progenitoras proliferan en la capa granular externa del cerebelo fetal reguladas por la señal “sonic hedgehog” producida en las células de Purkinje. Un fallo en la señal hedgehog puede resultar en una proliferación celular descoordinada [236]. El gen REN (KCTD11) localizado en 17p13.2, es un supresor de la señal Hedgehog y su inactivación puede conducir a una alteración en su regulación [237]. Las alteraciones en 17p pueden condicionar una pérdida de dicho gen alterando la secuencia de dicha señal, sin embargo la presencia de muy escasas mutaciones en esta ruta sugiere que existen factores epigenéticos que puedan llevar a la disrregulación [238]. Se precisan de nuevos estudios para afianzar esta hipótesis.

VII. CONCLUSIONES

Conclusiones a los datos epidemiológicos, histopatológicos e inmunofenotípicos del estudio.

1. Los datos epidemiológicos, morfológicos e inmunofenotípicos de nuestra serie concuerdan con lo descrito en la literatura.
2. Se ha constatado una relación estadísticamente significativa entre la expresión inmunohistoquímica de P53 y la necrosis tumoral.
3. La intensa positividad para Ki67 en los tumores se asocia a positividad inmunohistoquímica para P53 y a marcadores de agresividad histológica (necrosis moderada-intensa, hiperplasia vascular).
4. Por el contrario, la expresión de neurofilamentos y posiblemente de PGFAP, se asocia a estadios más tempranos de la enfermedad y ausencia de metástasis al diagnóstico.

Conclusiones del estudio molecular.

1. Los estudios de expresión en las muestras tumorales de meduloblastoma permiten descartar a los genes DPH2, MNT y PITPN como posibles genes implicados en la etiopatogenia del meduloblastoma ya que se expresan en los tumores estudiados.
2. En base a dichos estudios de expresión, los genes RILP y RUTBC1 son considerados como genes candidatos, ya que su expresión se encuentra notablemente reducida en las muestras tumorales.
3. No se ha constatado una relación estadísticamente significativa entre la pérdida de expresión de los genes RILP y RUTBC1 con la pérdida de heterocigosis en 17p13.3.
4. No se han encontrado mutaciones en el gen RILP en las muestras tumorales con presencia de pérdida de heterocigosis para la región 17p13.3. En consecuencia, el gen RILP, muy probablemente no esté implicado en la patogenia del meduloblastoma, al menos como gen supresor tumoral.

VIII. BILIOGRAFÍA

1. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
2. Muñoz, A.e.a., *Cáncer, genes y nuevas terapias.*, ed. E. Hélice. 1997, Madrid.
3. Bishop, J.M.e.a., *Molecular Oncology*. 1996, New York: Scientific American, Inc.
4. Vogelstein, B. and K.W. Kinzler, *p53 function and dysfunction*. Cell, 1992. **70**(4): p. 523-6.
5. McNeish, I.A., S.J. Bell, and N.R. Lemoine, *Gene therapy progress and prospects: cancer gene therapy using tumour suppressor genes*. Gene Ther, 2004. **11**(6): p. 497-503.
6. Ueda, K., et al., *The 3p21.3 tumor suppressor NPRL2 plays an important role in cisplatin-induced resistance in human non-small-cell lung cancer cells*. Cancer Res, 2006. **66**(19): p. 9682-90.
7. Feng, Q., et al., *Promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in urine from patients with cervical neoplasia*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(6): p. 1178-84.
8. Ripperger, T., et al., *Promoter methylation of PARG1, a novel candidate tumor suppressor gene in mantle-cell lymphomas*. Haematologica, 2007. **92**(4): p. 460-8.
9. Cirpan, T., et al., *MMAC tumor suppressor gene expression in ovarian endometriosis and ovarian adenocarcinoma*. Eur J Gynaecol Oncol, 2007. **28**(4): p. 278-81.
10. Castiblanco, G.A., et al., *[Pathogenic role of PTEN tumor suppressor gene in ovarian cancer associated to endometriosis]*. Rev Med Chil, 2006. **134**(3): p. 271-8.
11. Striteska, D., *[The tumor suppressor gene p53]*. Acta Medica (Hradec Kralove) Suppl, 2005. **48**(1): p. 21-5.
12. Rodriguez-Cruz, M., M. del Prado, and M. Salcedo, *[Genomic retinoblastoma perspectives: implications of tumor suppressor gene RB1]*. Rev Invest Clin, 2005. **57**(4): p. 572-81.
13. Purnomosari, D., et al., *A novel BRCA2 mutation in an Indonesian family found with a new, rapid, and sensitive*

- mutation detection method based on pooled denaturing gradient gel electrophoresis and targeted sequencing.* J Clin Pathol, 2005. **58**(5): p. 493-9.
14. Ciernikova, S., et al., *The novel exon 11 mutation of BRCA1 gene in a high-risk family.* Neoplasma, 2003. **50**(6): p. 403-7.
 15. Cogen, P.H. and J.D. McDonald, *Tumor suppressor genes and medulloblastoma.* J Neurooncol, 1996. **29**(1): p. 103-12.
 16. Lopez Almaraz, R., A. Montesdeoca Melian, and J. Rodriguez Luis, *[The role of molecular genetics in childhood cancer].* An Pediatr (Barc), 2003. **59**(4): p. 334-44.
 17. Michalova, K. and Z. Zemanova, *[Molecular cytogenetics in diagnostics of malignant diseases].* Cas Lek Cesk, 2006. **145**(7): p. 532-7.
 18. Bacher, U., et al., *Conventional cytogenetics of myeloproliferative diseases other than CML contribute valid information.* Ann Hematol, 2005. **84**(4): p. 250-7.
 19. Debes-Marun, C.S., et al., *Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma.* Leukemia, 2003. **17**(2): p. 427-36.
 20. Marzin, Y., et al., *Chromosome 1 abnormalities in multiple myeloma.* Anticancer Res, 2006. **26**(2A): p. 953-9.
 21. Chang, H.H., et al., *Cytogenetics in childhood acute lymphoblastic leukemia in Taiwan: a single-institutional experience.* Pediatr Hematol Oncol, 2006. **23**(6): p. 495-506.
 22. Ohguri, T., et al., *Cytogenetic analysis of myxoid liposarcoma and myxofibrosarcoma by array-based comparative genomic hybridisation.* J Clin Pathol, 2006. **59**(9): p. 978-83.
 23. de Alava, E. and W.L. Gerald, *Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. Review.* J Clin Oncol, 2000. **18**(1): p. 204-13.
 24. Mitelman, F., et al., *Clinical significance of cytogenetic findings in solid tumors.* Cancer Genet Cytogenet, 1997. **95**(1): p. 1-8.
 25. Mitelman, F., F. Mertens, and B. Johansson, *A breakpoint map of recurrent chromosomal rearrangements in human neoplasia.* Nat Genet, 1997. **15 Spec No**: p. 417-74.
 26. Tinguely, M. and S. Frigerio, *[Assessment of translocations in routine diagnostics of a surgical pathology unit].* Ther Umsch, 2006. **63**(4): p. 279-85.

27. Scheurlen, W.G., J. Krauss, and J. Kuhl, *No preferential loss of one parental allele of chromosome 17p13.3 in childhood medulloblastoma*. *Int J Cancer*, 1995. **63**(3): p. 372-4.
28. Cogen, P.H., et al., *Involvement of multiple chromosome 17p loci in medulloblastoma tumorigenesis*. *Am J Hum Genet*, 1992. **50**(3): p. 584-9.
29. Albrecht, S., et al., *Microsatellite analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 9q, 11p and 17p in medulloblastomas*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1994. **20**(1): p. 74-81.
30. Kraus, J.A., et al., *Loss of heterozygosity at locus F13B on chromosome 1q in human medulloblastoma*. *Int J Cancer*, 1996. **67**(1): p. 11-5.
31. Pietsch, T., A. Koch, and O.D. Wiestler, *Molecular genetic studies in medulloblastomas: evidence for tumor suppressor genes at the chromosomal regions 1q31-32 and 17p13*. *Klin Padiatr*, 1997. **209**(4): p. 150-5.
32. Steichen-Gersdorf, E., et al., *Deletion mapping on chromosome 17p in medulloblastoma*. *Br J Cancer*, 1997. **76**(10): p. 1284-7.
33. McDonald, J.D., et al., *Physical mapping of chromosome 17p13.3 in the region of a putative tumor suppressor gene important in medulloblastoma*. *Genomics*, 1994. **23**(1): p. 229-32.
34. Zakrzewska, M., et al., *Molecular abnormalities in pediatric embryonal brain tumors--analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 1, 5, 9, 10, 11, 16, 17 and 22*. *Clin Neuropathol*, 2004. **23**(5): p. 209-17.
35. Cogen, P.H., et al., *Deletion mapping of the medulloblastoma locus on chromosome 17p*. *Genomics*, 1990. **8**(2): p. 279-85.
36. Orellana, A.C., *Implicación del cromosoma 17, de las regiones cromosómicas 1p y 10q, y de los genes TP 53 y Nmyc en el desarrollo de los tumores infantiles del sistema nervioso*, in *Departamento de Genética*. 1999, Facultad de Ciencias Biológicas: Valencia.
37. Koch, A., et al., *Molecular analysis of the lissencephaly gene 1 (LIS-1) in medulloblastomas*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 1996. **22**(3): p. 233-42.

38. Sadler, T.W., *Embriología Médica Langman 9ª Edición*. 2004, Madrid: Editorial Médica Panamericana.
39. Cowell, J.K., *Genetics of paediatric solid tumours*. Br Med Bull, 1994. **50**(3): p. 600-23.
40. Peris-Bonet, R., et al., *Childhood central nervous system tumours--incidence and survival in Europe (1978-1997): report from Automated Childhood Cancer Information System project*. Eur J Cancer, 2006. **42**(13): p. 2064-80.
41. Louis, D., et al., *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. 4 ed. 2007, Lyon.
42. Kleihues, P.a.C., W K., *World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Tumours of the Nervous System 2000*, Lyon.
43. Navajas, A. and A. Fernández Teijeiro, *Embryonic tumours of the Central Nervous System*. Clin Transl Oncol, 2005. **7**(4): p. 219-27.
44. Dehner, L.P., *The evolution of the diagnosis and understanding of primitive and embryonic neoplasms in children: living through an epoch*. Mod Pathol, 1998. **11**(7): p. 669-85.
45. Katsetos, C.D. and P.C. Burger, *Medulloblastoma*. Semin Diagn Pathol, 1994. **11**(2): p. 85-97.
46. Scheurlen, W.G., et al., *Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome*. J Clin Oncol, 1998. **16**(7): p. 2478-85.
47. Badiali, M., et al., *p53 gene mutations in medulloblastoma. Immunohistochemistry, gel shift analysis, and sequencing*. Diagn Mol Pathol, 1993. **2**(1): p. 23-8.
48. Janss, A.J., et al., *Glial differentiation predicts poor clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors*. Ann Neurol, 1996. **39**(4): p. 481-9.
49. Roberts, R.O., et al., *Medulloblastoma: a population-based study of 532 cases*. J Neuropathol Exp Neurol, 1991. **50**(2): p. 134-44.
50. Agerlin, N., et al., *Childhood medulloblastoma in Denmark 1960-1984. A population-based retrospective study*. Childs Nerv Syst, 1999. **15**(1): p. 29-36; discussion 36-7.

51. Hubbard, J.L., et al., *Adult cerebellar medulloblastomas: the pathological, radiographic, and clinical disease spectrum*. J Neurosurg, 1989. **70**(4): p. 536-44.
52. Giordana, M.T., et al., *Epidemiology of adult medulloblastoma*. Int J Cancer, 1999. **80**(5): p. 689-92.
53. Farwell, J.R., G.J. Dohrmann, and J.T. Flannery, *Medulloblastoma in childhood: an epidemiological study*. J Neurosurg, 1984. **61**(4): p. 657-64.
54. Khalili, K., *Human neurotropic JC virus and its association with brain tumors*. Dis Markers, 2001. **17**(3): p. 143-7.
55. Rogers, L., et al., *Medulloblastoma in association with the Coffin-Siris syndrome*. Childs Nerv Syst, 1988. **4**(1): p. 41-4.
56. Kuijten, R.R., et al., *Family history of cancer and seizures in young children with brain tumors: a report from the Childrens Cancer Group (United States and Canada)*. Cancer Causes Control, 1993. **4**(5): p. 455-64.
57. Sato, K., et al., *Comparison of tumor-associated surface antigens on cells from medulloblastomas and from other neoplasms of the human nervous system*. Childs Brain, 1978. **4**(2): p. 83-94.
58. Atahan, I.L., et al., *Basal cell carcinomas developing in a case of medulloblastoma associated with Gorlin's syndrome*. Pediatr Hematol Oncol, 1998. **15**(2): p. 187-91.
59. Aliani, S., et al., *Medulloblastoma with extensive nodularity in nevoid basal cell carcinoma syndrome*. Med Pediatr Oncol, 2003. **40**(4): p. 266-7.
60. Mastronardi, L., et al., *Association between neuroepithelial tumor and multiple intestinal polyposis (Turcot's syndrome): report of a case and critical analysis of the literature*. Neurosurgery, 1991. **28**(3): p. 449-52.
61. McLaughlin, M.R., et al., *Medulloblastoma and glioblastoma multiforme in a patient with Turcot syndrome: a case report*. Surg Neurol, 1998. **49**(3): p. 295-301.
62. Orellana, C., et al., *A novel TP53 germ-line mutation identified in a girl with a primitive neuroectodermal tumor and her father*. Cancer Genet Cytogenet, 1998. **105**(2): p. 103-8.
63. Corkill, A.G. and C.F. Ross, *A case of neurofibromatosis complicated by medulloblastoma, neurogenic sarcoma, and*

- radiation-induced carcinoma of thyroid.* J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1969. **32**(1): p. 43-7.
64. Bailey, P. and H. Cushing, *Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1925. **11**(1): p. 82-4.
65. Vandenberg, S.R., M.M. Herman, and L.J. Rubinstein, *Embryonal central neuroepithelial tumors: current concepts and future challenges.* Cancer Metastasis Rev, 1987. **5**(4): p. 343-65.
66. Katsetos, C.D., et al., *On the neuronal/neuroblastic nature of medulloblastomas: a tribute to Pio del Rio Hortega and Moises Polak.* Acta Neuropathol (Berl), 2003. **105**(1): p. 1-13.
67. Kadin, M.E., L.J. Rubinstein, and J.S. Nelson, *Neonatal cerebellar medulloblastoma originating from the fetal external granular layer.* J Neuropathol Exp Neurol, 1970. **29**(4): p. 583-600.
68. Becker, L.E. and D. Hinton, *Primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system.* Hum Pathol, 1983. **14**(6): p. 538-50.
69. Katsetos, C.D., et al., *Differential localization of class III, beta-tubulin isotype and calbindin-D28k defines distinct neuronal types in the developing human cerebellar cortex.* J Neuropathol Exp Neurol, 1993. **52**(6): p. 655-66.
70. Eberhart, C.G., et al., *Apoptosis, neuronal maturation, and neurotrophin expression within medulloblastoma nodules.* J Neuropathol Exp Neurol, 2001. **60**(5): p. 462-9.
71. Goldbrunner, R.H., et al., *Different vascular patterns of medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumors.* Int J Dev Neurosci, 1999. **17**(5-6): p. 593-9.
72. Maire, J.P., et al., *[Medulloblastoma in children. Prognostic incidence of vascular hyperplasia, coagulation necrosis and postoperative clinical state on survival].* Neurochirurgie, 1992. **38**(2): p. 80-8.
73. Molenaar, W.M., et al., *Molecular markers of primitive neuroectodermal tumors and other pediatric central nervous system tumors. Monoclonal antibodies to neuronal and glial antigens distinguish subsets of primitive neuroectodermal tumors.* Lab Invest, 1989. **61**(6): p. 635-43.

74. Katsetos, C.D., et al., *Cerebellar desmoplastic medulloblastomas. A further immunohistochemical characterization of the reticulin-free pale islands*. Arch Pathol Lab Med, 1989. **113**(9): p. 1019-29.
75. Maria, B.L., D. Wong, and V.I. Kalnins, *Dibutyryl cyclic AMP induces vimentin and GFAP expression in cultured medulloblastoma cells*. Can J Neurol Sci, 1990. **17**(1): p. 15-20.
76. Tohyama, T., et al., *[Glial fibrillary acidic protein and neurofilament protein in medulloblastoma]*. No Shinkei Geka, 1988. **16**(11): p. 1243-50.
77. Kumanishi, T., et al., *Glial fibrillary acidic protein in medulloblastomas*. Acta Neuropathol (Berl), 1985. **67**(1-2): p. 1-5.
78. Katsetos, C.D., H.M. Liu, and S.I. Zacks, *Immunohistochemical and ultrastructural observations on Homer Wright (neuroblastic) rosettes and the "pale islands" of human cerebellar medulloblastomas*. Hum Pathol, 1988. **19**(10): p. 1219-27.
79. Giangaspero, F., et al., *"Desmoplastic" versus "classic" medulloblastoma: comparison of DNA content, histopathology and differentiation*. Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol, 1991. **418**(3): p. 207-14.
80. Son, E.I., et al., *Immunohistochemical analysis for histopathological subtypes in pediatric medulloblastomas*. Pathol Int, 2003. **53**(2): p. 67-73.
81. Eberhart, C.G., et al., *Increased p53 immunopositivity in anaplastic medulloblastoma and supratentorial PNET is not caused by JC virus*. BMC Cancer, 2005. **5**: p. 19.
82. Giangaspero, F., et al., *Stratification of medulloblastoma on the basis of histopathological grading*. Acta Neuropathol (Berl), 2006. **112**(1): p. 5-12.
83. Eberhart, C.G., et al., *Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia*. J Neuropathol Exp Neurol, 2004. **63**(5): p. 441-9.
84. Schofield, D., et al., *Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas*. Am J Pathol, 1995. **146**(2): p. 472-80.

85. Tohyama, T., et al., *Nestin expression in embryonic human neuroepithelium and in human neuroepithelial tumor cells*. Lab Invest, 1992. **66**(3): p. 303-13.
86. Sime, P.J., et al., *Differentiation in medulloblastomas and other primitive neuroectodermal tumours*. Br J Neurosurg, 1989. **3**(1): p. 89-100.
87. Coffin, C.M., et al., *A clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 53 cases of medulloblastoma with emphasis on synaptophysin expression*. Mod Pathol, 1990. **3**(2): p. 164-70.
88. Valtz, N.L., et al., *An embryonic origin for medulloblastoma*. New Biol, 1991. **3**(4): p. 364-71.
89. Pasquier, B., et al., *[Glial fibrillary acidic protein and central nervous system tumors. Immunohistochemical study of a series of 207 cases. 2: Medulloblastomas. Hemangioblastomas. Other tumors. Discussion]*. Ann Pathol, 1983. **3**(3): p. 203-11.
90. Burger, P.C., et al., *Differentiation in the medulloblastoma. A histological and immunohistochemical study*. Acta Neuropathol (Berl), 1987. **73**(2): p. 115-23.
91. Fung, K.M. and J.Q. Trojanowski, *Animal models of medulloblastomas and related primitive neuroectodermal tumors. A review*. J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(3): p. 285-96.
92. Maraziotis, T., et al., *Neuron-associated class III beta-tubulin isotype, retinal S-antigen, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human medulloblastomas: a clinicopathological analysis of 36 cases*. Acta Neuropathol (Berl), 1992. **84**(4): p. 355-63.
93. Aguilar, D., et al., *Differentiation in medulloblastomas: immunohistochemical study of twenty-one cases*. Appl Pathol, 1989. **7**(5): p. 277-84.
94. Adesina, A.M., et al., *Expression of p27kip1 and p53 in medulloblastoma: relationship with cell proliferation and survival*. Pathol Res Pract, 2000. **196**(4): p. 243-50.
95. Min, H.S., et al., *Medulloblastoma: histopathologic and molecular markers of anaplasia and biologic behavior*. Acta Neuropathol (Berl), 2006. **112**(1): p. 13-20.
96. Woodburn, R.T., et al., *Intense p53 staining is a valuable prognostic indicator for poor prognosis in*

- medulloblastoma/central nervous system primitive neuroectodermal tumors*. J Neurooncol, 2001. **52**(1): p. 57-62.
97. Schiffer, D., et al., *Bcl-2 distribution in neuroepithelial tumors: an immunohistochemical study*. J Neurooncol, 1996. **27**(2): p. 101-9.
98. Schiffer, D., et al., *Tumor cell proliferation and apoptosis in medulloblastoma*. Acta Neuropathol (Berl), 1994. **87**(4): p. 362-70.
99. Weeks, D.A., et al., *Ultrastructural spectrum of medulloblastoma with immunocytochemical correlations*. Ultrastruct Pathol, 2003. **27**(2): p. 101-7.
100. Papierz, W., et al., *Primitive neuroectodermal tumors: ultrastructural and immunohistochemical studies*. Ultrastruct Pathol, 1995. **19**(3): p. 147-66.
101. Alwasiak, J., et al., *Ultrastructure of the primitive neuroectodermal tumors (PNET)*. Pol J Pathol, 1994. **45**(2): p. 129-38.
102. Xie, J., et al., *[The clinical features and treatment of intracranial tumors in infants]*. Zhonghua Yi Xue Za Zhi, 2004. **84**(15): p. 1270-5.
103. Amini, A., J.K. Liu, and J.R. Kestle, *Disseminated medulloblastoma*. J Neurooncol, 2006. **80**(2): p. 157-8.
104. Campbell, A.N., et al., *Extracranial metastases in childhood primary intracranial tumors. A report of 21 cases and review of the literature*. Cancer, 1984. **53**(4): p. 974-81.
105. Barai, S., et al., *Cerebellar medulloblastoma presenting with skeletal metastasis*. J Postgrad Med, 2004. **50**(2): p. 110-2.
106. Anard, H., et al., *[Peritoneal metastasis of a cerebral medulloblastoma related to a ventriculoperitoneal shunt]*. Rev Med Interne, 2005. **26**(11): p. 910-1.
107. Carrasco Torrents, R., et al., *[Intraabdominal metastasis of cerebellar medulloblastoma through ventriculoperitoneal shunt]*. An Esp Pediatr, 2001. **54**(1): p. 83-5.
108. Loiacono, F., et al., *Abdominal metastases of medulloblastoma related to a ventriculoperitoneal shunt*. AJR Am J Roentgenol, 2006. **186**(6): p. 1548-50.
109. Tortori-Donati, P., et al., *Medulloblastoma in children: CT and MRI findings*. Neuroradiology, 1996. **38**(4): p. 352-9.

110. Chang, T., M.M. Teng, and J.F. Lirng, *Posterior cranial fossa tumours in childhood*. *Neuroradiology*, 1993. **35**(4): p. 274-8.
111. Colosimo, C., et al., [*Magnetic resonance and computerized tomography of posterior cranial fossa tumors in childhood. Differential diagnosis and assessment of lesion extent*]. *Radiol Med (Torino)*, 1995. **90**(4): p. 386-95.
112. Rodallec, M., et al., *Diffusion-weighted MR imaging and pathologic findings in adult cerebellar medulloblastoma*. *J Neuroradiol*, 2004. **31**(3): p. 234-7.
113. Warmuth-Metz, M. and J. Kuhl, [*Neuroradiological differential diagnosis in medulloblastomas and ependymomas: results of the HIT'91-study*]. *Klin Padiatr*, 2002. **214**(4): p. 162-6.
114. Albright, A.L., et al., *Effects of medulloblastoma resections on outcome in children: a report from the Children's Cancer Group*. *Neurosurgery*, 1996. **38**(2): p. 265-71.
115. Caputy, A.J., et al., *A review of the factors influencing the prognosis of medulloblastoma. The importance of cell differentiation*. *J Neurosurg*, 1987. **66**(1): p. 80-7.
116. Cervoni, L. and G. Cantore, *Medulloblastoma in pediatric age: a single-institution review of prognostic factors*. *Childs Nerv Syst*, 1995. **11**(2): p. 80-4; discussion 85.
117. Visee, S., et al., *Supratentorial primitive neuroectodermal tumours of the brain: multidirectional differentiation does not influence prognosis. A clinicopathological report of 18 patients*. *Histopathology*, 2005. **46**(4): p. 403-12.
118. Kopelson, G., R.M. Linggood, and G.M. Kleinman, *Medulloblastoma. The identification of prognostic subgroups and implications for multimodality management*. *Cancer*, 1983. **51**(2): p. 312-9.
119. Sure, U., et al., *Staging, scoring and grading of medulloblastoma. A postoperative prognosis predicting system based on the cases of a single institute*. *Acta Neurochir (Wien)*, 1995. **132**(1-3): p. 59-65.
120. Packer, R.J., et al., *Prognostic importance of cellular differentiation in medulloblastoma of childhood*. *J Neurosurg*, 1984. **61**(2): p. 296-301.

121. Goldberg-Stern, H., et al., *The prognostic significance of glial fibrillary acidic protein staining in medulloblastoma*. *Cancer*, 1991. **68**(3): p. 568-73.
122. San-Galli, F., J.P. Maire, and J. Guerin, [*Medulloblastoma: towards new prognostic factors*]. *Neurochirurgie*, 1991. **37**(1): p. 3-11.
123. Schofield, D.E., *Diagnostic histopathology, cytogenetics, and molecular markers of pediatric brain tumors*. *Neurosurg Clin N Am*, 1992. **3**(4): p. 723-38.
124. Cogen, P.H., *Prognostic significance of molecular genetic markers in childhood brain tumors*. *Pediatr Neurosurg*, 1991. **17**(5): p. 245-50.
125. Biegel, J.A., et al., *Prognostic significance of chromosome 17p deletions in childhood primitive neuroectodermal tumors (medulloblastomas) of the central nervous system*. *Clin Cancer Res*, 1997. **3**(3): p. 473-8.
126. Emadian, S.M., et al., *Correlation of chromosome 17p loss with clinical outcome in medulloblastoma*. *Clin Cancer Res*, 1996. **2**(9): p. 1559-64.
127. Aldosari, N., et al., *MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group*. *Arch Pathol Lab Med*, 2002. **126**(5): p. 540-4.
128. Herms, J., et al., *C-MYC expression in medulloblastoma and its prognostic value*. *Int J Cancer*, 2000. **89**(5): p. 395-402.
129. Gottardo, N.G. and A. Gajjar, *Current Therapy for Medulloblastoma*. *Curr Treat Options Neurol*, 2006. **8**(4): p. 319-334.
130. Gershon, T.R. and O.J. Becher, *Medulloblastoma: therapy and biologic considerations*. *Curr Neurol Neurosci Rep*, 2006. **6**(3): p. 200-6.
131. Freeman, C.R., et al., *Radiotherapy for medulloblastoma in children: a perspective on current international clinical research efforts*. *Med Pediatr Oncol*, 2002. **39**(2): p. 99-108.
132. Back, M., et al., *Importance of radiation time and dose factors on outcome for childhood medulloblastoma*. *Australas Radiol*, 2005. **49**(4): p. 298-303.

133. Carrie, C. and I. Martel-Lafay, [*Innovations in the treatment of medulloblastoma*]. *Cancer Radiother*, 2000. **4 Suppl 1**: p. 150s-153s.
134. Silverman, C.L. and J.R. Simpson, *Cerebellar medulloblastoma: the importance of posterior fossa dose to survival and patterns of failure*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1982. **8**(11): p. 1869-76.
135. Hartsell, W.F., et al., *Patterns of failure in children with medulloblastoma: effects of preirradiation chemotherapy*. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 1997. **39**(1): p. 15-24.
136. Packer, R.J., et al., *Improved survival with the use of adjuvant chemotherapy in the treatment of medulloblastoma*. *J Neurosurg*, 1991. **74**(3): p. 433-40.
137. Bigner, S.H., et al., *Chromosomal characteristics of childhood brain tumors*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1997. **97**(2): p. 125-34.
138. Bigner, S.H., et al., *Structural chromosomal abnormalities in human medulloblastoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1988. **30**(1): p. 91-101.
139. Biegel, J.A., et al., *Isochromosome 17q in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1989. **1**(2): p. 139-47.
140. Sainati, L., et al., *Cytogenetics of pediatric central nervous system tumors*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1996. **91**(1): p. 13-27.
141. Bigner, S.H. and B. Vogelstein, *Cytogenetics and molecular genetics of malignant gliomas and medulloblastoma*. *Brain Pathol*, 1990. **1**(1): p. 12-8.
142. Biegel, J.A., et al., *Evidence for a 17p tumor related locus distinct from p53 in pediatric primitive neuroectodermal tumors*. *Cancer Res*, 1992. **52**(12): p. 3391-5.
143. Reardon, D.A., et al., *Extensive genomic abnormalities in childhood medulloblastoma by comparative genomic hybridization*. *Cancer Res*, 1997. **57**(18): p. 4042-7.
144. Callen, D.F., L. Cirocco, and L. Moore, *A der(11)t(8;11) in two medulloblastomas. A possible nonrandom cytogenetic abnormality*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1989. **38**(2): p. 255-60.
145. Bigner, S.H., et al., *Amplification of the c-myc gene in human medulloblastoma cell lines and xenografts*. *Cancer Res*, 1990. **50**(8): p. 2347-50.

146. Bhattacharjee, M., et al., *Central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors of infancy and childhood*. *Ultrastruct Pathol*, 1997. **21**(4): p. 369-78.
147. Biegel, J.A. and E. Wentz, *No preferential parent of origin for the isochromosome 17q in childhood primitive neuroectodermal tumor (medulloblastoma)*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1997. **18**(2): p. 143-6.
148. Biegel, J.A., et al., *Monosomy 22 in rhabdoid or atypical tumors of the brain*. *J Neurosurg*, 1990. **73**(5): p. 710-4.
149. Batra, S.K., et al., *Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas*. *J Neurooncol*, 1995. **24**(1): p. 39-45.
150. Rood, B.R., et al., *Hypermethylation of HIC-1 and 17p allelic loss in medulloblastoma*. *Cancer Res*, 2002. **62**(13): p. 3794-7.
151. Sommer, A., et al., *Analysis of the Max-binding protein MNT in human medulloblastomas*. *Int J Cancer*, 1999. **82**(6): p. 810-6.
152. Cvekl, A., Jr., et al., *Analysis of transcripts from 17p13.3 in medulloblastoma suggests ROX/MNT as a potential tumour suppressor gene*. *Eur J Cancer*, 2004. **40**(16): p. 2525-32.
153. Hoff, C., et al., *Physical and transcriptional mapping of the 17p13.3 region that is frequently deleted in human cancer*. *Genomics*, 2000. **70**: p. 26-33.
154. Thomas, G.A. and C. Raffel, *Loss of heterozygosity on 6q, 16q, and 17p in human central nervous system primitive neuroectodermal tumors*. *Cancer Res*, 1991. **51**(2): p. 639-43.
155. Saylor, R.L., 3rd, et al., *Infrequent p53 gene mutations in medulloblastomas*. *Cancer Res*, 1991. **51**(17): p. 4721-3.
156. Adesina, A.M., J. Nalbantoglu, and W.K. Cavenee, *p53 gene mutation and mdm2 gene amplification are uncommon in medulloblastoma*. *Cancer Res*, 1994. **54**(21): p. 5649-51.
157. Biegel, J.A., et al., *Isochromosome 17q demonstrated by interphase fluorescence in situ hybridization in primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1995. **14**(2): p. 85-96.
158. Vagner-Capodano, A.M., et al., *Detection of i(17q) chromosome by fluorescent in situ hybridization (FISH) with interphase nuclei in medulloblastoma*. *Cancer Genet Cytogenet*, 1994. **78**(1): p. 1-6.

159. Vagner-Capodano, A.M., et al., *[From cytogenetics to cytogenomics of brain tumors: 1. Medulloblastoma]*. Bull Cancer, 2003. **90**(4): p. 315-8.
160. Michiels, E.M., et al., *Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization*. J Pediatr Hematol Oncol, 2002. **24**(3): p. 205-10.
161. Gilhuis, H.J., et al., *Comparative genomic hybridization of medulloblastomas and clinical relevance: eleven new cases and a review of the literature*. Clin Neurol Neurosurg, 2000. **102**(4): p. 203-209.
162. Nicholson, J., et al., *Imbalances of chromosome 17 in medulloblastomas determined by comparative genomic hybridisation and fluorescence in situ hybridisation*. Mol Pathol, 2000. **53**(6): p. 313-9.
163. Avet-Loiseau, H., et al., *Comparative genomic hybridization detects many recurrent imbalances in central nervous system primitive neuroectodermal tumours in children*. Br J Cancer, 1999. **79**(11-12): p. 1843-7.
164. Fujii, H., et al., *Methylation of the HIC-1 candidate tumor suppressor gene in human breast cancer*. Oncogene, 1998. **16**(16): p. 2159-64.
165. Smith, J.S., et al., *Cloning of a human ortholog (RPH3AL) of (RNO)Rph3al from a candidate 17p13.3 medulloblastoma tumor suppressor locus*. Genomics, 1999. **59**(1): p. 97-101.
166. Balaguer, J., et al., *Tumour banks in pediatric oncology*. Clin Transl Oncol, 2006. **8**(12): p. 884-8.
167. Hurlin, P.J. and J. Huang, *The MAX-interacting transcription factor network*. Semin Cancer Biol, 2006. **16**(4): p. 265-74.
168. Fitzgibbon, J., et al., *Localization of the gene encoding human phosphatidylinositol transfer protein (PITPN) to 17p13.3: a gene showing homology to the Drosophila retinal degeneration B gene (rdgB)*. Cytogenet Cell Genet, 1994. **67**(3): p. 205-7.
169. Tremblay, J.M., et al., *Mechanism of interaction of PITPalpha with membranes: conformational changes in the C-terminus associated with membrane binding*. Arch Biochem Biophys, 2005. **444**(2): p. 112-20.

170. Ile, K.E., G. Schaaf, and V.A. Bankaitis, *Phosphatidylinositol transfer proteins and cellular nanoreactors for lipid signaling*. Nat Chem Biol, 2006. **2**(11): p. 576-83.
171. Chen, C.M. and R.R. Behringer, *OVCA1: tumor suppressor gene*. Curr Opin Genet Dev, 2005. **15**(1): p. 49-54.
172. Jensen, M.R. and K. Helin, *OVCA1: emerging as a bona fide tumor suppressor*. Genes Dev, 2004. **18**(3): p. 245-8.
173. L'Allemain, G., [*Ovca1 gene, deleted in ovarian cancer is a special tumor suppressor*]. Bull Cancer, 2004. **91**(4): p. 301-2.
174. Bucci, C., L. De Gregorio, and C.B. Bruni, *Expression analysis and chromosomal assignment of PRA1 and RILP genes*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **286**(4): p. 815-9.
175. Cantalupo, G., et al., *Rab-interacting lysosomal protein (RILP): the Rab7 effector required for transport to lysosomes*. Embo J, 2001. **20**(4): p. 683-93.
176. Biegel, J.A., *Genetics of pediatric central nervous system tumors*. J Pediatr Hematol Oncol, 1997. **19**(6): p. 492-501.
177. Bayani, J., et al., *Application of a simplified comparative genomic hybridization technique to screen for gene amplification in pediatric solid tumors*. Pediatr Pathol Lab Med, 1995. **15**(6): p. 831-44.
178. Bayani, J., et al., *Molecular cytogenetic analysis of medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors by using conventional banding, comparative genomic hybridization, and spectral karyotyping*. J Neurosurg, 2000. **93**(3): p. 437-48.
179. Aldosari, N., et al., *Comprehensive molecular cytogenetic investigation of chromosomal abnormalities in human medulloblastoma cell lines and xenograft*. Neuro Oncol, 2002. **4**(2): p. 75-85.
180. Jay, V., et al., *Oncogene amplification in medulloblastoma: analysis of a case by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization*. Pathology, 1999. **31**(4): p. 337-44.
181. Nishizaki, T., et al., *Genetic alterations in pediatric medulloblastomas detected by comparative genomic hybridization*. Pediatr Neurosurg, 1999. **31**(1): p. 27-32.

182. Inoue, T., et al., *Spinal intramedullary metastasis of medulloblastoma at initial diagnosis*. Childs Nerv Syst, 2007. **23**(1): p. 113-6.
183. Narendran, A., et al., *Successful treatment of disseminated relapsed medulloblastoma in an infant by primary radiotherapy*. J Pediatr Hematol Oncol, 2001. **23**(1): p. 51-3.
184. Nasr, A. and H. Al-Ghamdy, *The prognostic impact of additional chemotherapy to radiation therapy for postoperative management of pediatric medulloblastoma*. J Egypt Natl Canc Inst, 2004. **16**(4): p. 195-201.
185. Noel, G. and J.J. Mazon, *[Post-operative neoadjuvant chemotherapy before radiotherapy as compared to immediate radiotherapy followed by maintenance chemotherapy in the treatment of medulloblastoma in childhood: results of German prospective randomised trial HIT'91]*. Cancer Radiother, 2001. **5**(2): p. 197-8.
186. Packer, R.J., *Standard-risk medulloblastoma treated by adjuvant chemotherapy followed by reduced-dose craniospinal radiation therapy*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007. **7**(2): p. 129, 132.
187. Packer, R.J., *Risk-adapted craniospinal radiotherapy followed by high-dose chemotherapy and stem-cell rescue in children with newly diagnosed medulloblastoma*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007. **7**(2): p. 130, 132.
188. Packer, R.J., *Craniospinal radiation therapy followed by adjuvant chemotherapy for newly diagnosed average-risk medulloblastoma*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2007. **7**(2): p. 130-2.
189. Packer, R.J., *Preradiation chemotherapy versus radiotherapy alone for nonmetastatic medulloblastoma*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2004. **4**(2): p. 127-8.
190. Packer, R.J., *Is postoperative chemotherapy alone sufficient to treat young children with medulloblastoma?* Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(8): p. 386-7.
191. Perez-Martinez, A., et al., *High-dose chemotherapy with autologous stem cell rescue for children with high risk and recurrent medulloblastoma and supratentorial primitive neuroectodermal tumors*. J Neurooncol, 2005. **71**(1): p. 33-8.

192. Hongeng, S., et al., *Treatment of leptomeningeal relapse of medulloblastoma with temozolomide*. J Pediatr Hematol Oncol, 2002. **24**(7): p. 591-3.
193. Mulhern, R.K., et al., *Neurocognitive consequences of risk-adapted therapy for childhood medulloblastoma*. J Clin Oncol, 2005. **23**(24): p. 5511-9.
194. Mulhern, R.K., et al., *Risks of young age for selected neurocognitive deficits in medulloblastoma are associated with white matter loss*. J Clin Oncol, 2001. **19**(2): p. 472-9.
195. Nagel, B.J., et al., *Abnormal hippocampal development in children with medulloblastoma treated with risk-adapted irradiation*. AJNR Am J Neuroradiol, 2004. **25**(9): p. 1575-82.
196. Luttjeboer, M. and G.J. Kaspers, *Medulloblastoma: need for targeted treatment*. Expert Rev Anticancer Ther, 2006. **6**(5): p. 649-52.
197. Jozwiak, J., W. Grajkowska, and P. Wlodarski, *Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook*. Med Res Rev, 2007. **27**(6): p. 869-90.
198. Rasheed, B.K. and S.H. Bigner, *Genetic alterations in glioma and medulloblastoma*. Cancer Metastasis Rev, 1991. **10**(4): p. 289-99.
199. Raffel, C., F.E. Gilles, and K.I. Weinberg, *Reduction to homozygosity and gene amplification in central nervous system primitive neuroectodermal tumors of childhood*. Cancer Res, 1990. **50**(3): p. 587-91.
200. Dallas, P.B., P.A. Terry, and U.R. Kees, *Genomic deletions in cell lines derived from primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system*. Cancer Genet Cytogenet, 2005. **159**(2): p. 105-13.
201. Nishio, S., et al., *[Medulloblastoma with neuronal differentiation: a report of five cases]*. No To Shinkei, 2000. **52**(5): p. 391-7.
202. Tajima, Y., et al., *Neurotrophins and neuronal versus glial differentiation in medulloblastomas and other pediatric brain tumors*. Acta Neuropathol (Berl), 1998. **95**(4): p. 325-32.
203. Krynska, B., et al., *Detection of human neurotropic JC virus DNA sequence and expression of the viral oncogenic protein in pediatric medulloblastomas*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(20): p. 11519-24.

204. Khalili, K., et al., *T-antigen of human polyomavirus JC cooperates with IGF-IR signaling system in cerebellar tumors of the childhood-medulloblastomas*. *Anticancer Res*, 2003. **23**(3A): p. 2035-41.
205. Khalili, K., et al., *Medulloblastomas and the human neurotropic polyomavirus JC virus*. *Lancet*, 1999. **353**(9159): p. 1152-3.
206. Huang, H., et al., *Identification in human brain tumors of DNA sequences specific for SV40 large T antigen*. *Brain Pathol*, 1999. **9**(1): p. 33-42.
207. Hung, K.L., *Familial medulloblastoma in non-twin siblings*. *Surg Neurol*, 1991. **35**(6): p. 483-4.
208. Farwell, J. and J.T. Flannery, *Second primaries in children with central nervous system tumors*. *J Neurooncol*, 1984. **2**(4): p. 371-5.
209. Olson, J.M., N.E. Breslow, and J. Barce, *Cancer in twins of Wilms tumor patients*. *Am J Med Genet*, 1993. **47**(1): p. 91-4.
210. Bonnin, J.M., et al., *The association of embryonal tumors originating in the kidney and in the brain. A report of seven cases*. *Cancer*, 1984. **54**(10): p. 2137-46.
211. Dahmen, R.P., et al., *Deletions of AXIN1, a component of the WNT/wingless pathway, in sporadic medulloblastomas*. *Cancer Res*, 2001. **61**(19): p. 7039-43.
212. Amlashi, S.F., et al., *Nevoid basal cell carcinoma syndrome: relation with desmoplastic medulloblastoma in infancy. A population-based study and review of the literature*. *Cancer*, 2003. **98**(3): p. 618-24.
213. Lacombe, D., et al., *Medulloblastoma in the nevoid basal-cell carcinoma syndrome: case reports and review of the literature*. *Genet Couns*, 1990. **1**(3-4): p. 273-7.
214. Vortmeyer, A.O., et al., *Deletion analysis of the adenomatous polyposis coli and PTCH gene loci in patients with sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated medulloblastoma*. *Cancer*, 1999. **85**(12): p. 2662-7.
215. Mori, T., et al., *Germ-line and somatic mutations of the APC gene in patients with Turcot syndrome and analysis of APC mutations in brain tumors*. *Genes Chromosomes Cancer*, 1994. **9**(3): p. 168-72.

216. Yong, W.H., et al., *The APC gene in Turcot's syndrome*. N Engl J Med, 1995. **333**(8): p. 524.
217. Huang, H., et al., *APC mutations in sporadic medulloblastomas*. Am J Pathol, 2000. **156**(2): p. 433-7.
218. McNeil, D.E., et al., *Incidence and trends in pediatric malignancies medulloblastoma/primitive neuroectodermal tumor: a SEER update*. Surveillance Epidemiology and End Results. Med Pediatr Oncol, 2002. **39**(3): p. 190-4.
219. Urberuaga, A., et al., *A review of clinical and histological features of Spanish paediatric medulloblastomas during the last 21 years*. Childs Nerv Syst, 2006. **22**(5): p. 466-74.
220. Alston, R.D., et al., *Childhood medulloblastoma in northwest England 1954 to 1997: incidence and survival*. Dev Med Child Neurol, 2003. **45**(5): p. 308-14.
221. Suh, Y.L., et al., *Tumors of the central nervous system in Korea: a multicenter study of 3221 cases*. J Neurooncol, 2002. **56**(3): p. 251-9.
222. Pizem, J., et al., *Prognostic significance of apoptosis in medulloblastoma*. Neurosci Lett, 2005. **381**(1-2): p. 69-73.
223. Korshunov, A., M. Savostikova, and S. Ozerov, *Immunohistochemical markers for prognosis of average-risk pediatric medulloblastomas. The effect of apoptotic index, TrkC, and c-myc expression*. J Neurooncol, 2002. **58**(3): p. 271-9.
224. Sarkar, C., et al., *Are childhood and adult medulloblastomas different? A comparative study of clinicopathological features, proliferation index and apoptotic index*. J Neurooncol, 2002. **59**(1): p. 49-61.
225. Katsetos, C.D., et al., *A cytomorphological scheme of differentiating neuronal phenotypes in cerebellar medulloblastomas based on immunolocalization of class III beta-tubulin isotype (beta III) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin*. Clin Neuropathol, 1995. **14**(2): p. 72-81.
226. Maria, B.L., et al., *The modulation of astrocytic differentiation in cells derived from a medulloblastoma surgical specimen*. J Neurooncol, 1989. **7**(4): p. 329-38.

227. Cruz-Sanchez, F.F., et al., *Medulloblastoma. An immunohistological study of 50 cases*. Acta Neuropathol (Berl), 1989. **79**(2): p. 205-10.
228. Mannoji, H., et al., *Glial fibrillary acidic protein in medulloblastoma*. Acta Neuropathol, 1981. **55**(1): p. 63-9.
229. Jaros, E., et al., *p53 protein overexpression identifies a group of central primitive neuroectodermal tumours with poor prognosis*. Br J Cancer, 1993. **68**(4): p. 801-7.
230. Ferrari, A.F., et al., *Medulloblastoma: evaluation of proliferative index by monoclonal antibody Mib-1, its prognostic correlation and therapeutic implications*. Arq Neuropsiquiatr, 2003. **61**(3A): p. 547-51.
231. Giordana, M.T., et al., *Prognostic factors in adult medulloblastoma. A clinico-pathologic study*. Tumori, 1995. **81**(5): p. 338-46.
232. Onda, K., R.L. Davis, and M.S. Edwards, *Comparison of bromodeoxyuridine uptake and MIB 1 immunoreactivity in medulloblastomas determined with single and double immunohistochemical staining methods*. J Neurooncol, 1996. **29**(2): p. 129-36.
233. Jung, H.L., et al., *Loss of heterozygosity analysis of chromosome 17p13.1-13.3 and its correlation with clinical outcome in medulloblastomas*. J Neurooncol, 2004. **67**(1-2): p. 41-6.
234. Redon, R., et al., *Global variation in copy number in the human genome*. Nature, 2006. **444**(7118): p. 444-54.
235. Wong, H.Y., et al., *Sequence polymorphism of the mitochondrial DNA hypervariable regions I and II in 205 Singapore Malays*. Leg Med (Tokyo), 2007. **9**(1): p. 33-7.
236. Argenti, B., et al., *Hedgehog antagonist REN(KCTD11) regulates proliferation and apoptosis of developing granule cell progenitors*. J Neurosci, 2005. **25**(36): p. 8338-46.
237. De Smaele, E., et al., *Chromosome 17p deletion in human medulloblastoma: a missing checkpoint in the Hedgehog pathway*. Cell Cycle, 2004. **3**(10): p. 1263-6.
238. Ferretti, E., et al., *Hedgehog checkpoints in medulloblastoma: the chromosome 17p deletion paradigm*. Trends Mol Med, 2005. **11**(12): p. 537-45.

