



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EFLUJO EN LA EFICACIA DE DROGAS CITOTÓXICAS EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA.

**TESIS PROFESIONAL POR ETAPAS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I Ó L O G O
P R E S E N T A:
CIELO IZKAYRA ARCOS ROBLES**

**CODIRECTORES DE TESIS:
DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ
M. EN C. DIANA TOLEDO HERNÁNDEZ**

CUERNAVACA, MORELOS

AGOSTO, 2023

EL PRESENTE PROYECTO FUE REALIZADO EN:

LABORATORIO DE BIOLOGÍA DE CÉLULAS TRONCALES
FACULTAD DE MEDICINA, UAEM

UNIDAD DE DIAGNÓSTICO Y MEDICINA MOLECULAR
HOSPITAL DEL NIÑO Y ADOLESCENTE MORELENSE (HNAM)



AGRADECIMIENTOS

A la primera persona que quiero agradecer de manera muy sincera es a quien fue mi director de tesis, el Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia (Q.E.P.D), por sus conocimientos, sus enseñanzas, su comprensión, su apoyo y su infinita paciencia que deposito en mi para realizar este proyecto de investigación, gracias por enseñarme su gran amor a la ciencia y su motivación al hacer las cosas incluso en situaciones inesperadas. De igual manera al Dr. Juan José Acevedo Fernández y la M. en C. Diana Toledo Hernández por apoyarme a continuar este proyecto, con sus orientaciones, su motivación y sus conocimientos ya que fueron fundamentales para no desistir de este proyecto, agradeciendo por todo lo recibido durante esta etapa teniendo mi admiración y lealtad.

Agradezco a mis sinodales, M. en C. Carolina Abarca, Dra. María Del Carmen Beltrán, Dra. María Luisa Garduño y Dra. María del Carmen Gutiérrez, por sus enseñanzas, sus atenciones y su comprensión para el desarrollo de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, principalmente a Sandra Mendiola, Sebastián Vargas y Zugey Cárdenas quienes me brindaron su apoyo e hicieron más relajada mi estancia, del mismo modo a Luis Ríos y Andrea Téllez con quienes estoy profundamente agradecida por los conocimientos que me compartieron y su sincera amistad. También quiero agradecer a la Sra. Susana Picazo, quien nos brindó su apoyo para que nuestros proyectos continuaran y quien fue parte fundamental del laboratorio.

A mis amigos biólogos, Bryan Peralta, Lisset García, Abril Velázquez, gracias por su compañía, su apoyo en las horas de estudio y los momentos difíciles, de la misma manera a Javier Castañeda por brindarme su sincero cariño y alegría, no hay palabras suficientes para agradecer lo afortunada por haberte conocido.

Finalmente, el agradecimiento principal se lo otorgo a mi familia, a mi mamá Melina Robles, quien, con su amor, su fortaleza y su valentía me motiva a nunca rendirme y seguir adelante, siempre serás mi motor. A mi papá Luis Arcos por sus consejos y motivación a seguir intentando y lograr mis metas. Al Dr. Jerónimo Rivas Iribarren por apoyarme en muchos aspectos para hacer posible este gran momento y enseñarme que las personas llegan a tu vida por sorpresa y justo a tiempo. A mis hermanos Arzú y Valentina Arcos quien son mi mayor motivación para ser mejor persona para que ustedes puedan lograr todo lo que se propongan. Y a mi abuelita Guadalupe Salazar (Q.E.P.D) por todo su cariño, quien fue para mí una segunda madre y a pesar de no poder verlo que logre terminar mi proyecto siempre me motivo a seguir.

*A los que siempre me apoyaron, en especial a mi familia
los llevo en mi mente y corazón mil gracias...*

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
INDICE DE FIGURAS.....	III
INDICE DE TABLAS	V
I INTRODUCCIÓN.....	1
I.1 TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.....	1
I.2 DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO Y DEL CEREBELO	4
I.2.1 CÉLULAS TRONCALES NEURALES EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO....	7
I.2.2 MARCADORES NEURALES.....	9
I.3 MEDULOBLASTOMA: CARACTERÍSTICAS GENERALES.....	11
I.4 CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL MEDULOBLASTOMA.....	12
I.4.1 CLASIFICACION MOLECULAR DEL MEDULOBLASTOMA	13
I.5 TRATAMIENTO DE LOS MEDULOBLASTOMAS	15
I.6 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	16
I.7 BOMBAS DE EFLUJO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RESISTENCIA A TRATAMIENTOS ANTITUMORALES.....	19
I.7.1 BOMBAS DE EFLUJO EN LA EFICACIA DE DROGAS CITOTÓXICAS	20
I.7.2 EXPRESIÓN DE BOMBAS DE EFLUJO EN TUMORES CEREBRALES, SU RELEVANCIA EN MEDULOBLASTOMA	23
II. ANTECEDENTES.....	25
II.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEINA ASOCIADA A LA RESISTENCIA A MULTIPLES FÁRMACOS	25
III. JUSTIFICACIÓN	27
IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	28
V. HIPÓTESIS	28
VI. OBJETIVO GENERAL	28
VI.1 OBJETIVOS PARTICULARES	28
VII. MATERIALES Y MÉTODOS	29
VII.1. CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA DAOY	29
VII.2. LISIS CELULAR DE LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA DAOY POR EL MÉTODO DE TRIZOL	30
VII.3. EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA	31
VII.4. AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON REVERSO TRANSCRIPCIÓN (RT-PCR)	32

VII.5. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD	32
VIII. RESULTADOS	32
VIII.1. PROMEDIO DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA	32
VIII.1.1. RENDIMIENTO CELULAR	33
VIII.1.2. VIABILIDAD	34
VIII.1.3. NÚMERO DE DIVISIONES Y HORAS POR DIVISIÓN	35
VIII.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA TOTAL EN MUESTRAS DE LA LINEA TUMORAL DAOY	36
VIII.2.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL cDNA DE LAS MUESTRAS DE LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA	38
VIII.2.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCC2 Y ABCG2 EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA	39
VIII.2.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCC2 Y ABCG2 EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA	41
VIII.3. ESTANDARIZACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR PARA ESTUDIO CITOTÓXICO EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA	43
VIII.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE VIABILIDAD Y MUERTE CELULAR PARA ESTUDIO CITOTÓXICO EN LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA, DAOY	46
VIII.4. EVALUACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA	48
IX. DISCUSIÓN	53
IX.1. EVALUACIÓN DE LA SINTESIS DE ARN	54
IX.2. EVALUACIÓN DE LA SINTESIS DE cDNA	54
IX.3. PRESENCIA DE LAS BOMBAS DE EFLUJO ABCC2 Y ABCG2, EN LA LINEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA, DAOY	54
IX.4. EVALUACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS	56
X. CONCLUSIÓN	58
XI. PERSPECTIVAS	59
XII. BIBLIOGRAFÍA	60

ABREVIATURAS

ABC Dominio de unión al ATP (*del inglés ATP binding- cassette*)

ANSC Células troncales neurales del cerebro adulto (*del inglés Adult Neural Stem Cells*)

ATCC American Type Culture Collection

ATP Trifosfato de adenosina (*del inglés adenosine triphosphate*)

BHE Barrera hematoencefálica

BRCP Proteína de resistencia al cáncer de mama (*del inglés Breast cancer resistance protein*)

CCN Células de la cresta neural

CCNU Cloro metilciclohexilnitrosourea

CE Células endoteliales

CSC Células troncales cancerosas (*del inglés Cancer Stem Cell*)

CTN Células troncales neurales

ECM Matriz extracelular (*del inglés extra cellular matrix*)

EGL Capa granular externa (*del inglés external granular layer*)

ESC Células troncales embrionarias (*del inglés Embryonic Stem Cells*)

FGF Factor de crecimiento de fibroblastos (*del inglés Fibroblast Growth Factor*)

FT Factores de transcripción

GBM Glioblastoma multiforme

GCP Precusores de células granulares (*del inglés granule cell precursors*)

GFI1 Factor de crecimiento independiente 1

GSH Glutación reducido

IGL Capa granular interna (*del inglés inner granular layer*)

INEGI Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática

MB Meduloblastoma

MB LC / A Meduloblastoma de células grandes / anaplásico (*del inglés medulloblastoma large cells / anaplastic*)

MBDN Meduloblastoma desmoplásico / nodular (*del inglés medulloblastoma desmoplastic / nodular*)

MBEN Meduloblastoma con extensa nodularidad (*del inglés medulloblastoma with extensive nodularity*)

MDR Resistencia adquirida a múltiples fármacos antineoplásicos (*del inglés multi drug resistance*)

MRP Proteína asociada a la resistencia a múltiples drogas (*del inglés multi drug resistance- associated protein*)

PAT Progenitor de amplificación transitoria

Pgp Glucoproteína-P (*del inglés P-glycoprotein*)

PNEs Precusores neuroepiteliales

PTCH1 Patched1

PXE Pseudoxantoma Elástico

RG Glía radial (*del inglés radial glia*)

SC Células estromales

SNC Sistema Nervioso Central

SNP Sistema Nervioso Periférico

SVZ Zona subventricular

TJ Uniones estrechas intercelulares

TPSNC Tumores primarios del sistema nervioso central

UBC Células de cepillo unipolar (*del inglés unipolar brush cell*)

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Principales tumores malignos.....	2
Figura 2. Vesículas secundarias y estructuras derivadas	5
Figura 3. Corteza cerebelosa organizada por sus tres capas y sus cinco tipos de neuronas	6
Figura 4. Células troncales neurales identificadas en el desarrollo embrionario y en cerebro adulto	9
Figura 5. Linaje neural y células que integran al linaje neural se generan a partir de los cinco tipos de CTN	11
Figura 6. Clasificación molecular de los meduloblastomas.....	15
Figura 7. Ciclo celular y su relación con la acción de algunos medicamentos antitumorales	18
Figura 8. Representación de la glucoproteína P	23
Figura 9. Estrategia metodológica	29
Figura 10. Cinética de crecimiento del cultivo celular de la línea tumoral de Daoy de meduloblastoma, fotos 10x.....	33
Figura 11. Rendimiento celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.....	34
Figura 12. Viabilidad celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.	35
Figura 13. Horas por división celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.	36
Figura 14. Electroforesis de evaluación de RNA por PCR con GAPDH para evaluar las muestras de RNA	37
Figura 15. Electroforesis de integridad de RNA.....	38
Figura 16. Evaluación de la calidad del cDNA de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.	39
Figura 17. Curva de concentración para la estandarización de la amplificación del transportador ABCC2	40
Figura 18. Curva de concentración para la estandarización de la amplificación del transportador ABCG2.	40
Figura 19. Electroforesis de la amplificación del transportador ABCC2 por RT-PCR.....	42
Figura 20. Electroforesis de la amplificación del transportador ABCG2 por RT-PCR.....	43
Figura 21. Diseño experimental de los estudios de toxicidad	44
Figura 22. Registro fotográfico del cultivo de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma en placas de 96 pozos, fotos 10x.....	45
Figura 23. Registro fotográfico del cultivo de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma en placas de 96 pozos, fotos 20x.....	45
Figura 24. Diseño experimental para la estandarización de viabilidad y muerte celular	46
Figura 25. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.....	47

Figura 26. Muerte celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.....	48
Figura 27. Diseño experimental para la evaluación de los fármacos antineoplásicos en la línea tumoral Daoy de meduloblastoma	49
Figura 28. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma, control.	49
Figura 29. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con el fármaco vincristina	50
Figura 30. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con el fármaco etopósido	50
Figura 31. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con el fármaco ciclofosfamida.....	51
Figura 32. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con todos los fármacos.....	52

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de los tumores del SNC de la OMS.....	3
Tabla 2. Clasificación de fármacos útiles en el tratamiento de enfermedades neoplásicas	17
Tabla 3. Compuestos quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de gliomas y meduloblastomas ..	26
Tabla 4. Características de la línea tumoral de meduloblastoma Daoy.	30
Tabla 5. Oligonucleótidos. Secuencias de los transportadores ABC2 y ABCG2.	31
Tabla 6. Cuantificaciones de RNA sin diluir, de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma.....	37
Tabla 7. Oligonucleótidos. Secuencias de los transportadores ABC2 y ABCG2.	41
Tabla 8. Resumen de medidas a tomar para sembrado de células en placa de 96 pozos.	43

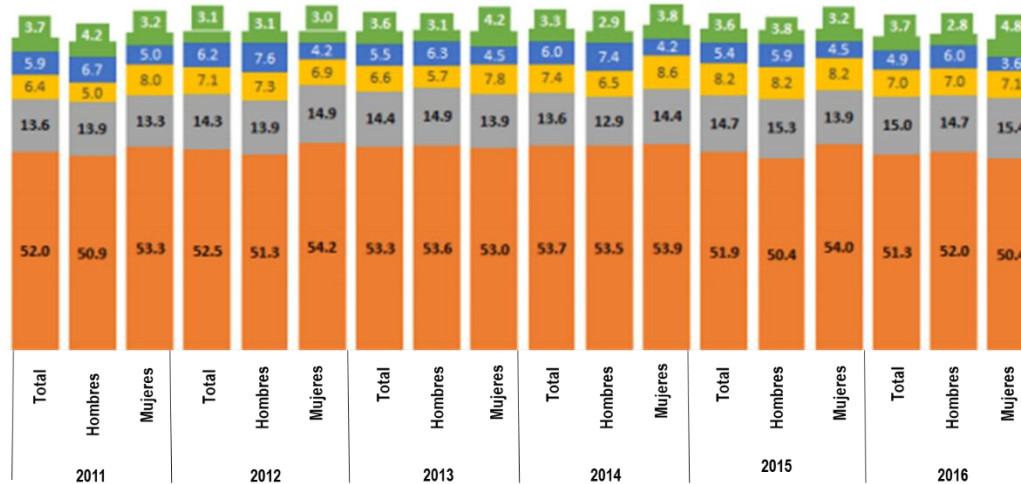
I INTRODUCCIÓN

I.1 TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) poseen una tasa de incidencia de 2 a 9 casos por cada 100,000 habitantes/año (Mejica et al., 2005). La importancia de los tumores del sistema nervioso central (SNC) radica en que ocupan el tercer lugar más frecuente de las neoplasias que afectan a los niños menores de 15 años en México, después de la leucemia y los linfomas (Rivera-Luna *et al.*, 2007). A nivel mundial, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, responsable de alrededor de 8.2 millones de muertes en el año 2012 (Sinning, 2017). Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que para el 2030 debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, los casos nuevos sobrepasarán los 20 millones anuales.

Por su parte el Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática (INEGI) presentó un panorama de la mortalidad en México de los principales tumores malignos durante el periodo de 2011 a 2016, donde aproximadamente el 50% de las muertes fueron por tumores malignos en una población de 0 a 17 años, observándose diferencias entre mujeres y hombres, siendo ellas quienes tienen porcentajes ligeramente más altos. El cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central ocupa el segundo lugar entre las cinco principales causas de mortalidad por neoplasias malignas en la población analizada, en el periodo antes mencionado (Figura 1) (INEGI, 2018).

Por otra parte, es necesario destacar que el cáncer en adolescentes es diferente del infantil (menores de 14 años), y estos a su vez a los carcinomas de adultos. En edades muy tempranas surgen como parte de síndromes genéticos, mientras que en los adultos se pueden asociar a factores de riesgo ambientales (Fajardo-Gutiérrez *et al.*, 2003), por lo que es de esperar que los procesos de transformación sean distintos, en consecuencia, cada tipo de cáncer debe de tratarse de manera diferente.



Principales tumores malignos

- Órganos hematopoyéticos (C88-C95)
- Encéfalo y otras partes del sistema nervioso central (C70-C72)
- Huesos y de los cartilagos articulares (C40-C41)
- Tejido linfático (C81-C86)
- Tejidos mesoteliales y de los tejidos blandos (C45-C49)

Figura 1. Principales tumores malignos. Porcentaje de muertes observadas en los cinco principales tumores malignos en la población de 0 a 17 años según el sexo, durante el periodo de 2011 a 2016 (INEGI. Estadísticas de mortalidad. Cubos dinámicos, 2018).

Existe la tendencia en la cual se agrupa a los tumores primitivos del sistema nervioso central (SNC) en el grupo de tumores neuroectodérmicos primitivos, en los que se incluyen a los meduloblastomas, endimoblastoma, los pinealoblastomas y al meduloepitelioma (Mejica *et al.*, 2005). Por lo que, a partir de 1979, la Organización Mundial de la Salud (OMS) establece una clasificación de los tumores primarios del sistema nervioso central (TPSNC), que se basa en la célula de origen del proceso tumoral, así como de sus características morfológicas, lo cual puede ser relacionado con el pronóstico. Tomando en cuenta estas características se estratifican en una escala de malignidad que va de I a IV. En el grado I se caracterizan por ser tumores circunscritos, con lento crecimiento y bajo potencial de conversión a un tumor de mayor malignidad. El grado II son tumores de borde difuso, de lento crecimiento y algunos, con tendencia a progresar a tumores de mayor malignidad. En el grado III son tumores infiltrantes con células atípicas o anaplásicas y de mayor actividad mitótica. En el grado IV son tumores con rápido crecimiento con mitosis activa y son propensos a necrosis al igual de que pueden presentar vasos de neoformación. Tomando esto en cuenta, los tumores son muy heterogéneos, por lo que en la última modificación de clasificación de los tumores que afectan al SNC del 2016 (Tabla 1) se han identificado cuatro grados de pronóstico y una variedad de subtipos histológicos, en los cuales el meduloblastoma se ubica dentro de los tumores embrionarios (recién nacidos a 18 años), con un grado IV de malignidad y con 11.4% de incidencia (Sinning, 2017).

Tabla 1. Clasificación de los tumores del SNC de la OMS (modificada de Testa *et al.*, 2018).

Clasificación histológica de la Organización Mundial de la Salud (OMS) de los tumores del sistema nervioso central.	
Tipo de tumor	Grado de malignidad
Tumores difusos astrocíticos y oligodendrogiales	
Astrocitoma difuso, mutante <i>IDH</i>	II
Astrocitoma anaplásico, mutante <i>IDH</i>	III
Glioblastoma, <i>IDH</i> de tipo silvestre	IV
Glioblastoma, mutante <i>IDH</i>	IV
Glioma difuso de la línea media mutante K27M	IV
Oligodendroglioma	II
Oligodendroglioma anaplásico	III
Oligoastrocitoma	II-III
Otros tumores astrocíticos	
Astrocitoma pilocítico	I
Astrocitoma de células gigantes subependimarias	I
Xantoastrocitomapleomórfico	II
Xantoastrocitomapleomórfico	III
Otros gliomas	
Glioma cordoideo del tercer ventrículo	II
Glioma angiocéntrico	I
Tumores ependimarios	
Ependimoma	II
Ependimoma, <i>RELA</i> fusión positiva	II-III
Subependimoma	I
Ependimomamixopapilar	I
Ependimoma anaplásico	III
Tumores neuronales y mixtos neuronales-gliales	
Gangliocitoma	I
Ganglioglioma	I
Ganglioglioma anaplásico	III
Tumor neuroepitelialdisembrioplástico	I
Tumores embrionarios	
Meduloblastoma (todos los subtipos)	IV
Meduloepitelioma	IV

Tumor embrionario con rosetas multicapa, alterado C19M	IV
Tumor embrionario del SNC	IV
Meningiomas	
Meningioma	I
Meningioma atípico	II
Meningioma aplásico	III
Tumores de nervios craneales y paraespinales.	
Neurofibroma	I
Perineurinoma	I
Schwannoma	I
Tumor maligno de la vaina del nervio periférico	II, II, III

I.2 DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO Y DEL CEREBELO

El sistema nervioso se origina de la capa germinal ectodérmica, la cual da origen primero a las células de la cresta neural (CCN), que contribuyen con la formación del Sistema Nervioso Periférico (SNP) (células de Schwann, algunas neuronas, células gliales y sistema nervioso simpático y parasimpático); segundo, al neuroectodermo, originando el tubo neural productor del SNC (cerebro, médula espinal, algunas neuronas, oligodendrocitos, astrocitos y motoneuronas); tercero, el ectodermo anterior a la placa neural o ectodermo no neural donde se promueven las placodas craneales, las cuales forman los órganos sensoriales especializados y los ganglios de algunos pares craneales, cabe destacar que antes de finalizarse el cierre del tubo neural, esta da cambios internos originando vesículas primarias, estas vesículas se identifican como: el cerebro anterior o prosencéfalo, el cerebro medio o mesencéfalo y el cerebro posterior o romboencéfalo. En el momento del cierre del neuroporo anterior, el procesencéfalo se subdivide en dos vesículas secundarias, una llamada telencéfalo formando los hemisferios cerebrales con ventrículos laterales y una posterior llamada diencéfalo que genera las regiones talámicas e hipotálamicas y el tercer ventrículo, por otro lado el mesencéfalo no se divide pero genera al acueducto cerebral o acueducto de Silvio y finalmente el romboencéfalo se subdivide en metencéfalo situado en el segmento anterior del cerebro posterior, origen del cerebelo y el mielencéfalo, que forma la médula oblonga, ambas vesículas forman el cuarto ventrículo (Rodríguez, 2012).

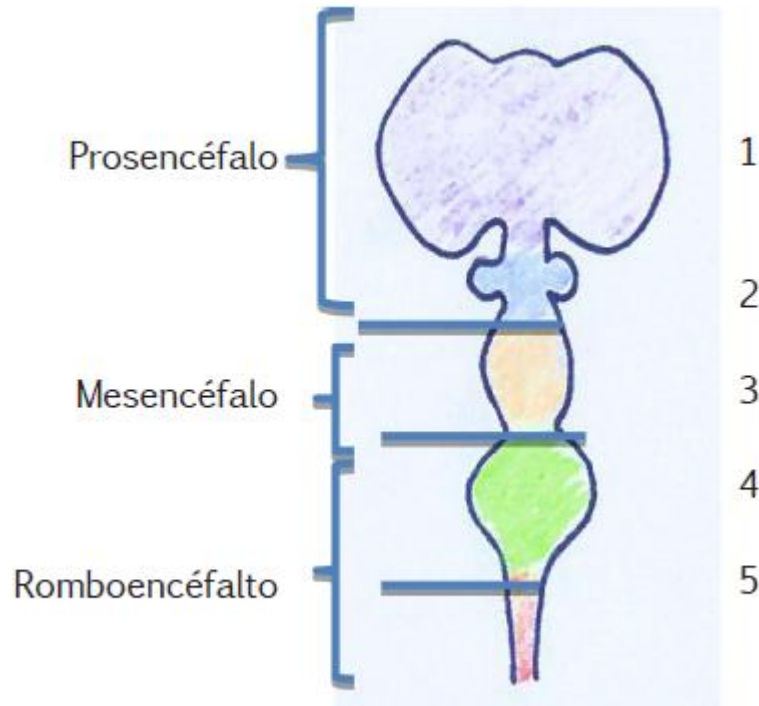


Figura 2. Vesículas secundarias y estructuras derivadas. 1. Telencéfalo: hemisferios cerebrales y ventrículos laterales. 2. Diencéfalo: tálamo, hipotálamo, tercer ventrículo. 3. Mesencéfalo: acueducto de Silvio. 4. Metencéfalo y mielencéfalo: cerebelo, médula oblonga, cuarto ventrículo. 5. Cordón espinal (Rodríguez, 2012).

El cerebelo (del latín, *cerebellum*, "pequeño cerebro"), ocupa no más del 10% del volumen total del encéfalo, pero contiene más de la mitad de todas las neuronas; el papel del cerebelo es muy amplio ya que influye en sistemas motores incluidos aspectos de adaptación y aprendizaje. Cabe destacar que el cerebelo ocupa la mayor parte de la fosa craneal posterior, cuenta con una corteza cerebelosa de estructura sencilla de tres capas que consta de tan solo cinco tipos de neuronas: estrelladas, en cestillo, de Purkinje, de Golgi y las células granulares excitadoras, las cuales se muestran en la figura 3. (Kandel, 2001).

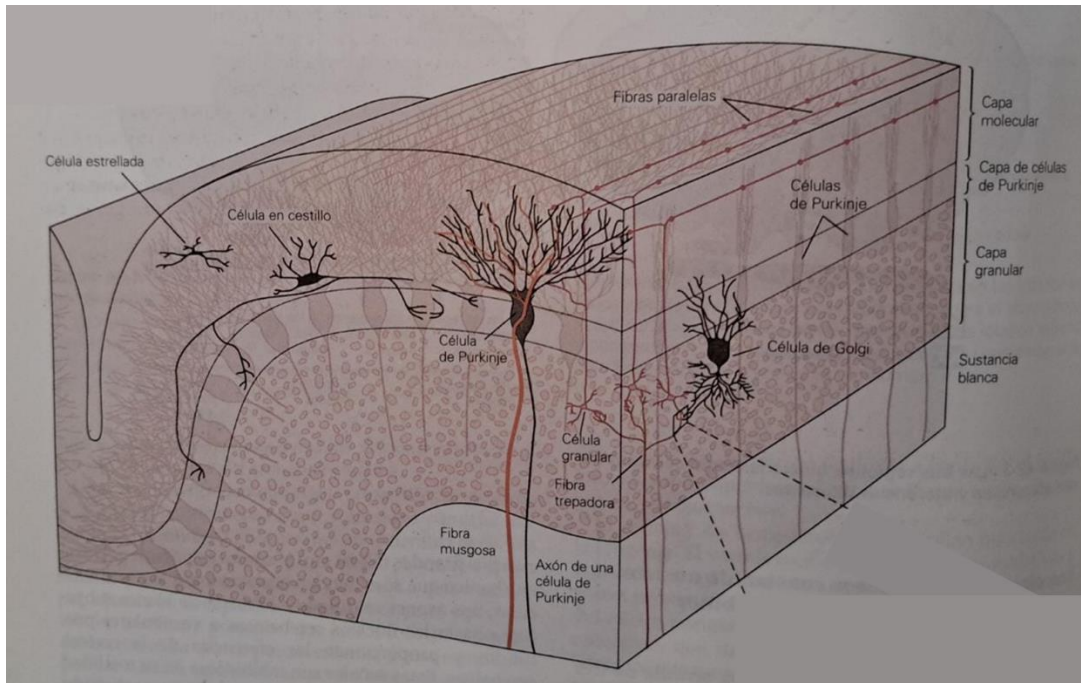


Figura 3. Corteza cerebelosa organizada por sus tres capas y sus cinco tipos de neuronas. Un corte vertical de una sola lamina cerebelosa, muestra el plano longitudinal y el transversal, ilustrando la organización general de la corteza cerebelosa (Kandel, 2001).

La región que origina el cerebelo, su “anlage”, se establece durante la fase inicial del desarrollo embrionario del cerebro posterior (esto en ratón, aproximadamente en el día embrionario E 8.5), cerca del límite del “istmo” entre el mesencéfalo y el metencéfalo, en donde se encuentra una zona organizadora que produce morfógenos que participan en la regulación de los patrones de expresión de diferentes factores transcripcionales que juegan un papel importante en esta primera fase para el desarrollo de la región conocida como “vermis”. El origen de las células glutamatérgicas del cerebelo tiene lugar en la interfaz más dorsal entre el tejido neural y no neural de la “placa del techo”: el labio rómbico (Butts *et al.*, 2014).

Un factor primordial de la conformación del cerebelo es la asignación de territorios en los que se determinan los diferentes tipos de células que lo componen. De esta manera, el “anlage” cerebeloso se asienta entre los dominios Hox y Otx por lo que es producto de los mecanismos de segmentación que establecen subdivisiones romboméricas dentro del cerebro posterior temprano. El factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) se ha descrito como uno de los morfógenos más relevantes por su señalización que regula la asignación territorial y el crecimiento cerebeloso anisotrópico a partir del rombomero 1 (r1) y se cree que todas las células del cerebelo surgen de la región dorsal del r1, una región que se caracteriza por la ausencia de la expresión de los genes Otx y Hox (Butts *et al.*, 2014). Es probable que la diferenciación cerebelosa ocurra debido a la liberación de las acciones represivas de Gbx2 en Otx2 del r1 (Sato *et al.*, 2004).

Las células granulares cerebelosas descritas como el tipo más abundante de neuronas glutamatérgicas, se generan fuera del cerebelo en la capa germinal externa (EGL) y migra hacia la capa granular interna (IGL), con la interacción de Sonic Hedgehog (Shh) que es un factor para la regulación del crecimiento cerebeloso. De manera relevante se han asociado las mutaciones en *ptc* con un crecimiento anormal de células similares a precursores de células granulares (GCP) lo que participaría en la transformación celular y su participación en la tumorigénesis (Wechsler- Reya & Scott, 1999). Es por esto que los precursores de las células granulares son fuente exclusiva del labio rómbico del “anlage” cerebeloso (*r1*) que migrarán tangencialmente para formar EGL (Wingate y Hatten, 1999).

Debido al patrón de expresión y requerimiento de factores tróficos de los precursores de células granulares y la interacción con los genes que codifican para Shh que se activa de manera aberrante en la señalización para el desarrollo de tumores cerebelosos, se considera que estas células que dan origen a las diferentes poblaciones de células precursoras están involucradas en el desarrollo del cerebelo y con una pérdida de tales señales o la capacidad de responder a ellas podrían ser las poblaciones de origen del meduloblastoma y sus variantes (Wechsler- Reya & Scott, 1999). Sin embargo, existe otra hipótesis que sugiere la generación de células troncales cancerosas (CSC) que participarían en establecer las diferentes variantes de meduloblastoma que se originarían de las diferentes poblaciones de células precursoras presentes en el cerebelo (Gilbertson *et al.*, 2008).

I.2.1 CÉLULAS TRONCALES NEURALES EN EL DESARROLLO DEL SISTEMA NERVIOSO

Las células troncales se definen en términos funcionales, de este modo son células indiferenciadas con alta capacidad de autorrenovación, que darán lugar a uno o más fenotipos de células especializadas con funciones determinadas en el organismo, existiendo diferentes tipos de células troncales que se generan durante el desarrollo en los mamíferos de acuerdo a su potencial para diferenciar. Hasta la etapa de mórula, cada célula producida es idéntica a las demás siendo todas células totipotentes, a medida de que avanza el desarrollo en la etapa de blastocito, cada célula forma parte de la masa celular interna y es capaz de producir todas las células del embrión entre sí, con excepción de las estructuras extraembrionarias, de esta porción de la blástula se generan las células troncales embrionarias (ESC) que son poblaciones celulares con el mayor potencial de diferenciación, son capaces de producir células troncales somáticas incluidas las que dan lugar al sistema nervioso central (SNC) (Mayani, 2003).

Durante el desarrollo del SNC existen elementos reguladores que darán origen a diferentes poblaciones de células troncales neurales (CTN). La CTN se define como una población indiferenciada con la capacidad de autorrenovarse por lo cual podrán dar origen a células idénticas así mismas con un mismo potencial de diferenciación y por último tener el potencial de dar origen a neuronas y células gliales. La inducción neural da origen al neuroepitelio, en el cual se da la migración del núcleo de las células a lo largo de su altura (migración nuclear intercéntrica), la cual se encuentra coordinada con las diferentes fases del ciclo celular, cuando las células se encuentran iniciando la fase G1 el núcleo ha migrado a la periferia del tubo neural en donde se duplicará su material genético (fase S), para después regresar al lumen o zona subventricular (SVZ) en donde se transcurrirá la etapa G2, para dividirse, por lo que, el neuroepitelio se encuentra experimentando divisiones celulares simétricas (Acevedo *et al.*, 2011).

Quian *et al.*, (2000) describieron que la proporción de las CTN varía de acuerdo a su ubicación a lo largo de los diferentes ejes, así como a su etapa en el desarrollo del SNC, alcanzando un 50% en médula espinal a los 8 días mientras que en la corteza cerebral un 20% a los 10 días del desarrollo embrionario de rata, de este modo se propone que existen diferentes factores que intervienen en la regulación para establecer la proporción de células proliferantes o el momento en el que deben de diferenciar, lo cual está determinado por las vías de señalización que se activan dentro de sus microambientes (Acevedo *et al.*, 2011).

Acevedo *et al.*, (2011) han descrito que existen al menos cinco poblaciones diferentes de precursores neurales (Figura 4), la población que integra a la CTN más temprana, se ubica en el neuroepitelio denominadas precursores neuroepiteliales primitivos (PNEs) con la tasa de proliferación más elevada, que genera una sucesión de divisiones celulares simétricas, permitiendo la amplificación de la población por autorrenovación para generar poblaciones con un potencial de proliferación y diferenciación alto, necesario para dar origen a la diversidad de fenotipos terminales que integran al sistema nervioso en sus diferentes regiones, por lo cual se han planteado como células que tendrían la capacidad de dar origen a los tumores del SNC.

Los PNEs son una población que se encuentran de manera temporal en el desarrollo neural del ratón, se encuentran entre los días 5.5 a 7.5 del desarrollo embrionario, su función es dar origen a la célula troncal neural temprana (PNEs tempranos), esta población requiere de FGF para proliferar, así como factores de transcripción (FT) con dedos de Zinc Zfhx1b (Dang & Tropepe, 2010).

En etapas avanzadas del desarrollo, es posible detectar una tercera población celular que es generada por los PNEs tempranos, la cual es denominada como PNEs tardíos, su existencia está relacionada con la expresión del receptor a EGF (EGFR), evento dependiente de la actividad de FGF2 (Santa-Olalla & Covarrubias, 1999).

La cuarta población es la glía radial (RG), se genera desde que da inicio la neurogénesis, caracterizándose por expresar el antígeno que muestra homología al anticuerpo monoclonal RC2, el transportador de glutamato específico de astrocitos (GLAST) y la proteína de unión a lípidos cerebrales (BLBP), cabe destacar que dentro de sus funciones iniciales es el soporte y guía de los neuroblastos o neuronas jóvenes, dada su estructura, se caracteriza por emitir prolongaciones que ponen en contacto a la célula con las superficies ventricular y pial al mismo tiempo, regiones en donde se dividen las CTN y se generan los neuroblastos (región ventricular) para migrar a la superficie en donde diferenciarán terminalmente (cercano a la región pial), por tanto el tener acceso a ambas superficies es una de las particularidades del neuroepitelio o CTN primitiva, por lo cual la RG es una población celular que se ubica en el neuroepitelio (Acevedo *et al.*, 2011). Se ha descrito que la RG contiene la capacidad de generar neuronas y células del linaje glial que desempeñan un papel estructural principal en la región del SNC (Campbell & Götz, 2002). Por lo que la RG da lugar a la quinta población de neuronas corticales durante el desarrollo embrionario tardío y posnatales responsables de la neurogénesis adulta (Acevedo *et al.*, 2011).

Las células troncales neurales del cerebro adulto (ANSC) son la quinta población descrita en dos nichos (la zona subventricular de los ventrículos laterales y la zona subgranular en la formación del hipocampo), en donde proliferan y dan origen a interneuronas del bulbo olfatorio y a las neuronas granulares del giro dentado del hipocampo, respectivamente (Riquelme *et al.*, 2008). De igual manera éstas forman un

conjunto de células precursoras a las cuales se les describe como células D1, D2 y D3, las cuales a su vez darán origen a neuronas granulares del hipocampo (células G) (Seri *et al.*, 2004). Cabe destacar que las dos poblaciones del adulto se han identificado como multipotentes y se autorrenuevan en ensayos *in vitro* y en consecuencia, la diversidad de las CTN durante el desarrollo hace predecir la existencia de diferentes mecanismos que permiten establecer una limitación del potencial a diferenciar, y de esta manera hay una necesidad en la variedad de fenotipos para cada una de las regiones (Acevedo *et al.*, 2011), así como los diferentes FT se expresan de manera diferencial por los efectos de morfógenos (moléculas que generan respuestas diferenciales de acuerdo a gradientes de concentración), los cuales durante el proceso de inducción neural establecen la identidad regional que impacta en la generación de los diferentes fenotipos de cada estructura a lo largo de los ejes antero-posterior y dorso-ventral (Ulloa & Briscoe 2007).

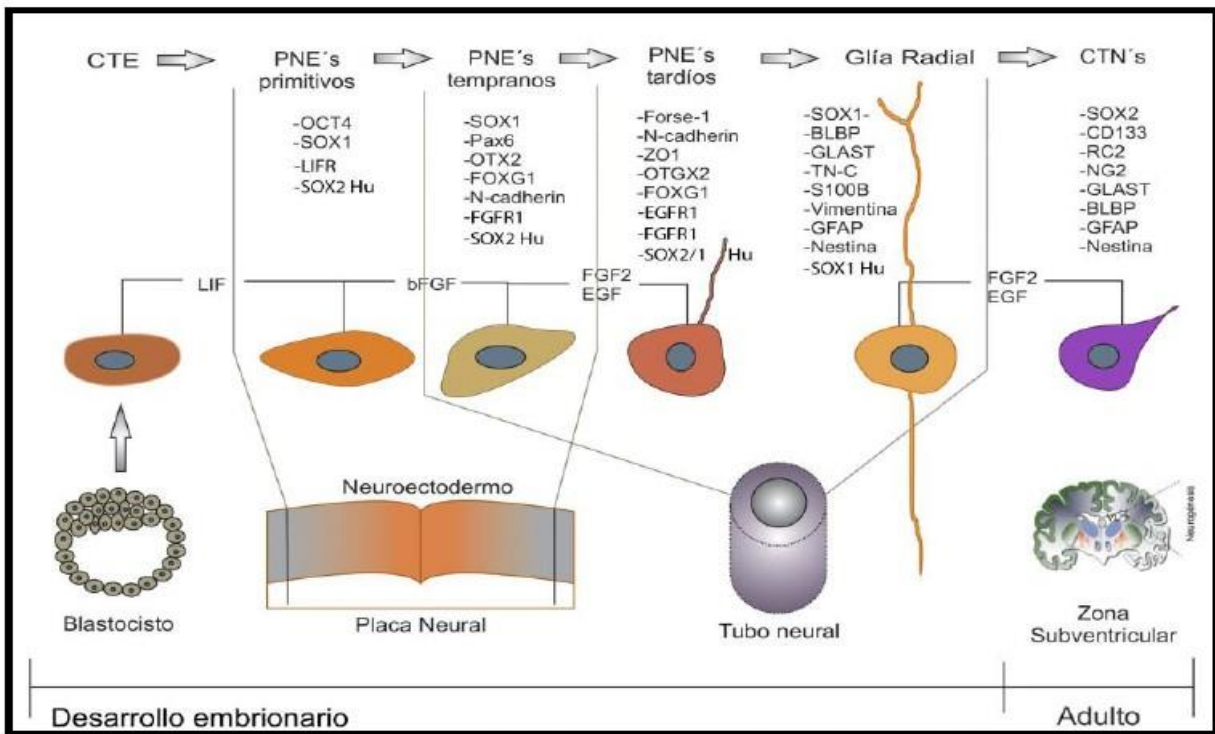


Figura 4. Células troncales neurales identificadas en el desarrollo embrionario y en cerebro adulto (Acevedo *et al.*, 2011).

I.2.2 MARCADORES NEURALES

Durante el desarrollo embrionario, en los tejidos que se generan, se producen diferentes poblaciones celulares que participan en la coordinación de los eventos de determinación, compromiso y diferenciación de los constituyentes celulares de cada órgano, asegurando procesos morfogenéticos que construirán cada tejido, al conjunto de esas poblaciones relacionadas entre sí, de modo ascendente o descendente,

se le conoce como linaje. De este modo en el linaje neural hay evidencias de la existencia de poblaciones intermedias que se relacionan en la Figura 5. De este modo, las CTN se representan como la primera población del linaje, posteriormente se genera un precursor que posee el mismo potencial que la célula troncal, es decir también produce a todos los constituyentes celulares del tejido, con la limitante de que no posee la capacidad de regenerarse a sí misma, es decir su vida es finita, por lo que esta población recibe el nombre de progenitor de amplificación transitoria (PAT) multipotente. Estas células poseen la mayor parte de los marcadores presentes en la CTN. Sin embargo, destaca como característica el tener una tasa de proliferación alta, así como altas demandas celulares, esto puede ser durante el desarrollo, el recambio tisular o bajo situaciones de daño. Posteriormente, se generan progenitores que adquieren el compromiso de diferenciar a solo algunos o un fenotipo específico. Es finalmente de esta población de donde se originan los fenotipos terminales (Acevedo *et al.*, 2011).

Por consiguiente, las poblaciones antes mencionadas en las Figuras 4 y 5 pueden ser identificadas por marcadores moleculares. Sin embargo, diversos autores mencionan lo difícil de identificar un marcador exclusivo de las poblaciones. Hasta el momento actual la identificación de estas poblaciones, en particular las CTN y PAT se realiza por una evaluación funcional. Sobresale como marcadores de la CTN, Bmi1, proteína de la familia Polcomb, que está implicada en la regulación epigenética, esta proteína es la única que ha mostrado una capacidad para mantener la autorrenovación y proliferación de la CTN (Acevedo *et al.*, 2011). SOX2 es importante ya que mantiene a los precursores multipotentes y participa en la propiedad de autorrenovación de la CTN, así mismo es una proteína indispensable en la represión de la diferenciación neuronal (Graham *et al.*, 2003). Su represión transcripcional muestra propiedades para la diferenciación neural durante el desarrollo embrionario y del cerebro del adulto. Mushashi es una proteína de unión a RNA que se expresa preferentemente en el SN en donde regula negativamente la traducción de genes como NumB, provocando una interferencia en la traducción del RNA mensajero de Notch, favoreciendo la actividad de Notch y contribuyendo a una autorrenovación de las CTN (Okano *et al.*, 2005). CD133 (prominina-1) es una proteína de membrana que se ha empleado para aislar a células troncales de diferentes tejidos incluyendo al neural y tejidos tumorales, las funciones y sus ligandos específicos de la prominina aún son relativamente poco claras (Mizrak *et al.*, 2008).

Con excepción de Bmi-1, todos los marcadores previamente mencionados se han localizado en el PAT, mientras que las otras moléculas se expresan en los precursores neurales, que se representan en la Figura 5 (Acevedo *et al.*, 2011).

Existe evidencia genética y molecular que ha permitido identificar la participación de diferentes moléculas en el SNC implicados en el desarrollo del cerebelo, muchas de estas moléculas están involucradas en regular la proliferación de sus precursores, de tal manera que se han implicado en los mecanismos de transformación que participa en el desarrollo de los meduloblastomas, las vías que destacan son las que promueven el crecimiento, así como aquellas que lo inhiben llevando a su generación.

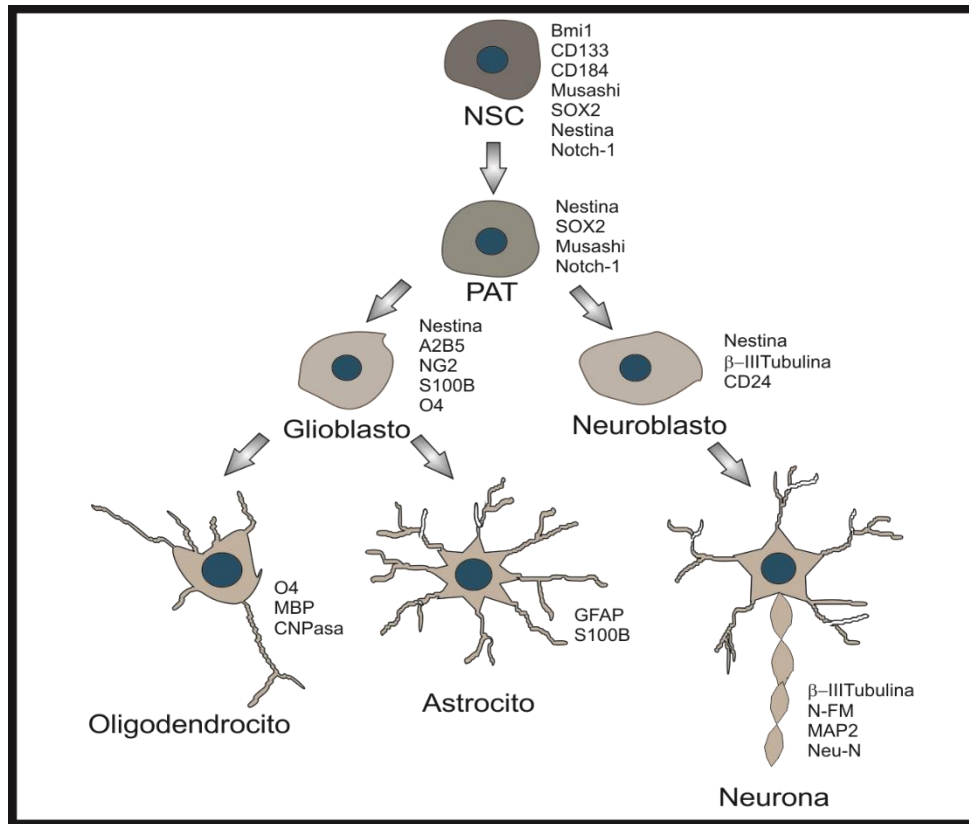


Figura 5. Linaje neural y células que integran al linaje neural se generan a partir de los cinco tipos de CTN (Acevedo *et al.*, 2011).

I.3 MEDULOBLASTOMA: CARACTERÍSTICAS GENERALES

El meduloblastoma es un tumor embrionario de mayor presentación en la población pediátrica y con menor frecuencia en adultos. Son las neoplasias sólidas más frecuente en poblaciones pediátricas y la segunda causa de muerte por cáncer en menores de 15 años (Mejica *et al.*, 2005). Actualmente se asume que este tumor surge de los precursores de células granulares del cerebelo, en la zona ventricular y de los precursores neurales de la porción dorsal del puente.

Los meduloblastomas son neoplasias malignas e invasivas que se localizan preferentemente en la fosa posterior y pueden presentar un color púrpura a gris, se presenta bimodalmente con picos de incidencia entre 3-4 y 8-9 años. Se considera que es la neoplasia más frecuente en la edad pediátrica siendo el 25% de incidencia en niños y adolescentes, mientras que en adultos suele presentarse aproximadamente en un 0,5%-1% de las neoplasias del sistema nervioso central (SNC) (Crawford *et al.*, 2007). En cuanto a su prevalencia es mayor en hombres que en mujeres con una relación de 1.5:1 (de la Cruz Pabón *et al.*, 2018). Pero no dejando a un lado que cuando se presenta una manifestación de una lesión hiperdensa que compromete el cerebelo en un adulto, se debe considerar una metástasis de hemangioblastoma o astrocitoma, y con una menor frecuencia un meduloblastoma. El subtipo más común en adultos es el desmoplásico, que se localiza principalmente en hemisferios cerebelosos. A diferencia de los tumores

pediátricos que se localizan habitualmente en la línea media. El meduloblastoma se considera un tumor de rápido desarrollo por su diseminación al cuarto ventrículo y al acueducto de Silvio por el líquido cefalorraquídeo. Aproximadamente al momento del diagnóstico el 20% de los pacientes presenta metástasis endocranianas retrógradas o subaracnoideas (Mejica *et al.*, 2005).

I.4 CLASIFICACIÓN HISTOPATOLÓGICA DEL MEDULOBLASTOMA

En la última publicación de la clasificación de los tumores del SNC por la OMS en el 2016, el meduloblastoma fue clasificado en 5 variables o subestirpes que presentan grado IV de malignidad: meduloblastoma clásico, meduloblastoma desmoplásico / nodular (MBDN), meduloblastoma con extensa nodularidad (MBEN), meduloblastoma de células grandes / anaplásico (MB LC / A) y meduloblastoma NOS (Komori *et al.*, 2017).

Meduloblastoma clásico se caracteriza por una alta celularidad, con una alta proliferación y presentan células pequeñas de mediano tamaño con núcleos redondos, hipercromáticos u ovalados. Pueden presentar regiones con rosetas Homer-Wright que pueden entrecruzarse, su presencia se llega a asociar con el aumento del pleomorfismo nuclear, así como una alta actividad mitótica (Millard *et al.*, 2016).

Meduloblastoma desmoplásico / nodular (MBDN) se caracteriza por ser una estructura bifásica que consiste en zonas libres conocidas como "islas pálidas", rodeada de una gran densidad celular con una alta proliferación, también se puede apreciar una baja actividad mitótica, acompañada de apoptosis celular (Ellison, 2002).

Meduloblastoma con extensa nodularidad (MBEN), presenta una estructura lobular extendida, con nódulos grandes, algunos de apariencia ovoide, se caracteriza por tener células necróticas y esporádicamente células parecidas a neuronas maduras (Gilbertson *et al.*, 2008).

En cuanto al meduloblastoma de células grandes / anaplásico (MB LC / A) se realizó la fusión de ambas presentaciones, ya que por lo regular muestran una composición celular mixta. La anaplasia citológica refleja una mayor variabilidad nuclear, mientras que las células grandes se distinguen por tener núcleos redondos más grandes. En cuanto al diagnóstico, se debe tener en cuenta que debe ser predominante un tejido muy anaplásico o un componente de células grandes o una mezcla de ambos (Pietsch *et al.*, 2016).

En el último caso, meduloblastoma NOS, fue una subclasificación que se introdujo en la clasificación de la OMS en el año 2016 (WHO2016) para permitir agrupaciones lo más rigurosamente posible, además de incorporar la nomenclatura molecular.

NOS se aplica cuando las pruebas genéticas no están disponibles, las pruebas genéticas no muestran modificaciones genéticas de diagnóstico que sean compatibles con los descubrimientos histológicos o cuando existe inseguridad sobre las características arquitectónicas o citológicas de un tumor debido a la insuficiencia de tejido de muestreo o la presencia de artefactos tisulares (Komori *et al.*, 2017).

Es por esto que el conocimiento sobre el meduloblastoma desde la clasificación de la OMS en el 2007 de los tumores del SNC, ha aumentado sobre todo en el conocimiento de las alteraciones genéticas y

características biológicas, que se han complementado con estudios del genoma completo y transcriptómicos. Diversos autores han señalado que los subgrupos moleculares del meduloblastoma se superponen con las características histológicas.

I.4.1 CLASIFICACION MOLECULAR DEL MEDULOBLASTOMA

En el 2012 se llegó a un consenso general con relación a la existencia de solo cuatro subgrupos moleculares de meduloblastomas, designados como WNT (Wingless) con una frecuencia de 11%, SHH (Sonic Hedgehog) con 28%, Grupo 3 (GPR3) con 27% y Grupo 4 (GPR4) con 34%. Donde adicionalmente los pacientes se distinguen en tres grupos de edad: bebés, lactantes y pre-escolares (de 4 años), niños (de 4 a 16 años) y adultos (de más de 16 años), en los cuales se demostró una frecuencia diferente de estos subgrupos, de la siguiente manera: Tanto bebés como adultos la frecuencia de SHH fue más prominente, representando más de la mitad de los casos pero en niños la frecuencia fue menor (14%), los meduloblastomas designados como WNT estaban casi ausentes en lactantes (1%) de igual manera que en el GPR4 (11%). En contraste, GPR3 ligeramente se encontró en adultos (6%). En cuanto a la distribución por género, los tumores WNT Y SHH ocurrieron por igual tanto en hombres como en mujeres, mientras que en el grupo 3 y grupo 4 la frecuencia es el doble en hombres que, en mujeres, esto se observó para las tres categorías de edad. En la mayoría de los meduloblastomas se observó una histología clásica en un 70%, 16% en una histología desmoplásica y un 10% una histología de células grandes/anaplásicas (MB LC / A). Sin embargo, los tumores SHH fueron más frecuentes en lactantes y adultos, el grupo 3 se encontró comúnmente en lactantes, pero no en tumores de grupo 4 o WNT. Con una ocurrencia máxima más tarde en la infancia (5-13 o 10-12 años). Se mostraron diferencias en la distribución de las anomalías cromosómicas, en las cuales se encontró la pérdida completa o parcial del cromosoma 6 en los tumores WNT (85%), la pérdida del cromosoma 9 con mayor frecuencia en tumores de SHH (47%), y con menor frecuencia en tumores de grupo 3 (21%), la pérdida de 17p con o sin ganancia de 17q se presenta con mayor frecuencia en grupo 3 y grupo 4. Los cuatro subtipos moleculares de meduloblastomas presentaron diferencias significativas en la supervivencia, la mejor supervivencia se manifestó entre los tumores WNT y la peor en los pacientes con el tumor del grupo 3 (Kool *et al.*, 2012).

SHH (Sonic Hedgehog) es una proteína que tiene efecto proliferativo sobre células precursoras de células de Purkinje por lo que se propone que contribuye a la patogénesis del meduloblastoma. Esta proteína se adhiere al receptor transmembrana PATCHED1 (PTCH1). En ausencia de la proteína SHH, el receptor PTCH1 se adhiere a otra proteína, "smoothened" (SMO) e inhibe así la activación de factores de transcripción que conducen a la proliferación celular. Cuando la proteína SHH se une al receptor PTCH1 se revierte esta inhibición, lo que lleva a la activación de los factores de transcripción y a la oncogénesis. Se ha sugerido que los tumores del grupo SHH surgen de los precursores neurales de la capa granular externa o del núcleo coclear. Se tiene un pronóstico intermedio con una supervivencia de 60-80% a los 5 años y una relación de género 1:1 con una presencia en niños bimodal, además de la de los adultos.

WNT (Wingless), es una proteína extracelular cuya señalización participa en la regulación del crecimiento y diferenciación. Esta proteína se adhiere a su receptor Frizzled (FRZ), donde la interacción desestabiliza un complejo proteico que regula la concentración de un regulador de factores de transcripción (β -

Catenina), lo que promueve el crecimiento y la proliferación celular del tumor. Las mutaciones en la señalización de WNT son comunes en pacientes con síndrome de Turcot y se han encontrado mutaciones en el complejo proteico y en la β -catenina. Su distribución entre géneros es de 1:1, son más comunes en niños y adultos y muy escasos en lactantes. Tienen el pronóstico más favorable de los cuatro subgrupos, los tumores del subgrupo WNT parecen surgir de los progenitores del labio rómbico inferior del tallo cerebral.

Grupo 3 es característico de una alta amplificación del proto-oncogen MYC, donde en casi todos los casos se expresa MYC aberrantemente, al igual que encontrarse altos niveles de inestabilidad genómica. Se ha descrito de igual manera la activación del factor de crecimiento independiente 1 (GFI1) o de los pro-oncogenes GFI1b. La mayoría de estos tumores presenta una histología de la estirpe clásica y en menor medida de células grandes/anaplásica. Se presenta en mayor medida en niños y varones (2:1), teniendo también el peor pronóstico de los cuatro subgrupos de meduloblastoma, el grupo 3 parece originarse de los precursores neurales de la capa germinativa externa de la región subventricular.

Grupo 4 son los tumores más comunes, con un pronóstico intermedio (similar al SHH) comúnmente tienen una histología clásica y se suele presentar más en varones (3:1). Se ha encontrado amplificación de proto-oncogenes tales como MYCN y el CDK6. Ciertas partes de tumores del grupo 4 tiene activación del GFI1 o GFI1B, así como la presencia del isocromosoma 17q (De la Cruz Pabón *et al.*, 2018).

Un estudio más reciente proporcionó evidencia sobre la heterogeneidad intratumoral dentro de los cuatro subgrupos de meduloblastoma, determinando que cada subgrupo está compuesto por varios subtipos. Donde se identificaron 12 subtipos: dos para WNT, cuatro para SHH, tres para el grupo tres y tres para el grupo 4 como se observa en la Figura 6 (Cavalli *et al.*, 2017).

En el subgrupo de SHH, se identificaron cuatro subtipos distintos: el subtipo **SHH α** afecta principalmente a niños (3 a 16 años) tiene el peor pronóstico, se caracteriza a nivel molecular por la amplificación de MYCN, YAP1, TP53 y la pérdida de 9q, 10q, 17p. **SHH β** afecta a niños (<3 años), con frecuencia metastásicos, albergando delecciones PTEN focales y son asociados a un mal pronóstico. **SHH γ** tiene un panorama de número de copias relativamente silencioso, sin amplificaciones recurrentes (es recurrente en pacientes lactantes) asociado a la histología de meduloblastoma con nodularidad extensa (MBEN) y asociado a un buen pronóstico y **SHH δ** es recurrente en pacientes adultos, con un pronóstico favorables y caracterizado por mutaciones del promotor TERT. En el subgrupo de WNT, se identificaron dos subtipos distintos: **WNT α** está representado principalmente por niños, con una monosomía 6 y el **WNT β** está representado por pacientes adultos y con frecuencia son diploides para cromosoma 6, ambos tumores tienen una supervivencia similar, por su parte el grupo 3, se identificaron tres subtipos distintos: **grupo 3 α** , en el cual está representado por lactantes (<3 años), con poca frecuencia es metastásico, con pérdida del cromosoma 8q. El **grupo 3 β** presenta una mayor frecuencia de activación de los oncogenes GFI1 y GFI1B, así como amplificación de OTX2 y la pérdida de DDX31 en el cromosoma 9, por su parte el **grupo 3 γ** se caracteriza por la amplificación de MYC y proporciona un pronóstico pobre en los pacientes. Finalmente, en el grupo 4, se identificaron tres subtipos distintos: **grupo 4 α** , se ve enriquecido por amplificación de MYCN, el **grupo 4 β** , esta enriquecido para las duplicaciones SNCAIP y el **grupo 4 γ** tiene amplificación de CDK6 (Cavalli *et al.*, 2017).

El estudio se hizo con una gran cohorte de meduloblastomas por expresión genética, pero se sugiere un enfoque más integrado con una cohorte más grande que proporcione una clasificación más precisa en la

heterogeneidad de los meduloblastomas ya que la identificación de subtipos tiene importantes aportes biológicos y clínicos que servirán para la creación de modelos para generar biomarcadores confiables y terapias más efectivas para la identificación de estos tumores.

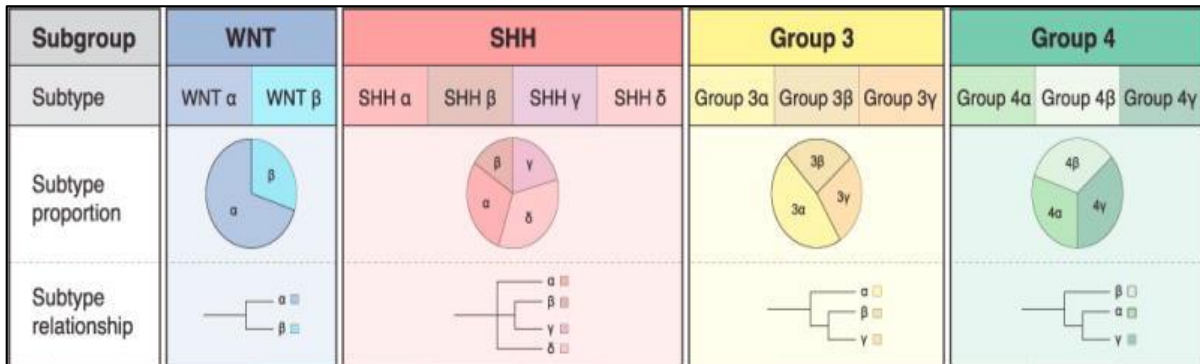


Figura 6. Clasificación molecular de los meduloblastomas (Cavalli *et al.*, 2017).

I.5 TRATAMIENTO DE LOS MEDULOBLASTOMAS

Los tratamientos actuales para el meduloblastoma implican la realización de cirugía para retirar la mayor parte del tumor, la radioterapia y quimioterapia combinadas para tener la mejor eficiencia. Sin embargo, el pronóstico es muy variable para los pacientes, lo que dependerá de la edad, diseminación de la enfermedad, residuo tumoral posquirúrgico, al igual que la variante histológica y los grupos de amplificación (De la Cruz Pabón *et al.*, 2018). No obstante, la comprensión de las vías de señalización moleculares que participan en el desarrollo y la regulación de la proliferación es muy probable que cambie la expectativa de pronóstico de la enfermedad (Crawford *et al.*, 2007).

La cirugía es un componente clave en el tratamiento ya que constituye el control de la afectación por la ocupación craneal, ya que alivia la hipertensión intracraneal y ayuda al diagnóstico. Sin embargo, hay riesgo en consecuencias neurológicas, una de ellas es el síndrome de la fosa posterior (mutismo cerebeloso), que provoca disminución de la producción lingüística y la dificultad para iniciar movimientos, estos síntomas que pueden o no desaparecer (De la Cruz Pabón *et al.*, 2018).

La terapia de radiación mejora la supervivencia de los pacientes, ya sea tanto en el control del residuo tumoral, como para el control de la diseminación; la cual suele usarse en conjunto con los tratamientos. Cabe mencionar que el deterioro neurocognitivo grave se ve sobre todo en niños pequeños (Crawford *et al.*, 2007). Es por esa razón que diversos autores consideran que se lleve a cabo una reducción de dosis o retardo de la terapia en pacientes menores de 3 años.

La quimioterapia se puede usar posteriormente a la cirugía y a la radioterapia, en niños se emplea para retrasar o incluso evitar la radioterapia (Crawford *et al.*, 2007). La quimioterapia se puede usar en combinación con radioterapia en casos donde no se pueda llevar a cabo la cirugía (De la Cruz Pabón *et al.*, 2018). En pacientes pediátricos con enfermedad no diseminada se ha visto que la quimioterapia puede ser curativa, en adultos la quimioterapia no se asocia a buenos resultados, una de las grandes

preocupaciones es que a largo plazo se ha visto que se desarrollan tumores malignos secundarios, gliomas y meningiomas, sin dejar a un lado las repercusiones neurocognitivas, así como algunas deficiencias hormonales (Crawford *et al.*, 2007).

En estudios posteriores con una población de 22 niños diagnosticados con meduloblastoma tratados con quimioterapia presentaron los siguientes efectos tardíos: pérdida de audición (20/22), hipotiroidismo (8/22), deficiencia de la hormona del crecimiento (7/22), panhipopituitarismo (5/22), cataratas (2/22), dificultades de aprendizaje (2/22), dificultad motora focal (2/22), disfunción cerebelosa (2/22) y síndrome de fosa posterior (1/22) (Vaidyanathan *et al.*, 2014).

A pesar de la mejora en los tratamientos, los pacientes aún necesitan combinatorias de fármacos más específicos que permitan una terapéutica más precisa para mitigar las secuelas negativas al tratamiento y tener una mejor la calidad de vida de los sobrevivientes de meduloblastoma. Además de que en ocasiones las estrategias terapéuticas antitumorales se enfrentan a casos de resistencia al tratamiento, y solo se generan secuelas en los pacientes. De tal suerte que es conveniente desarrollar procedimientos diagnósticos que permitan caracterizar a los tumores para definir con mayor precisión el esquema de tratamiento antitumoral.

I.6 FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

El descubrimiento de los fármacos para el cáncer a través de pruebas a gran escala de sustancias químicas sintéticas y productos naturales en animales contra la proliferación rápida de los tumores, fue entre 1950 a 1970, los cuales interactuaban con el ADN o sus precursores, inhibiendo la síntesis de nuevo material genético o causando daño irreparable del ADN en sí mismo, que posteriormente con nuevos avances se extendieron en productos naturales más convencionales, como el paclitaxel y fármacos semisintéticos como el etopósido, ambos implicados en procesos proliferativos. Los principales fármacos se clasifican en cinco grupos: fármacos alquilantes, antimetabolitos, productos naturales, fármacos diversos y hormonas-antagonistas, para este trabajo de investigación se destacan los empleados en el tratamiento para pacientes con meduloblastoma (Tabla 2) (Chabner *et al.*, 2006).

Tabla 2. Clasificación de fármacos útiles en el tratamiento de enfermedades neoplásicas
(Modificada de Bruce *et al.*, 2006).

Clase	Tipo de fármaco	Nombres no comerciales (otros nombres)	Mecanismo de acción	Reacciones adversas	Enfermedades en la que se administra
Fármacos alquilantes	Mostazas nitrogenadas	Ciclofosfamida	Alteran la síntesis de DNA y la división celular	Cistitis hemorrágica, ulceración gastrointestinal, cistitis, toxicidad pulmonar, renal, hepática o cardíaca, esterilidad, efecto teratógeno y leucemia	Meduloblastoma, leucemia linfocítica aguda y crónica, enfermedad de Hodgkin: linfoma no Hodgkin, cáncer de mama, ovario, tumores sólidos en niños; trastornos no neoplásicos acompañados por alteración inmunitaria: granulomatosis de Wegener, artritis reumatoide y síndrome nefrótico
Productos naturales	Alcaloides de la vinca	Vincristina	Específicos en el ciclo celular, bloquean células en mitosis	Toxicidad neurológica, estreñimiento grave, dolor abdominal, alopecia, leucopenia, trombocitopenia, anemia, poliuria, disuria, fiebre, síntomas gastrointestinales y síndrome de secreción inapropiada de hormona antidiurética.	Meduloblastoma, leucemia linfocítica aguda, neuroblastoma; tumor de Wilms, rabdomiosarcoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin y tumores sólidos pediátricos
Productos naturales	Epipodofilotoxinas	Etopósido	Específicos en el ciclo celular, bloquean células en mitosis	Leucopenia, trombocitopenia, náuseas, vómitos, estomatitis, diarrea, alopecia, fiebre, flebitis, dermatitis y reacciones alérgicas.	Meduloblastoma, cáncer de testículo, pulmonar de célula pequeña y otros cánceres de pulmón, cáncer de mama, enfermedad de Hodgkin, linfomas no Hodgkin, leucemia mielógena aguda y sarcoma de Kaposi.

Para el uso correcto de los fármacos antineoplásicos es necesario conocer la cinética del ciclo celular ya que muchos de estos medicamentos citotóxicos suelen actuar mejor dañando el ADN. Se ha descrito que sus efectos adversos son mayores sobre la fase S o síntesis del ADN (Figura 7), en cambio otros como es el caso de alcaloides y los taxanos bloquean la formación de huso mitótico en la fase M, es por esto que los fármacos actúan sobre la fase más vulnerable del ciclo celular y aunque hay diferencia en la duración del ciclo celular entre las células de diversos tipos, todas ellas muestran un mismo patrón durante el proceso de división: una fase que precede a la síntesis de DNA (G_1), un periodo de síntesis de DNA (S), un intervalo después de terminar la síntesis de DNA (G_2) y una fase mitótica (M) en la cual las células se dividen, en dos células hijas G_1 y cada una de estas últimas puede iniciar nuevamente de inmediato un ciclo celular o pasar a una etapa no proliferativa (G_0), es por esto que uno de los mayores retos del tratamiento es ajustar las dosis a fin de lograr un resultado final terapéutico pero sin causar toxicidad. Sin embargo, los medicamentos dirigidos a moléculas blanco han tenido un buen resultado en diversas enfermedades neoplásicas, es probable que en un futuro nuevas terapéuticas sustituyan a los fármacos citotóxicos. También se han visto implicados mecanismos de resistencia de las células tumorales a la quimioterapia, las cuales pueden seleccionarse de una población tumoral más grande por exposición a la quimioterapia con un solo fármaco en dosis bajas. Esta resistencia puede surgir hacia el medicamento específico, como la pérdida de la enzima activadora necesaria o la expresión excesiva de una bomba de expulsión de fármacos como la glucoproteína P, asociada al gen MDR, la cual es una proteína de membrana perteneciente a los transportadores dependientes de trifosfato de adenosina (ATP), la cual se ha visto implicada en procesos de resistencia en una amplia variedad de productos naturales que se utilizan en los tratamientos para el cáncer (Chabner *et al.*, 2006).

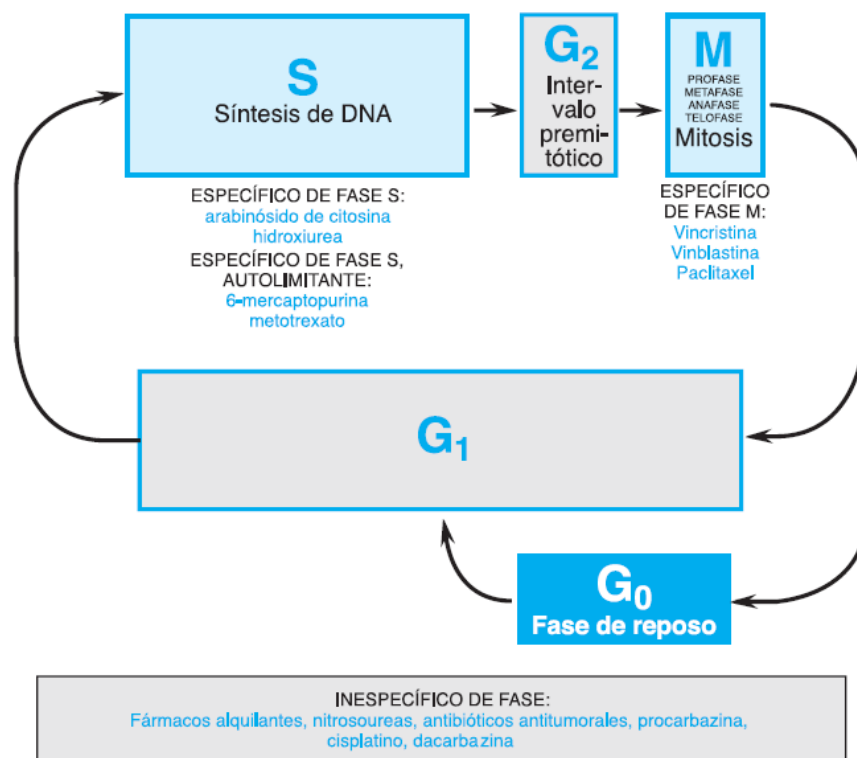


Figura 7. Ciclo celular y su relación con la acción de algunos medicamentos antitumorales. G_1 es el periodo que antecede el inicio de la síntesis de DNA. Las células que están en reposo se dice que se

encuentran en una subfase de G_1 , referida como G_0 . S es el periodo de la síntesis de DNA, G_2 es el intervalo premitótico y M el periodo de mitosis. Los fármacos que son citotóxicos para las células en cualquier punto del ciclo se denominan fármacos no específicos de fase del ciclo (Chabner *et al.*, 2006).

I.7 BOMBAS DE EFLUJO Y SU PARTICIPACIÓN EN LA RESISTENCIA A TRATAMIENTOS ANTITUMORALES.

Las bombas de eflujo realizan funciones fisiológicas importantes, como proteger a las células de efectos tóxicos de químicos orgánicos a los que pueden estar expuestas. Están presentes en todas las células, tanto bacterianas como en células eucariotas, son de gran importancia médica y farmacológica, ya que contribuyen a otorgar la resistencia a medicamentos, lo que establece el fracaso del tratamiento, incrementa los costos de atención médica y aumenta la mortalidad debido a complicaciones. La resistencia a antibióticos de un organismo puede adquirirse verticalmente a su descendencia u horizontalmente entre organismos mediante conjugación, transducción y transformación. Existen mecanismos principales por los cuales una célula exhiben resistencia a los agentes quimioterapéuticos: inhibición de la apoptosis, inducción de mecanismos de reparación de ADN, alteración de la estructura de la diana del fármaco, modificaciones en la composición de la membrana celular (que conduzca a una menor absorción del fármaco) y niveles de expresión elevados de bombas de eflujo de drogas (Kunjachan *et al.*, 2013).

Generalmente los transportadores son comparados con conductos, es por esto que los conductos como los transportadores facilitan la penetración de los iones inorgánicos y compuestos orgánicos a través de la membrana, por lo cual pueden estar abiertos o cerrados, y éstos son fenómenos se pueden dar de manera aleatoria, sin embargo, sólo cuando se encuentran abiertos, los conductos pueden actuar como poros para algunos iones. En cambio, con los transportadores se forman complejos intermedios con el sustrato (solutos), que posteriormente genera un cambio en la configuración del transportador induciendo la translocación del sustrato hasta el otro lado de la membrana. De esta manera, la velocidad de recambio entre los conductos y los transportadores es completamente distinta (Giacomini & Sugiyama, 2017)

Los sistemas de bombas de eflujo están divididos: Bombas de eflujo procariotas que median la resistencia en bacterias y las bombas de eflujo eucariotas que median la resistencia a compuestos orgánicos en hongos, protozoos y células cancerígenas, cabe destacar que la división está incompleta ya que existen otros transportadores que cumplen con funciones útiles metabólicamente, además de existir otras variantes como la familia SLC (Ughachukwu & Unekwe 2012).

Se sabe que el transporte vectorial es fundamental para la transferencia eficaz de los solutos a través de las barreras epiteliales o endoteliales, el transporte vectorial es unidireccional a través de una monocapa de células polarizadas, como las células epiteliales y endoteliales de los capilares encefálicos es por esto que la salida de fármacos del cerebro se da a través de las células del endotelio encefálico y las células epiteliales del plexo coroideo que se realiza por medio de transporte vectorial, así como los transportadores ABC los cuales median sólo la salida unidireccional sin la participación de transportadores de entrada en tanto que los transportadores SLC median tanto la captación o salida del fármaco (Giacomini & Sugiyama, 2017).

La resistencia de las células cancerosas contra los agentes anticancerígenos puede deberse a muchos factores, como las diferencias genéticas del individuo, especialmente en las células somáticas tumorales. Asimismo, es importante destacar el papel del microambiente tumoral sobre resistencia a los medicamentos como una razón de la recaída e incurabilidad de varios tipos de cáncer, este microambiente tumoral puede involucra células estromales normales, matriz extracelular, factores solubles que incluyen citocinas y factores de crecimiento, por otra parte, se han detectado poblaciones de células madre cancerosas en una variedad de tumores hematopoyéticos y sólidos. Aunque la quimioterapia deteriora una enorme cantidad de células en un tumor, se considera que los agentes quimioterapéuticos se eliminan de las células madre del cáncer con mecanismos especiales, lo que podría ser un factor importante para la resistencia a los fármacos lo cual se ha demostrado que la sobreexpresión del casete de unión a ATP (ABC), como ABCB1 y el ABCG2, mantienen las células madre del cáncer lejos de los agentes quimioterapéuticos. Esto es importante ya que las células madre cancerosas comparten varias de las características de las células madre normales ya que proporcionan una vida útil prolongada, incluido el silencio relativo, una capacidad activa de reparación del ADN y una resistencia a la apoptosis, nicho vascular, latencia, estabilidad hipóxica y mejorar la actividad de las enzimas reparadoras, de igual manera estas células permanecen estables en los pacientes que se recuperan aparentemente o hacen metástasis a órganos distantes y causan la recurrencia del cáncer (Mansoori, B *et al.*, 2017).

Por desgracia, los tratamientos convencionales para tratar estas neoplasias no han podido ser más óptimas en las últimas décadas ya que la mayoría de los pacientes recaen después de un tratamiento inicial y la progresión de la enfermedad provoca su muerte, es por esto que el fracaso de la quimioterapia en el tratamiento del cáncer se le atribuye principalmente a la resistencia a fármacos quimioterapéuticos.

1.7.1 BOMBAS DE EFLUJO EN LA EFICACIA DE DROGAS CITOTÓXICAS

La resistencia a compuestos quimioterapéuticos se genera en cualquier organismo como consecuencia de un proceso evolutivo, en el cual el fármaco es el mecanismo de selección. Una vez seleccionada la población resistente a determinados fármacos o compuestos químicos, a los que usualmente serían letales para su especie, el mecanismo de carácter genético se hereda a sus descendientes. De manera equivalente, el tratamiento para combatir el cáncer es responsable de seleccionar clonas que sobre expresan las bombas de eflujo, con lo cual el tumor generará la muerte de los pacientes al no poder ser eliminadas dichas poblaciones (Astudillo-de la Vega *et al.*, 2010).

La resistencia puede ser intrínseca, natural, innata o de *novi*. Se han descrito tumores que desde el inicio no responden a la quimioterapia y el tratamiento no tiene ningún efecto sobre el curso de la enfermedad, tal es el caso de hipernefoma, cáncer de colon, cáncer de páncreas o el melanoma. Sin embargo, en otras ocasiones la resistencia es adquirida, en la cual después de una respuesta objetiva tras el empleo de los fármacos antineoplásicos, surge una clona celular resistente, que provoca un recrecimiento del tumor, el cual ya no puede ser controlado por los fármacos inicialmente empleados, llamada también resistencia adquirida a múltiples fármacos antineoplásicos (MDR) (Astudillo-de la Vega *et al.*, 2010)

Cabe destacar que el objetivo principal del tratamiento quimioterapéutico es lograr la muerte de la célula tumoral, por ello es fundamental lograr que la mayor cantidad de fármaco activo llegue a nivel de su diana

molecular en el interior de la célula y cualquier factor que se interponga o dificulte este objetivo puede ser causa de resistencia (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006).

El desarrollo de resistencia a la quimioterapia en pacientes con cáncer es multicausal y en su origen pueden intervenir factores farmacológicos o celulares, como la distribución del fármaco en el organismo, su catabolismo o su activación, la presencia de barreras fisiológicas, así mismo la ubicación del tumor, lo cual limitarán la biodisponibilidad del fármaco citotóxico frente al tumor (Cervantes, 2018).

Los tumores sólidos, de forma intrínseca o adquirida, terminan siendo resistentes a múltiples agentes quimioterapéuticos, ya sea con estructura química y mecanismos de acción muy diferentes, siendo un fenómeno conocido como resistencia a múltiples drogas o MDR, atribuido a una proteína transportadora de la membrana celular llamada glucoproteína P, posteriormente se descubrieron otros mecanismos causantes del fenotipo celular multirresistente, como otras proteínas transportadoras, siendo el mecanismo de expulsión del fármaco fuera de la célula, la resistencia más estudiada y relacionada con la acción de ciertas proteínas transportadoras, como glucoproteína P (Pgp), MRP y BRCP. Actualmente se sabe que las proteínas MDR producen resistencia actuando como “bombas de expulsión”, disminuyendo la acumulación intracelular de las sustancias tóxicas, alterando la distribución intracelular de algunas drogas o inhibiendo la apoptosis. Las bombas de eflujo se ubican en la membrana celular y pertenecen a una familia de transportadores conocidos como transportadores ABC. Estos constituyen una superfamilia de proteínas que actúan como transportadores activos primarios o “bombas exportadoras” (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006; De Felipe & Duarte 2008).

Las bombas de eflujo requieren para el transporte la hidrólisis de ATP, por lo cual también son conocidas como bombas ATPasas. Las funciones de estos transportadores pueden ser facilitadoras (a favor de un gradiente de concentración, que no necesitan energías) o activadoras (que requieren energía) (Giacomini & Sugiyama, 2017; Morales-Pérez & García-Milian, 2017).

El bombeo puede ser de forma unidireccional o vectorial, e incluir una diversidad de compuestos entre los que destacan aminoácidos, péptidos, proteínas, iones metálicos, diversos lípidos, sales biliares y muchos compuestos hidrofóbicos, incluidos medicamentos. Por lo regular, los transportadores de tipo ABC envían hacia afuera de las células los compuestos y lo realizan en contra de su gradiente de concentración. En el genoma humano existen 49 genes conocidos para las proteínas de la familia ABC. La superfamilia ABC constituye la mayor familia de transportadores de membrana, el término ABC que deriva del inglés “ATP binding- cassette”, el cual hace referencia a los dominios catalíticos altamente conservados. Hasta la fecha se han identificado principalmente tres de las proteínas transportadoras de la superfamilia ABC de las bombas ATPasas que se encuentran implicadas en la resistencia farmacológica: Glucoproteína P (gpP), relacionada con subfamilia ABCB1; Proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos (MRP2), relacionada con la ABCC2 y Proteína asociada a resistencia en cáncer de mama (BRCP) relacionada con ABCG2 (Morales-Pérez & García-Milian, 2017).

Además de constar de 49 genes en la familia ABC, cada uno posee una o dos regiones conservadas, la cual es un dominio catalítico central de hidrólisis de ATP que contiene secuencias Walker A y B y una secuencia C específica para transportadores ABC, como se mencionó anteriormente estas proteínas fijan e hidrolizan el ATP para que dichas proteínas utilicen la energía para el transporte ascendente de sus sustratos a través de la membrana. Algunos transportadores de la superfamilia ABC pueden contener un único motivo ABC, formando homodímeros (BCRP/ABCG2) o heterodímeros (ABCG5 y ABCG8) los

cuales exhiben una función de transporte y la mayor parte de los genes ABC en las eucariotas transportan compuestos desde el citoplasma hasta el exterior o hasta un compartimiento intracelular (retículo endoplásmico, mitocondria, peroxisomas) (Giacomini & Sugiyama, 2017).

La **gpP** es una glucoproteína de membrana con un peso molecular de 170 kDa (Figura 8), por este motivo se le conoce también como proteína P-170 (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca, 2006). La gpP de membrana codificada por el gen ABCB1 (antiguamente MDR1) localizada en el cromosoma 7 (Morales-Pérez & García-Milian 2017), consta de 1280 aminoácidos, con 12 dominios transmembrana y dos sitios de unión para el ATP (De Felipe & Duarte 2008). La gpP suele expresarse en el colon, intestino delgado, tejidos suprarrenales y hepáticos limitando la absorción y mejorando la excreción de agentes xenobióticos de igual forma interviene en el transporte de drogas en la barrera hematoencefálica (BHE), así mismo diversas neoplasias malignas suelen expresarlo, entre ellas leucemias, cáncer de mama, cáncer de ovario, tumores de cabeza y cuello (Tan *et al.*, 2000).

La **MRP** es una familia formada por 12 proteínas de estructura similar, e incluye nueve miembros (MRP1-MRP9) (Keppler, 2011). MRP son codificadas por un gen ABCC2 que puede ser localizado tanto en la membrana citoplasmática como en el retículo endoplásmico, formando parte como gpP, de los transportadores ABC, infiriendo en que puede actuar en la expulsión de drogas fuera de la célula (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006; Morales-Pérez & García-Milian 2017). Los sustratos de los transportadores en la familia MRP son en su mayor parte aniones orgánicos, así mismo las especificidades de MRP1 y MRP2 en lo que se refiere a los sustratos son similares ya que ambos aceptan conjugados de glutatión y glucurónido, conjugados sulfatados de sales biliares y aniones orgánicos no conjugados de naturaleza anfipática, por lo menos una carga negativa y cierto grado de hidrofobicidad. Además, transportan medicamentos neutros o catiónicos contra el cáncer, como alcaloides de vinca y antraciclina, quizá a través de un cotransporte con glutatión reducido (GSH) (Giacomini & Sugiyama, 2017).

La **BCRP** es una proteína MDR, también conocida como CRCP1, MXR, ABCP o ABCG2, la cual se aisló de líneas celulares multiresistentes seleccionadas por mitixantrona. Es un transportador ABC que necesita un dímero o multídmero para trasladar el sustrato de forma eficiente a través de la membrana celular; se ha detectado en leucemias y algunos tumores sólidos (Tan *et al.*, 2000; Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006). Asimismo BCRP reconoce moléculas con carga tanto neutra como negativa, incluyendo a ciertos compuestos citotóxicos (topotecano, flavopiridol y metotrexato), conjugados sulfatados de ciertos medicamentos y hormonas (sulfato de estrógeno), antibióticos (nitrofurantoína y fluoroquinolonas), estatinas (pitavastatina y rosuvastatina) y compuestos tóxicos en los alimentos (Giacomini & Sugiyama, 2017).

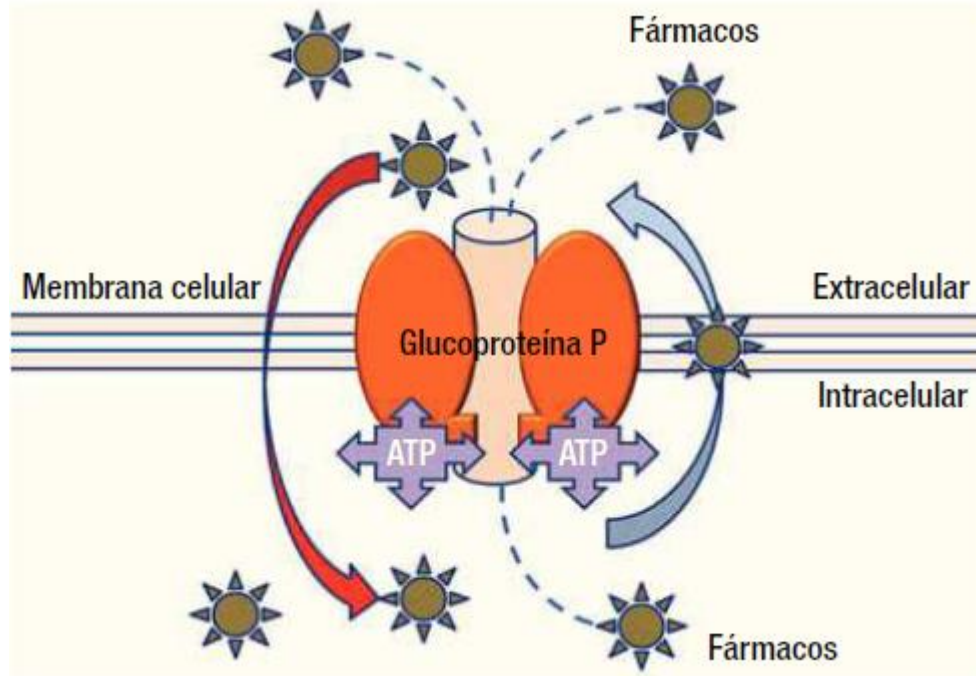


Figura 8. Representación de la glucoproteína P. Es una molécula que está embebida en la membrana con presencia dentro y fuera de la célula. La parte central de la molécula es un dominio que se reubica alternamente a las dos caras de la membrana plasmática (extracelular e Intracelular) que funciona con energía (ATP) para transportar fármacos del interior de la célula al exterior (Astudillo-de la Vega *et al.*, 2010).

La quimioresistencia se asocia con la sobreexpresión de proteínas como ABCB1 (MDR1 también conocida como P-glucoproteína o Pgp), ABCC1 (también conocida como proteína 1 resistente a múltiples fármacos o MRP1) y ABCG2 (también conocida como proteína resistente a cáncer de mama o BRCP), entre otras lo que se ha correlacionado a resultados desfavorables para los pacientes con neoplasias malignas, por lo cual conocer los mecanismos que participan en la resistencia a la quimioterapia es un reto, que brindará la oportunidad de determinar nuevos tratamientos que permitan generar mejores resultados con estrategias alternativas.

I.7.2 EXPRESIÓN DE BOMBAS DE EFLUJO EN TUMORES CEREBRALES, SU RELEVANCIA EN MEDULOBLASTOMA

El SNC está separado de la sangre por una vasculatura compuesta de células endoteliales (CE) especializadas que forman parte de la barrera hematoencefálica (BHE), la cual está especializada en proporcionar nutrientes y proteger al SNC de las moléculas nocivas endógenas y xenobióticas generando un obstáculo para la entrega efectiva de los medicamentos necesarios a las afecciones patológicas del SNC, incluyendo el cáncer (Wijaya *et al.*, 2017).

Las CE de los vasos cerebrales tienen uniones estrechas intercelulares (TJ) que son continuas. La integridad y el mantenimiento de la BHE están respaldados por astrocitos, neuronas, células microgliales, pericitos y la matriz extracelular (ECM) (Obermeier *et al.*, 2013).

De igual manera se sabe que los transportadores actúan en conjunto con enzimas que metabolizan los fármacos en los diversos tejidos de su destino farmacológico, por el contrario, algunos transportadores actúan como barreras protectoras en determinados órganos o células, por lo que el acceso del fármaco a dichos tejidos como el encéfalo y testículos se encuentra restringido por una barrera de endotelio capilar, por ejemplo la barrera hematoencefálica y los transportadores de salida pueden estar limitando el acceso de los fármacos por dicha barrera como es el caso de la gpP (Giacomini & Sugiyama, 2017).

Como se mencionó anteriormente, gpP es el transportador de membrana de la superfamilia ABC que se ha descrito como el principal agente involucrado en evitar que lleguen los xenobióticos a las neuronas. En los últimos años se ha demostrado que también intervienen en diversas neoplasias malignas. Por lo que se considera que la expresión de gpP por las células endoteliales (CE) de los vasos sanguíneos capilares del SNC (incluidos corteza cerebral, el cerebelo y medula espinal), los capilares de los testículos y los capilares de la dermis papilar podrían ser relevantes en la causa de resistencia en múltiples tumores (Cordon-Cardo, 1989).

El éxito del tratamiento de los tumores cerebrales ha sido lento y uno de los problemas que lo dificulta es su débil respuesta a los medicamentos contra el cáncer, ya que la eficacia de la quimioterapia a menudo se ve afectada por la BHE, que restringe físicamente la entrada de drogas grandes y / o hidrofílicas en el cerebro (Demeule *et al.*, 2002). Un desafío para la terapia eficaz del meduloblastoma es la identificación de medicamentos que no solo sean eficaces en modelos de líneas celulares específicas para la estirpe que se requiera, sino que de igual manera puedan penetrar la BHE y de igual manera el tumor, dentro de los tratamientos de MB se encuentra la quimioterapia, la cual incluye la combinación de vincristina, carmustina, procarbazona, ciclofosfamida, CCNU (cloro metilciclohexilnitrosourea), cisplatino y carboplatino muchos de los cuales son sustratos de ABCB1 o ABCG2 en varias líneas celulares o modelos murinos *in vivo* (Wijaya *et al.*, 2017).

Es por ello que el éxito terapéutico depende de la administración combinada de diferentes fármacos. Recientemente, se ha propuesto que en caso de resistencia es posible el uso de combinado de inhibidores para los ABCB1 y ABCG2. Siendo terapias de primera línea que podrían aumentar la penetración y los efectos citotóxicos de los medicamentos, mejorando los resultados clínicos. De esta manera, nuestro proyecto pretende evaluar bombas de eflujo, que nos permita conocer su participación en la eficacia a fármacos citotóxicos en las poblaciones celulares que integran estos tumores.

II. ANTECEDENTES

II.1. EXPRESIÓN DE LA PROTEINA ASOCIADA A LA RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS

La resistencia clásica a múltiples fármacos se atribuye a la elevada expresión de bombas de eflujo de drogas dependientes de ATP pertenecientes a la superfamilia ABC, las tres mejor caracterizadas son ABCB1 (MDR1), ABCC1 (MRP1) y ABCG2 (Bcrp) (Kathawala *et al.*, 2014).

ABCB1 (MDR1), se expresa normalmente en colon, intestino delgado, suprarrenales, riñón, hígado, endotelio capilar de cerebro, testículos, barrera placentaria, músculo, pulmón y páncreas (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006). En el cerebro se ha demostrado la participación de gpP en células endoteliales de los capilares que forman parte de la barrera hematoencefálica. ABCB1 se le ha asociado a un mal pronóstico en tumores cerebrales incluidos el MB y glioma, ya que actualmente los medicamentos que se usan como etopósido, vincristina y metotrexato, recurrentemente son sustratos de ABCB1, por lo que se ha anticipado que el inhibir ABCB1 podría mejorar la eficacia en la combinación de fármacos para la quimioterapia, en los cuales se hicieron ensayos clonogénicos que se repitieron al menos tres veces en líneas celulares de MB en respuesta con etopósido solo o en combinación con la inhibición de ABCB1 con verapamilo el cual es un fármaco bloqueador de los canales de calcio y vardenafilo el cual es un inhibidor de la fosfodiesterasa y se visto involucrada en reparar los daños en el ADN como en la topoisomerasa II, por lo tanto en su uso médico se usa para la disfunción eréctil pero también se ha descubierto su función en el SNC, sensibilizando así al etopósido, lo que implicaría el papel de ABCB1 en la exportación de etopósido en el modelo de meduloblastoma (Othman *et al.*, 2014).

La proteína 1 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP1), codificada por el gen ABCC1, se expresa ampliamente en el tejido normal y puede contribuir al desarrollo de resistencia a distintos medicamentos en varios tipos de tumores sólidos como los de pulmón, mama, próstata y neuroblastomas y su expresión contribuye a un pronóstico negativo (Munoz *et al.*, 2007).

Descubrimientos posteriores con el transportador ABCC2, (MRP2 proteína 2 asociada a la resistencia a múltiples fármacos), muestra un niveles bajos de expresión en ABCC2 bajo tratamiento con cisplatino en carcinoma de ovario (Guminski *et al.*, 2006). De acuerdo a distintos análisis de la base de datos de *The Human Protein Atlas*, el transportador ABCC2 (MRP2) se expresa en niveles bajos en cerebro específicamente en el cerebelo y de igual manera hay expresión en algunas líneas celulares de cerebro como SH-SY5Y, U-87 MG y AF22.

La proteína 3 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP3), codificada por el gen ABCC3, se ha descrito en cánceres de pulmones, hígado, ovario, mama y leucemia y se expresa intensamente a lo largo de la progresión del cáncer de hígado, caracterizándose como parte de la resistencia a múltiples fármacos (Carrasco-Torres *et al.*, 2016).

La proteína 6 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP6), codificada por el gen ABCC6, se ha descrito mutaciones en el MRP6 implicadas en pseudoxantoma elástico (PXE), un trastorno hereditario del tejido conectivo implicado en una disminución de la agudeza visual, lesiones cutáneas y complicaciones cardiovasculares, la proteína 6 fue descrita por su alta expresión en hígado y riñón mientras que su baja expresión se observa en tejidos como pulmones, intestinos, la piel y las paredes de los vasos sanguíneos, sin embargo aún no es posible determinar niveles claros de MRP6, con respecto

a su contribución de MRP6 a la MDR en tumores y puede ser bastante limitada por lo que se debe facilitar estudios en profundidad sobre la naturaleza de la enfermedad en pacientes con tumores y cáncer (Scheffer *et al.*, 2002).

Por otra parte, la proteína 7 asociada a la resistencia a múltiples fármacos (MRP7), codificada por el gen ABCC10, es un transportador xenobiótico con una alta especificidad incluyendo medicamentos antitumorales como taxanos, alcaloides de la vinca, entre otros y tiene una alta expresión en tejidos como el riñón, cerebro y colon sugiriendo así su participación en el transporte de fármacos y otras moléculas endógenas (Kathawala *et al.*, 2014).

Finalmente, la Bcrp es la proteína-MDR de descubrimiento más reciente, también llamada MXP, ABCP o ABCG2, se ha descrito que su expresión confiere una elevada resistencia a las antraciclinas y se ha detectado la Bcrp en leucemias agudas y algunos tumores sólidos como de pulmón (Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006). Así mismo Morfouace *et al.*, en el 2015, demostraron que el transportador ABCG2 se expresó en gran medida, en el meduloblastoma G3 humano y de ratón. Y sugieren que la expresión de ABCG2 podría explicar la resistencia del meduloblastoma G3 a los tratamientos de quimioterapia, especialmente aquellos medicamentos de ABCG2, son sustratos como el topotecán.

Tabla 3. Compuestos quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de gliomas y meduloblastomas (modificada de Wijaya *et al.*, 2017).

Fármaco	Tipo de droga/ cáncer	Transportador implicado
Ciclofosfamida	Agente alquilante / MB	Ninguno reportado en contexto GBM / MB
Etopósido	Inhibidor de la topoisomerasa	ABCB1
Vincristina	Alcaloide de la vinca / inhibidor de la formación de microtúbulos en el huso mitótico / MB y GBM	

GBM= Glioblastoma multiforme **MB=** Meduloblastoma

III. JUSTIFICACIÓN

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) ocupan el tercer lugar más frecuente de las neoplasias en la población infantil, siendo el cáncer una de las principales causas de mortalidad. El meduloblastoma es la neoplasia sólida más frecuente en poblaciones pediátricas, considerado como un tumor de rápido desarrollo con una diversidad de poblaciones celulares y una gran heterogeneidad. Los tratamientos actuales implican cirugía, radioterapia y quimioterapia en los pacientes con tumores más agresivos e infiltrantes, aunque es necesario métodos más específicos que permitan mitigar las secuelas negativas al tratamiento, lo que permitirá proporcionar una mejora en la calidad de vida a los sobrevivientes de meduloblastoma. Se ha identificado que las fallas en la quimioterapia son resultado en la mayoría de las veces a que en los pacientes se presenta resistencia a fármacos.

Es por ello que al conocer los patrones de expresión de los transportadores ABC, se podrá predecir los efectos citotóxicos de los medicamentos y así mejorar los resultados clínicos. Lo que brindará la oportunidad de establecer tratamientos más selectivos y eficientes, así como definir con mayor precisión el pronóstico de cada paciente al permitir conocer la eficacia de los fármacos citotóxicos en poblaciones celulares que integran a estos tumores. Por ello es necesario establecer modelos experimentales que permitan la posibilidad de evaluar alternativas terapéuticas para mejorar el pronóstico y disminuir la toxicidad de los tratamientos antitumorales.

IV. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuál es el efecto de la expresión de las bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2 en la línea tumoral de meduloblastoma Daoy, sobre la viabilidad celular y el efecto citotóxico de los fármacos antitumorales?

V. HIPÓTESIS

La expresión de las bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2 confieren una mayor viabilidad a las células de la línea tumoral de meduloblastoma, Daoy y reduce los efectos citotóxicos de los fármacos antitumorales.

VI. OBJETIVO GENERAL

Correlacionar el efecto citotóxico de los fármacos vincristina, ciclofosfamida y etopósido, en relación con la expresión de las bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2 en la línea tumoral de meduloblastoma, Daoy.

VI.1 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer condiciones óptimas para el crecimiento de la línea tumoral Daoy.
2. Detectar de la presencia de las bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2 en la línea tumoral, Daoy.
3. Evaluar el efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos: vincristina, ciclofosfamida y etopósido para determinar la viabilidad de la línea tumoral Daoy.
4. Correlacionar en base a la literatura la actividad citotóxica de los fármacos antitumorales con la expresión de las bombas de eflujo.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

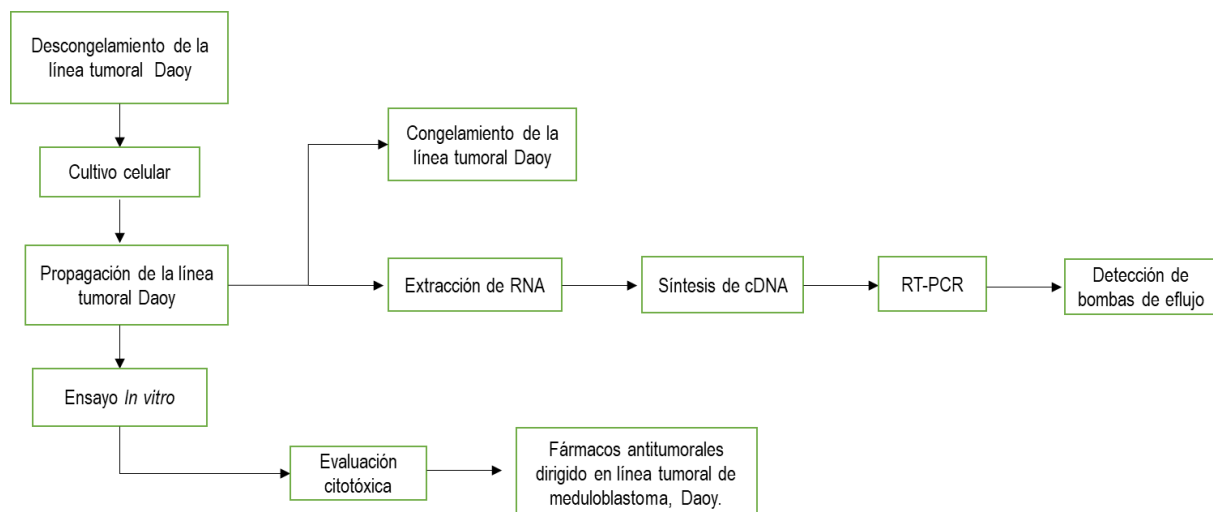


Figura 9. Estrategia metodológica. El siguiente esquema muestra el desarrollo de la estrategia en el desarrollo del proyecto de investigación, el cual se divide en tres objetivos concretos: Cultivo celular, el cual abarca desde el descongelamiento de la línea celular Daoy, hasta la propagación de dicha línea, posteriormente la detección de bombas de flujo la cual engloba la extracción de RNA, la síntesis de cDNA y los PCRs y finalmente los ensayos *In vitro* los cuales comprenden la evaluación citotóxica con la utilización de los fármacos antitumorales dirigidos en la línea tumoral Daoy.

VII.1. CULTIVO CELULAR DE LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA DAOY

La línea celular tumoral de meduloblastoma, Daoy (HTB-186) con características que se pueden observar en la Tabla 4, fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC®). La línea tumoral se mantuvo en nitrógeno líquido hasta su uso, la cual se propagó a confluencia de 80-90% en cajas de 100 mm. Se preparó medio Daoy o DMEM-F12 sin hepes, suplementado con suero fetal bovino 10% (5 mL), antibiótico-antimicótico (Penicilina: 100 U/ μ l, estreptomina: 100 μ g/ μ l, fungizona: 0.25 μ g/MI), piruvato de sodio (500 ul) y glutamax (500 ul) (datos mostrados en el apéndice VII.3.1 Cultivo celular). Para el cultivo de la línea Daoy, primeramente, se aspiró el medio de las células inclinado las cajas y adicionándole 4 mL de medio de lavado (el cual solo contiene PBS) y agitando de manera oscilatoria. Este proceso se repitió dos veces y posteriormente para desprender las células adheridas en la monocapa de las cajas se le agregó 2 mL tripsina al 0.25 % y posteriormente las cajas fueron incubadas a una temperatura de 37 °C durante 5 minutos, una vez concluido el tiempo de incubación, se añadió 2 mL de medio de inactivación el cual contiene suero fetal bovino 10% (5 mL) y DMEM-F12 sin hepes (ya antes mencionado), se disgregaron los agregados, pasando 1 mL por micropipeta de 1000 μ l en 20 ocasiones e inclinando las cajas. El medio obtenido se colocó en los tubos Falcón de 15mL, que posteriormente se centrifugaron a 400 g (la fuerza centrífuga relativa, RCF) durante 5 minutos, y trascurrido el tiempo se sacaron los tubos de la centrifuga y se aspiraron las burbujas y el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla celular o pellet

en medio para Daoy, ya sea de 1 a 4 mL dependiendo del tamaño del pellet (siendo 1 mL un aproximado de 1 mm de pellet y 4 mL un aproximado de 1 cm de pellet) Para determinar el rendimiento celular, la viabilidad celular y el número de células para el subcultivo, las células se contaron en una cámara de Neubauer. Para esto, las células se propagaron con 500,000 células por caja y se incubaron a una temperatura de 37 °C y CO₂ al 5 %, hasta conseguir las condiciones necesarias para los lisados celulares mediante el método de trizol para obtención de su material genético.

Tabla 4. Características de la línea tumoral de meduloblastoma Daoy.

CARACTERISTICAS DE LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA DAOY	
Daoy (HTB-186)	
Marca	ATCC
Propiedades de crecimiento	Adherente
Tejido	Tumor en la fosa posterior del cerebelo
Enfermedad	Meduloblastoma cerebeloso desmoplásico
Morfología	Poligonal
Datos del paciente	Paciente de 4 años, masculino, caucásico
Derivación	Línea celular Daoy establecida en 1985 por P.F Jacobsen del Royal Perth Hospital en Australia Occidental La línea se derivó de material de biopsia extraído de un tumor en la fosa posterior de un niño de 4 años
Tumorigénico	Sí
Tiempo de duplicación de la población	Aproximadamente 34 horas

VII.2. LISIS CELULAR DE LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA DAOY POR EL MÉTODO DE TRIZOL

Una vez obtenido los resultados del conteo celular del cultivo correspondiente y las condiciones necesarias (rendimiento celular, viabilidad celular y el número de células) se procedió a realizar la lisis de las mismas, para ello se agregó 1 mL de Trizol por cada 5x10⁶ células en un tubo 1.5 mL el cual se homogenizó a máxima velocidad con ayuda del Vortex durante 1 minuto o hasta no observar grumos celulares en la solución. Las células lisadas se preservaron a -20 °C por 24 horas y posteriormente se guardaron a -80 °C hasta por 2 meses (más tiempo se compromete la integridad del RNA y el trizol se empieza a evaporar).

VII.3. EXTRACCIÓN DE RNA Y SÍNTESIS DE cDNA

Una vez obtenidas las células lisadas en la solución de trizol se realizó la extracción del ARN total. Para esto, primero las células se descongelaron en hielo. Se homogenizo con la ayuda del Vortex a máxima velocidad por 1 minuto, enseguida se le adiciono 200 µl de cloroformo y se homogenizó por inversión durante 15 segundos, se dejó reposar la mezcla por 3 minutos a temperatura ambiente y posteriormente, se centrifugó a 12 000 g por 15 minutos a 4 °C y tras la centrifugación, se transfirió la fase acuosa que contiene el ARN a un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL, aproximadamente 500µl; se adicionó 500 µl de isopropanol a 25° C para precipitar el ARN y se incubaron a -25 °C por 10 minutos, posteriormente se centrifugó a 12 000 g por 10 minutos y al termino de ese tiempo se descartó el sobrenadante por decantación y para eliminar el exceso de sobrenadante de la boquilla del tubo, se colocó de forma invertida sobre el papel absorbente. Posteriormente se agregó 1.4 mL de etanol 75 % frio (-20°C) y se homogenizo en vórtex por 1 minuto a máxima velocidad. Se centrifugó por 5 minutos a 7 500 g a 4 °C y se desechó el sobrenadante colocándolo de forma invertida, se colocó un parafilm en la boquilla del tubo con perforaciones hechas con aguja para dejar secar la pastilla de ARN por 5 minutos a 37 °C en el horno de secado para eliminar los restos de EtOH presente. Se retiró el papel parafilm y se agregó 85 µl de agua inyectable, se homogenizo en vórtex durante 30 segundos a máxima velocidad, se centrifugo en la minicentrifuga por 15 segundos y se incubaron los tubos durante 10 minutos en baño seco a 60 °C y finalmente se colocaron los tubos en hielo por 3 minutos y se centrifugaron en la minicentrifuga 15 segundos. Una vez obtenido el material genético, se determinó el rendimiento mediante espectrofotometría (relación de absorbancia 280/260 y 260/230) e integridad del ARNm (gel de agarosa).

El ARN total, previamente descrito en este protocolo se utilizó para realizar la síntesis de cDNA, utilizando la enzima transcriptasa reversa MLV. Rutinariamente 3 µl de la reacción de cDNA se utilizaron en la reacción de PCR el cual contenia TAq DNA polimerasa 2.5 U, deoxinucleótidos 5'-trifosfatos 200 mM, MgCl₂ 2.5 Mm, amortiguador proporcionado (Buffer RT) y los iniciadores, todas las reacciones se realizaron en un termociclador de gradiente (Arktik™). Los protocolos de PCR son específicos para cada gen blanco como se describe en el siguiente apartado en el cual se emplearon secuencias específicas (tabla 5) para los genes ABCC2 y ABCG2 (bombas de eflujo) (Esquivel-Estudillo, 2017). Los productos de amplificación se analizaron mediante electroforesis, en gel de agarosa con una concentración de 2% a un voltaje de 220 V y 140 amp.

Tabla 5. Oligonucleótidos. Secuencias de los transportadores ABC2 y ABCG2.

Oligonucleótidos	Secuencia
ABCC2-Human Forward	TGGGCTGATATCCAGTGTGGAAGAG
ABCC2-Human Reverse	CATTGGACCTAGAACTGCGGCTAAG
ABCG2-Human Forward	GCAGCTCTTCGGCTTGCAACAATA
ABCG2-Human Reverse	GAGTTCCAACCTTGGAGTCTGCCACTT

VII.4. AMPLIFICACIÓN DE DNA MEDIANTE REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA CON REVERSO TRANSCRIPCIÓN (RT-PCR)

Además de conocer la cantidad y calidad del ARN total por espectrofotometría, es importante conocer si está integro dicho de otra forma que las bandas no se encuentren degradadas, para descartar posibles degradaciones del ARN visualizando los ARN ribosomales 28s y 18s en una relación 2:1. La integridad del ARN se realizó para evaluar la calidad del ARN, mediante pruebas de pureza, evaluando las posibles contaminaciones con ADN genómico mediante electroforesis en gel de agarosa en una concentración de 2 % y para su verificación se realizaron reacciones de PCR, utilizando la amplificación de un gen constitutivo (GAPDH), el cual se llevó a cabo con el protocolo de 95 °C 1 min, 62 °C 1 min, 72 °C 1 min, de 30 a 40 ciclos y finalmente el PCR se termina con 10 min a 72 °C.

Una vez purificado, cuantificado y analizado mediante electroforesis, una parte de la muestra se puede almacenar a 4 °C para los análisis inmediatos y el material restante se guarda a -80 °C, para una preservación por un año (Esquivel-Estudillo, 2017).

VII.5. ESTUDIO DE CITOTOXICIDAD

Las células previamente subcultivadas en cajas de 100 mm se sembraron en placas de 96 pozos con un volumen de 200 µl de medio, (2 000 células por pozo), con los fármacos vincristina, ciclofosfamida y etopósido, los cuales contaron con distintos períodos de incubación de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168 y 192 h a 37° C, 5 % CO₂. Brevemente, se realizaron lavados de PBS con 100 µl por cada pozo, posteriormente se desechó únicamente el PBS colocándolo en los pozos sin absorber las células de la monocapa, posteriormente se preparó la solución de calceína mediante el kit de viabilidad, a la cual se le colocó 10 mL de PBS y 25 µl del kit de viabilidad el cual contenía la calceína, la solución se homogenizó por rotación, girando los tubos a 180° e inmediatamente se le colocó 100 µl a cada pozo, los cuales se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente en una hielera oscura. Transcurrido este tiempo la densidad óptica se leyó en un lector de placa de 96 pozos a una longitud de onda de 492 nm.

Finalmente se determinó la selectividad citotóxica de vincristina, ciclofosfamida y etopósido, realizando gráficas y formulas empleadas en el programa Excel para una mejor visualización de los datos obtenidos.

VIII. RESULTADOS

VIII.1. PROMEDIO DE CRECIMIENTO DE LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA

Con el objetivo de establecer las condiciones óptimas para el crecimiento de la línea tumoral Daoy para la obtención de RNA para realizar los ensayos correspondientes, se procedió a descongelar y propagar la línea tumoral Daoy de meduloblastoma (HTB-186). El descongelamiento se realizó con un pase 4 y se

propagó hasta por 29 pases en un total de 90 días (Figura 10) y se notó que a lo largo del mismo se mantiene su morfología adherente de tipo poligonal.

Durante el cultivo se llevó a cabo un registro fotográfico desde el pase 4 hasta el pase 33 en que se realizó cultivo celular, por medio de un equipo de microscopía de contraste de fases, el cual nos permitió tener registro de las diversas morfologías y características de las líneas celulares. De igual manera se contó con un registro de los días *in vitro* y conteo celular entre cada pase para poder determinar el rendimiento celular, la viabilidad celular, el número de divisiones y horas por divisiones.

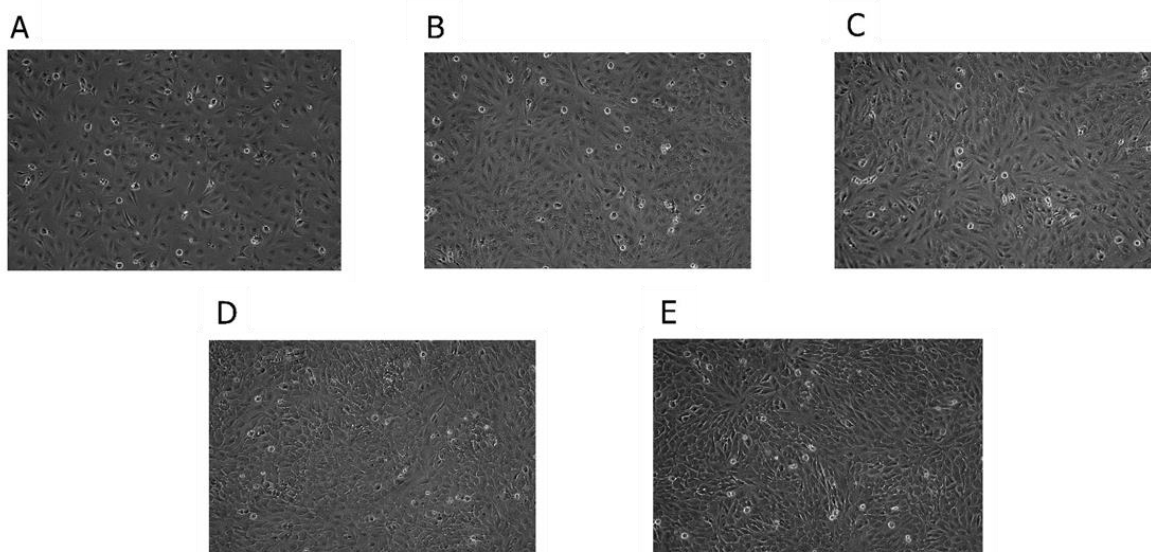


Figura 10. Cinética de crecimiento del cultivo celular de la línea tumoral de Daoy de meduloblastoma, fotos 10x. Las células de meduloblastoma fueron cultivadas en medio DMEM- F12 suplementado con suero fetal bovino (datos mostrados en el apéndice VII). Cultivo celular de la línea tumoral de meduloblastoma, Daoy a 37°C y 5% CO₂. En el panel A se muestra el crecimiento de cultivo de la línea celular de meduloblastoma un día después del descongelamiento (P4). En el panel B se muestra un crecimiento de células en los primeros pases (P7) presentando una morfología con aspecto estrellado, multinucleada y células en suspensión. Mientras que en los paneles C y D se muestra un crecimiento de células con morfología poligonal con núcleos redondos, citoplasma grande y células en suspensión (P12 y P14). Sin embargo, a partir de los pases finales hasta el pase 33, el cultivo es homogéneo creciendo sólo con morfología poligonal con núcleos prominentes y múltiples nucléolos (Panel E).

VIII.1.1. RENDIMIENTO CELULAR

Para determinar la capacidad de crecimiento de la línea tumoral Daoy, como primer paso se calculó el rendimiento celular. Es decir, del conteo realizado de células vivas multiplicado por 20,000 y por el volumen en el cual se encontraban resuspendidas las células, dividido entre 5 (número de cuadrantes de la cámara

Neubauer). En la Figura 11, se muestra que el rendimiento promedio fue de $2.62E+06$ células en un total de 29 pases (Figura.11), siendo el pase 8 el que mostró menor rendimiento con $2.01E+06$ células y el pase 14 el de mayor rendimiento con $3.73E+06$ células (Figura.11).

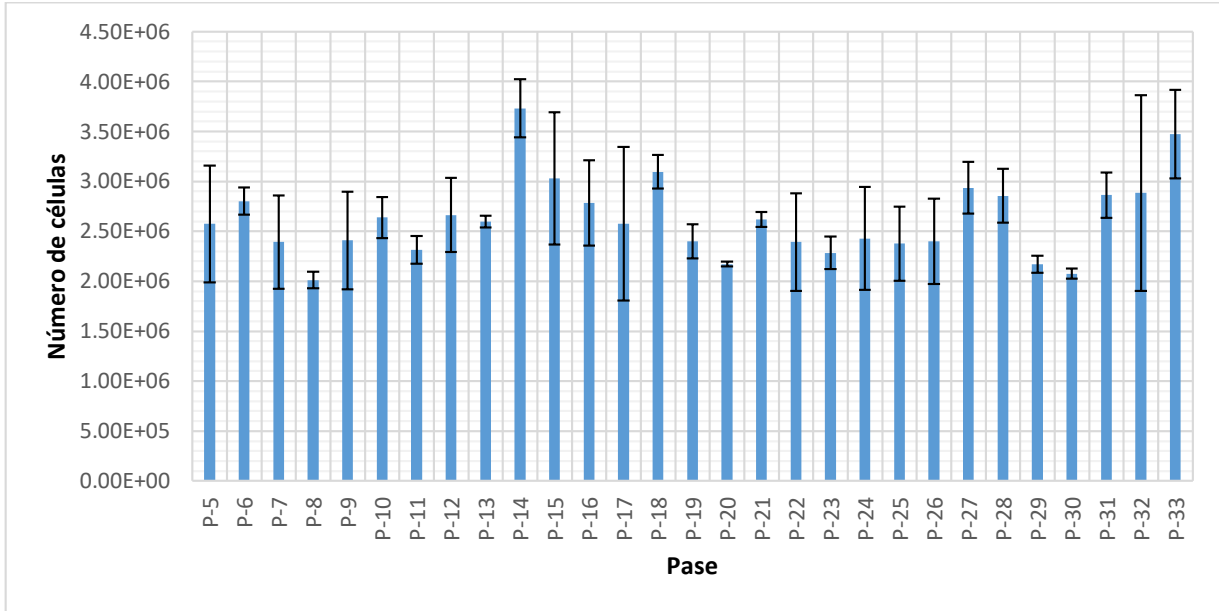


Figura 11. Rendimiento celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Rendimiento celular de los 33 pases de un cultivo de la línea tumoral Daoy propagados con medio DMEM- F12 suplementado con suero fetal bovino. Se muestra las barras del rendimiento que representan el número de células cultivadas por pase, así mismo se muestran los valores en notación científica, indicativo de millones de poblaciones celulares. Promedio +/- DS

VIII.1.2. VIABILIDAD

Con la finalidad de conocer si existe un efecto negativo en el protocolo de cultivo celular sobre la sobrevivencia de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma, se calculó el porcentaje de viabilidad. La viabilidad en el cultivo se calculó de acuerdo con el rendimiento celular obtenido, el cual se obtiene del conteo de células vivas y de células muertas en cada uno de los subcultivos. Teniendo un promedio de viabilidad de 97.26% en un total de 29 pases (Figura 13). Esto sugiere que el procedimiento de cultivo no afecta la sobrevivencia de las células tumorales.

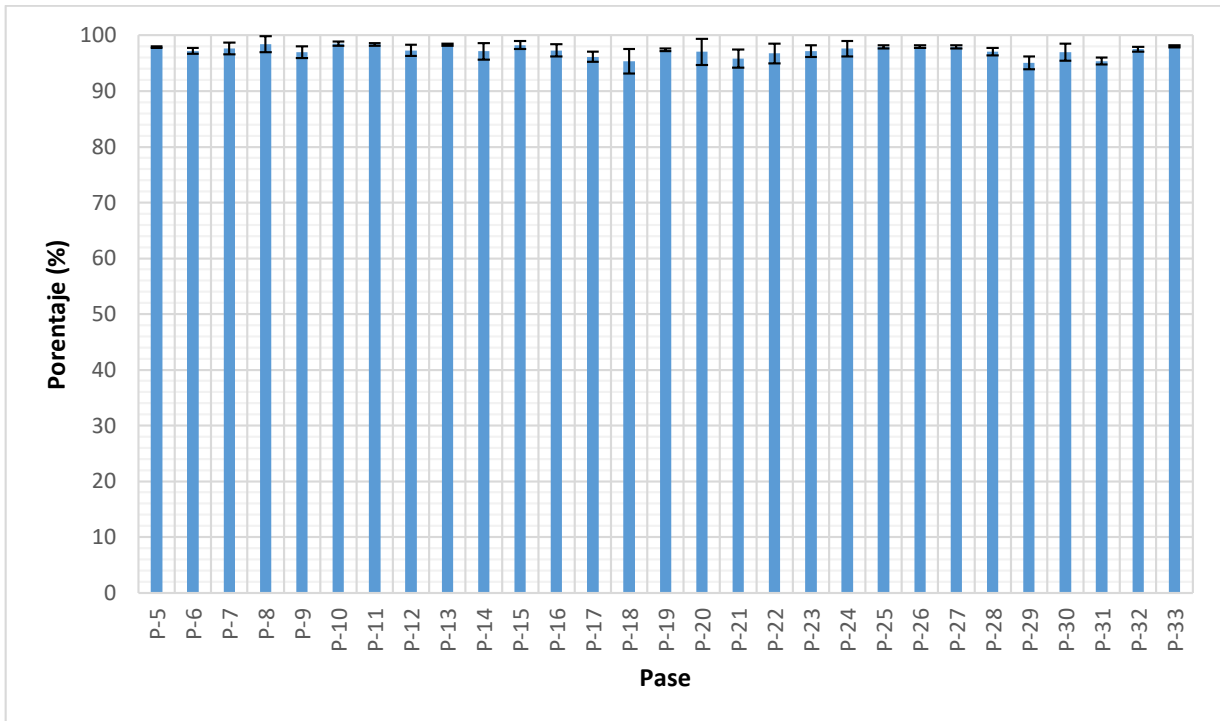


Figura 12. Viabilidad celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Se muestra las barras del porcentaje de viabilidad de los 33 pases de un cultivo de la línea tumoral Daoy propagados con medio DMEM- F12 suplementado con suero fetal bovino. Cada barra representa el número de células cultivadas por pase. Nótese que la desviación estándar es mínima en cada barra de datos. Promedio +/- DS.

VIII.1.3. NÚMERO DE DIVISIONES Y HORAS POR DIVISIÓN

El número de divisiones en el cultivo de la línea tumoral Daoy, se evalúa por medio del logaritmo base dos de la duplicación celular.

Por otra parte, la cantidad de horas por división es un dato que se calcula sumando la cantidad de horas que se tarda un cultivo en estar a una confluencia celular (80%-90%) para poder ser subcultivadas. Las horas por división muestran un valor en promedio de 31.40 horas (Figura 14), los resultados son semejantes a los comparados con lo ya establecido por la ATCC (American Type Culture Collection) que son 34 horas, con lo que se puede concluir que los cultivos celulares se encuentran en óptimas condiciones. Es importante hacer la observación que las células inicialmente se adaptaron al medio de cultivo por lo que su número de división y horas de replicación es homogéneo.

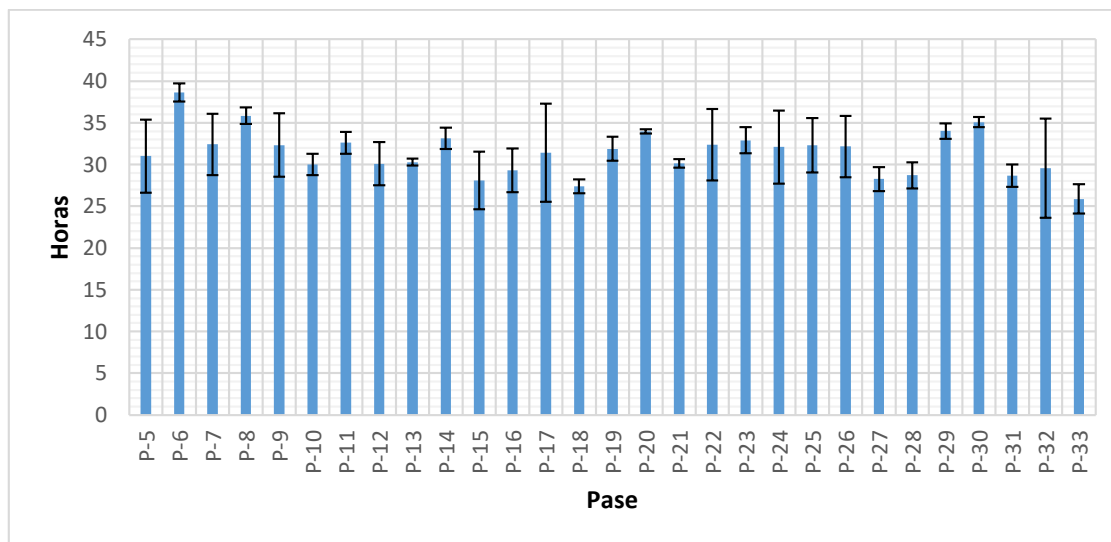


Figura 13. Horas por división celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Se muestra las barras del número de divisiones de los 33 pases de un cultivo de la línea tumoral Daoy, propagados con medio DMEM- F12 suplementado con suero fetal bovino (datos mostrados en el apéndice VII). Cada barra representa el número de células cultivadas por pase. Podemos notar que el doblaje se mantiene prácticamente constante en el cultivo de Daoy. El número de divisiones se obtiene aplicando logaritmo base 2 del número de doblaje o duplicación celular. Promedio +/- DS.

VIII.2. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL RNA TOTAL EN MUESTRAS DE LA LINEA TUMORAL DAOY

Una vez establecidas las condiciones de crecimiento de la línea tumoral Daoy, se obtuvo el material genético con el objetivo de realizar la posterior detección de la presencia de las bombas de eflujo ABCG2 Y ABCG2, al cual se le determinó el rendimiento mediante espectrofotometría (relación de absorbancia 280/260 y 260/230) como se muestra en la tabla 6, cabe señalar que la muestra A549 ya se encontraba con una extracción posterior por estudiantes del laboratorio sin embargo no se contaba con el número de pase de dicha línea. Se determinaron las concentraciones de las muestras de RNA mediante cuantificaciones observándose una pureza del RNA, de compuestos aromáticos, sales, carbohidratos y fenoles y concluyendo que dichas muestras no presentaban contaminación. Posteriormente se evaluó la calidad del ARN, mediante pruebas de pureza, evaluando la posible contaminación con ADN genómico mediante un PCR (Figura 14), ocupando un marcador de 2,500 a 50 pb, se empleó la detección el gen GAPDH (307 pb) y como control positivo la línea THP-1 (neuroblastoma). Los resultados de la electroforesis arrojaron resultados favorables, ya que no se encontraron contaminaciones por DNA genómico y se amplificó el gen GAPDH en todos los ciclos del control positivo que corresponde al tamaño esperado, la siguiente prueba que se realizó corresponde a la integridad del ARN, en la cual al observar no se constató ninguna degradación de RNA ya que se encuentra intacta la banda en el gel y se visualizaron los RNA ribosomales 28s y 18s en una relación 2:1 (Figura 15).

Por lo que se prosiguió a realizar las diluciones correspondientes para la síntesis de cDNA, estableciéndose una concentración final de 1 ug/μl de RNA para ser usado.

Tabla 6. Cuantificaciones de RNA sin diluir, de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma

Muestra	Pase	Concentración	A260/A230	A260/A280
1.- Daoy	P13	2.3025 ug/μl	1.786	1.769
2.- Daoy	P13	2.03 ug/μl	1.997	1.838
3.- A549	-----	0.6526 ug/μl	2.346	1.855

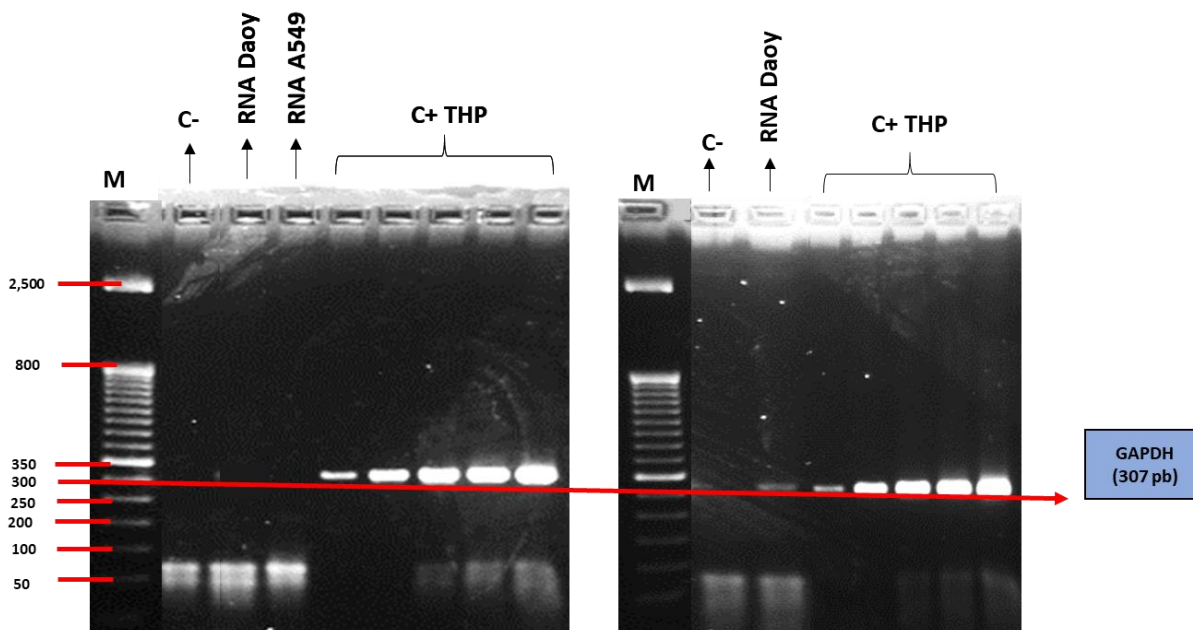


Figura 14. Electroforesis de evaluación de RNA por PCR con GAPDH para evaluar las muestras de RNA. Evaluación de la calidad del RNA obtenido de la extracción del cultivo de Daoy. Para evaluar la contaminación del ARN con ADN genómico se empleó la detección el gen GAPDH (307 pb), así mismo un marcador de 2,500 a 50 pb, en un gel de agarosa al 2.0% y se reveló mediante un transiluminador. En el gel del lado izquierdo de pueden observar la muestra Daoy-1 del pase 13 y la muestra A549 mientras que en el gel del lado derecho se observa la muestra Daoy-2 del pase 13, en ambos geles se puede observar que la calidad es óptima ya que se amplifica desde el ciclo 20 hasta el ciclo 40 de manera ascendente. En ambos casos se colocó control negativo que fue, H2O milli-Q, como control positivo fue THP.

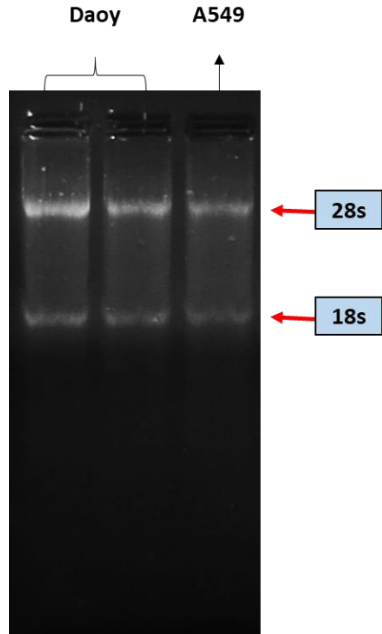


Figura 15. Electroforesis de integridad de RNA. Fotografía del gel de integridad de ARN el cual fue realizado con agarosa y buffer de carga específico para ARN. El RNA fue extraído de diferentes pases de los cultivos de Daoy y A549. Se observan los ARN ribosomales en una relación 2:1 de 28s y 18s; no existe degradación del ARN.

VIII.2.1. EVALUACIÓN DE LA CALIDAD DEL cDNA DE LAS MUESTRAS DE LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA

El procedimiento se realizó de manera continua a las anteriores diluciones del RNA molde para la síntesis de cDNA. Por lo que primeramente se llevó a cabo un mix para la preparación de reactivos ocupando muestras de la línea tumoral Daoy, A549 y SH-SY5Y. Al sobrenadante de la mezcla se le adicionó H₂O Milli-Q filtrada, la cual se utilizó como control negativo para la reacción de cDNA.

Para la evaluación se realizó un RT-PCR por ciclos de 20 al 40 y se observó la amplificación del gen constitutivo (GAPDH) como se muestra en la figura 16. Los cDNAs evaluados muestran buena calidad ya que se puede observar una amplificación en aumento entre cada ciclo evaluado por lo que se decidió utilizar dichos cDNAs para la evaluación de la expresión de los transportadores ABC ya antes mencionados.

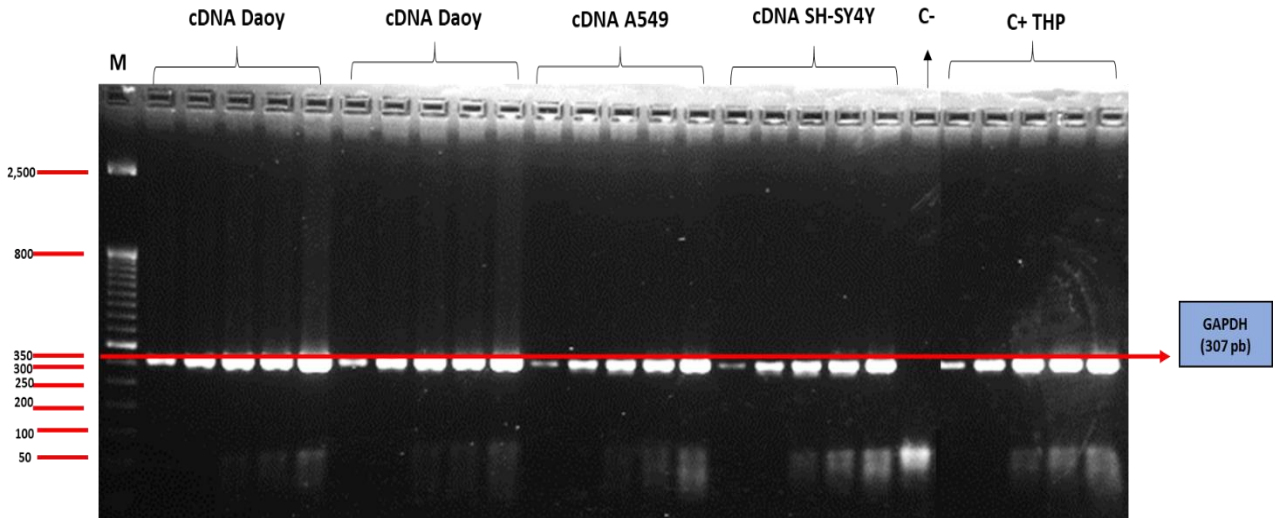


Figura 16. Evaluación de la calidad del cDNA de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Fotografía del gel de la evaluación de la calidad del cDNA de los productos del PCR de GAPDH de Daoy y A549, en el cual se muestran las bandas correspondientes a la curva de ciclos (20-40). Se colocó un control negativo del cDNA y un control positivo el cual fue nuevamente THP. Los cDNAs evaluados muestran una buena cantidad y calidad ya que se puede observar la amplificación de GAPDH en todos los pozos con un aumento paulatino entre cada ciclo.

VIII.2.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA RT-PCR PARA LA DETECCIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCC2 Y ABCG2 EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA

Una de las metas del proyecto fue conocer si los transportadores propuestos, ABCC2 y ABCG2, se expresaban en la línea celular Daoy de meduloblastoma. Para confirmar la expresión de dichos transportadores ABC utilizando la técnica de RT-PCR por ciclos, se realizó una evaluación de la concentración $MgCl_2$ y la temperatura en la etapa de apareamiento, para determinar las condiciones en las cuales se obtiene una amplificación óptima del producto.

Se realizaron dos curvas, una curva de temperaturas de la etapa de apareamiento (62, 64, 66 y 68 grados Celsius) y una curva de concentraciones sin $MgCl_2$ (0 mM adicional, 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM y 2 mM) para determinar las condiciones en las cuales se obtiene una amplificación óptima del producto. En las figuras 16 y 17 se muestra la evaluación de ambas condiciones para detectar ABCC2 y ABCG2.

Una vez evaluado el producto de amplificación del ciclo 20, 25, 30, 35 y 40, se puede observar en las figuras 16 y 17 que, en ambos casos en la condición sin $MgCl_2$ (0 mM adicional) a 62°C, el producto se comienza a ver en el ciclo 20 y su amplificación se va incrementando conforme pasan los ciclos (Figura 17 y 18). Por lo que se determinó que para ambos transportadores se utilizaría la condición sin $MgCl_2$ (0 mM adicional) y una temperatura en la etapa de apareamiento a 66°C, puesto que mostró mayor intensidad en la banda y menor cantidad de artefactos (Tabla 7).

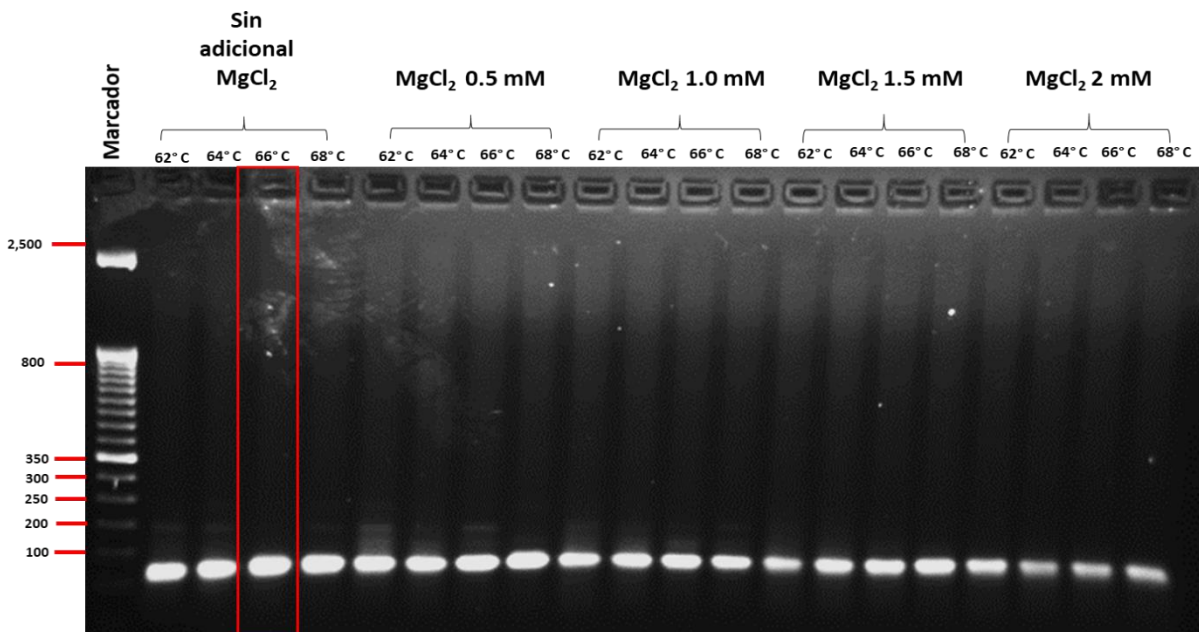


Figura 17. Curva de concentración para la estandarización de la amplificación del transportador **ABCC2**. Selección de condiciones mediante una curva de concentración de $MgCl_2$ y temperatura para la detección del transportador **ABCC2**. Se evaluaron 5 concentraciones de $MgCl_2$ partiendo de 0-2 mM, y 4 temperaturas de 62-68°C (20 condiciones diferentes). En el tercer carril se muestra que la concentración de 0 Mm (adicional) de $MgCl_2$ a 66° C, muestran mayor grosor en la banda y menor cantidad de artefactos.

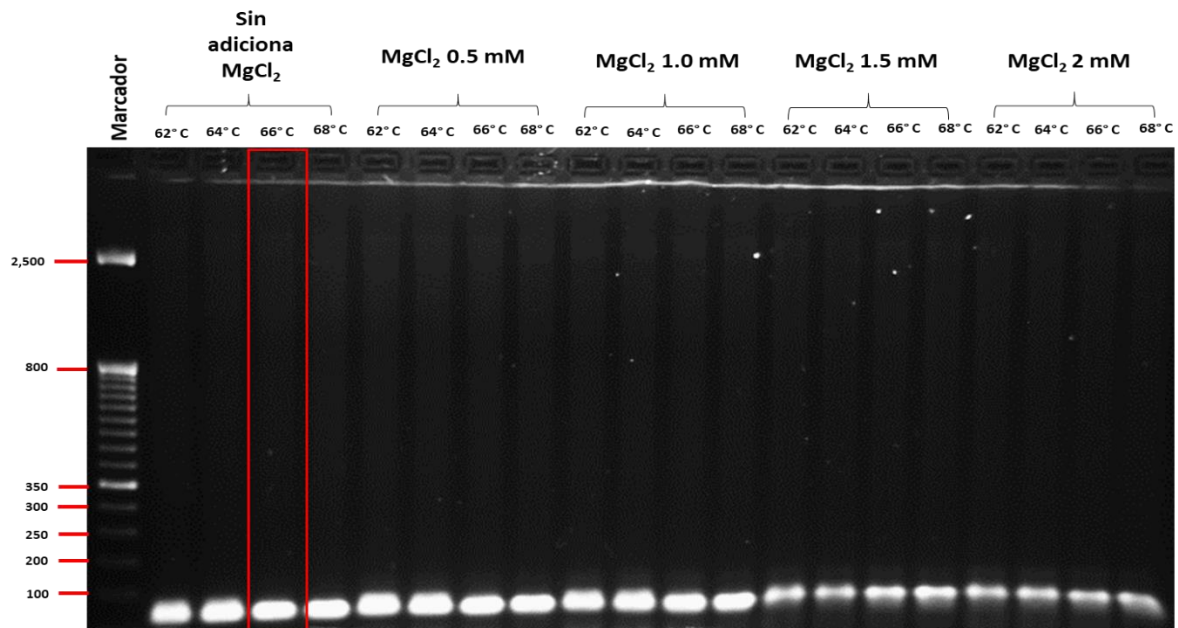


Figura 18. Curva de concentración para la estandarización de la amplificación del transportador **ABCG2**. Selección de condiciones mediante una curva de concentración de $MgCl_2$ y temperatura para la detección del transportador **ABCG2**. Se evaluaron 5 concentraciones de $MgCl_2$ partiendo de 0-2 mM, y 4

temperaturas de 62-68°C (20 condiciones diferentes). En el tercer carril se observa que la concentración de 0 Mm (adicional) de MgCl₂ a 66° C, muestran mayor grosor en la banda y menor cantidad de artefactos.

VIII.2.3. EVALUACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS TRANSPORTADORES ABCC2 Y ABCG2 EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA

Para determinar si la expresión del mRNA del transportador ABCC2 y ABCG2 se encontraba en la línea de meduloblastoma Daoy, se llevó a cabo un RT-PCR con los transportadores ya antes mencionados previamente estandarizados. Los oligonucleótidos requeridos para este proyecto ya estaban previamente diseñados por lo que solo se hicieron diluciones (Tabla 8). Cabe destacar que lo oligonucleótidos están diseñados para q-PCR. Así mismo los cDNAs SH-SY5Y y THP-1 ya estaban previamente realizados por miembros del laboratorio.

Como control positivo del transportador ABCC2 se ocupó la línea control A549 (Cáncer de pulmón) y como control negativo se empleó el sobrenadante del cDNA de Daoy (Figura 19). Para el transportador ABCG2 como control positivo se ocupó la línea control SH-SY5Y (Glioblastoma) de igual manera como control negativo se empleó el sobrenadante del cDNA de Daoy (Figura 20).

Tabla 7. Oligonucleótidos. Secuencias de los transportadores ABC2 y ABCG2.

Oligonucleótidos	Secuencia
ABCC2-Human Forward	TGGGCTGATATCCAGTGTGGAAGAG
ABCC2-Human Reverse	CATTGGACCTAGAACTGCGGCTAAG
ABCG2-Human Forward	GCAGCTCTTCGGCTTGCAACAACTA
ABCG2-Human Reverse	GAGTTCCAACCTTGGAGTCTGCCACTT

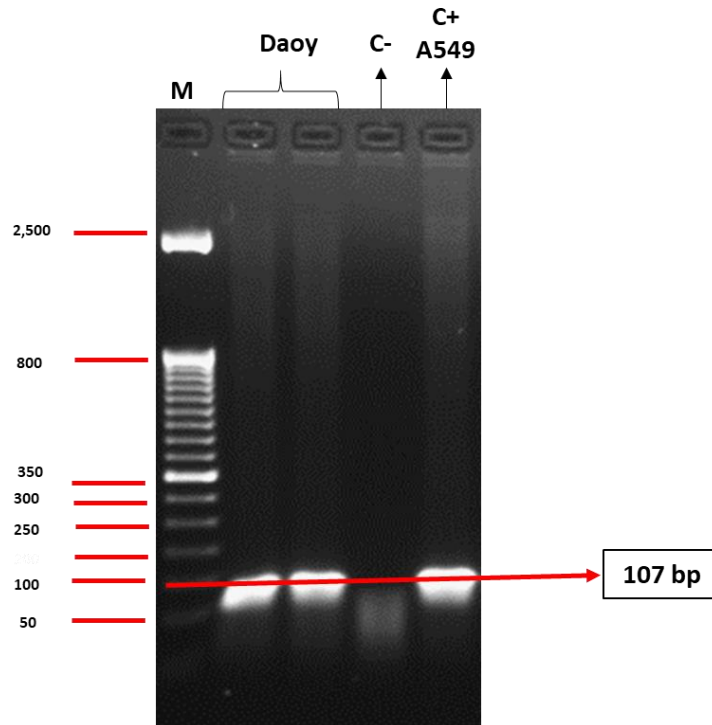


Figura 19. Electroforesis de la amplificación del transportador ABCC2 por RT-PCR. Fotografía del gel de la evaluación de la expresión del transportador ABCC2 en Daoy mediante un RT-PCR punto final. En el experimento se incluyó un control negativo el cual era el sobrenadante de cDNA y un control positivo establecido en la estandarización (A549). El producto obtenido de la amplificación por PCR equivale al esperado de ABCC2 (107 bp).

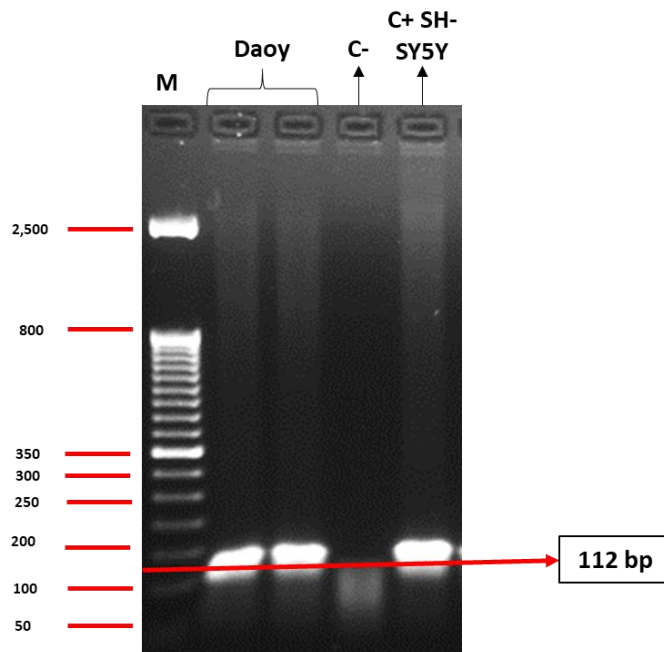


Figura 20. Electroforesis de la amplificación del transportador ABCG2 por RT-PCR. Fotografía del gel de la evaluación de la expresión del transportador ABCG2 en Daoy mediante un RT-PCR punto final. En el experimento se incluyó un control negativo el cual era el sobrenadante de cDNA y un control positivo establecido en la estandarización (SY5Y). El producto obtenido de la amplificación por PCR equivale al esperado de ABCC2 (112 bp).

Los productos obtenidos de la amplificación por PCR equivalen a los esperados de dichos genes siendo el caso para ABCC2 un tamaño de 107 bp mientras que para ABCG2 un tamaño de 112 bp, demostrándose que en la línea celular Daoy de meduloblastoma existe expresión de los transportadores ABCC2 y ABCG2. Tomando en cuenta que dichos genes de las bombas de eflujo se encuentran presente en Daoy se puede correlacionar dicha información con lo ya reportado lo que llevaría a un aumento de la resistencia en tratamientos de quimioterapia y radioterapia como se ha visto en distintos transportadores ABC en múltiples tejidos, incluido el sistema nervioso central (SNC).

VIII.3. ESTANDARIZACIÓN DE CRECIMIENTO CELULAR PARA ESTUDIO CITOTÓXICO EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA

A la par de que se hacía el promedio de crecimiento en el cultivo de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma, se realizó una estandarización para las condiciones del estudio citotóxico. Por lo que se tomó parte de las células del subcultivo del pase 9 para sembrar dos placas de 96 pozos, en la cual se calculó el volumen de medio por área cuadrada y el total de células por pozo como se muestra en la Tabla 9. Las células que se sembraron se colocaron en el carril B2 al F2 en ambas cajas y a los extremos de los pozos se le adicionó agua, esto en ambas cajas (Figura 15). Las placas de 96 pozos se dejaron un total de 96 horas dejando crecer las células hasta obtener una saturación en su crecimiento exponencial y se contó con un registro fotográfico, como se muestra en la Figura 16 y 17.

Tabla 8. Resumen de medidas a tomar para sembrado de células en placa de 96 pozos.

Caja/Placa	Cantidad de células	Área cm ²	Volumen de medio
100 mm	500,000	55 cm ²	8 mL
96 pozos	2909.09	0.32 cm ²	.270 mL

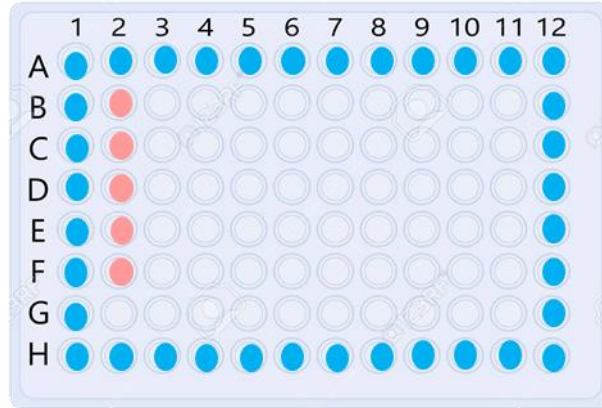


Figura 21. Diseño experimental de los estudios de toxicidad. Diagrama para la estandarización de crecimiento celular para estudio citotóxico en caja multipozo de 96 pozos. Del carril B2 al F2 se colocaron las células de la línea tumoral Daoy y a sus extremos se les colocó agua, se dejó un total de 96 horas hasta su saturación, obteniéndose un crecimiento exponencial.

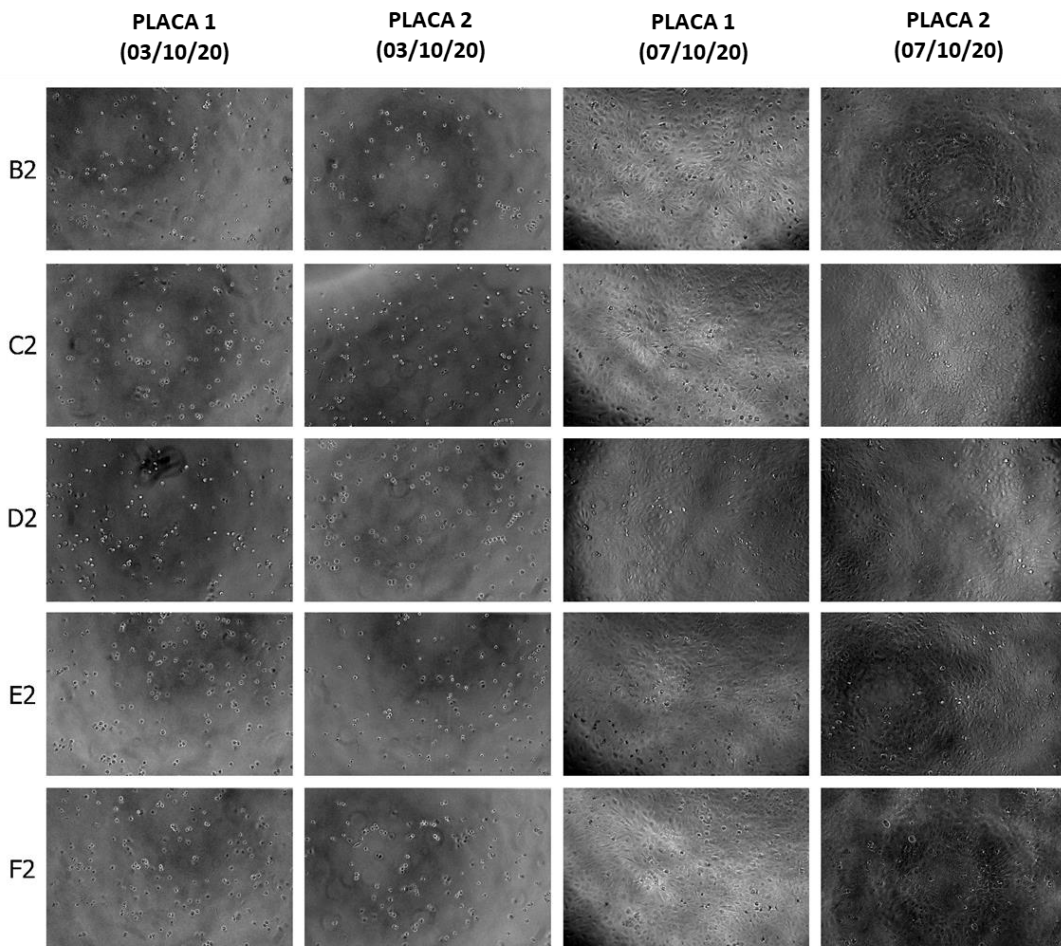


Figura 22. Registro fotográfico del cultivo de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma en placas de 96 pozos, fotos 10x. Fotografías correspondientes a la estandarización del crecimiento a Daoy de la placa multipozo de 96 pozos de 96 horas. En la columna marcada como placa 1 y 2 se muestra el subcultivo inicial del pase 9, mientras que en la columna marcada como placa 1 y 2 se muestra el crecimiento de las células con una saturación a los 4 días después de ser subcultivadas. Las columnas marcadas como B2 al F2 corresponden al carril donde se colocaron las células de la línea tumoral Daoy. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo 10X, usando microscopía de contraste de fases.

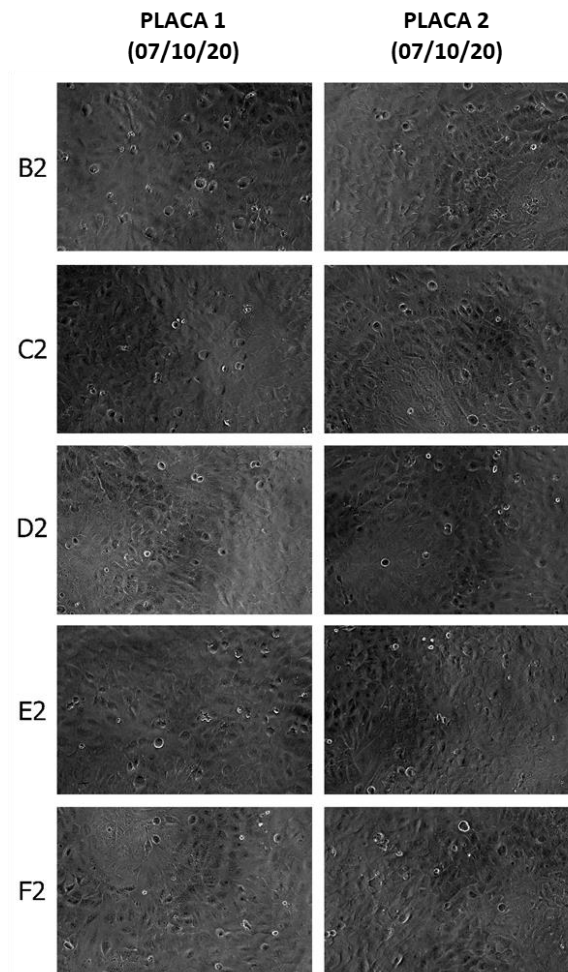


Figura 23. Registro fotográfico del cultivo de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma en placas de 96 pozos, fotos 20x. Fotografías correspondientes a la estandarización del crecimiento a Daoy de la placa multipozo de 96 pozos de 96 horas. Las columnas marcadas como B2 al F2 corresponden al carril donde se colocaron las células de la línea tumoral Daoy las cuales muestran una saturación a los 4 días después del subcultivo. Las fotografías fueron tomadas con el objetivo 20X, usando microscopía de contraste de fases.

VIII.3.1. ESTANDARIZACIÓN DE VIABILIDAD Y MUERTE CELULAR PARA ESTUDIO CITOTÓXICO EN LA LÍNEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA, DAOY.

Posteriormente a la estandarización de crecimiento celular, la cual se tomó en cuenta para establecer tiempos determinados sobre las células en la placa de 96 pozos antes de que estas lleguen a un estado de saturación, con el fin de poder montar una estandarización para el estudio citotóxico, en base a la viabilidad y la muerte celular. Por lo que se tomaron células de los subcultivos de la línea celular Daoy, las cuales se sembraron en dos placas de 96 pozos con paredes opacas, en la cual se calculó el volumen de células por pozo (32,000, 16,000, 8,000, 4,000 y 2,000 células), las cuales se colocaron del carril A1-5 al C1-5 en ambas cajas y a los extremos de los pozos se le adicionó PBS siendo este el blanco (Figura 18). Las placas de 96 pozos se dejaron un total de 24 horas para permitir su adherencia, posteriormente se aplicó el tratamiento para determinar su viabilidad y muerte celular.

Para el tratamiento de viabilidad se realizaron dos lavados con 100 μ l de PBS 1X, posteriormente se adiciono la solución que contenía calceína la cual se preparó mediante el kit, la cual contiene calceína y se dejó incubar por 30 minutos a temperatura ambiente en una hielera oscura. Transcurrido este tiempo la densidad óptica se determinó en un lector de placa de 96 pozos como se muestra en la Figura 19.

Para el tratamiento de muerte celular se realizó un lavado con 100 μ l de PBS 1X y posteriormente se colocó 30 μ l de PBS 1X con 70 μ l de etanol puro a -20° C. El cual se dejó incubando por 20 minutos a -20° C. Pasado el tiempo se preparó la solución con el kit la cual contiene un homodímero de etidio. Transcurrido este tiempo la densidad óptica se determinó en un lector de placa de 96 pozos como se muestra en la figura 20.

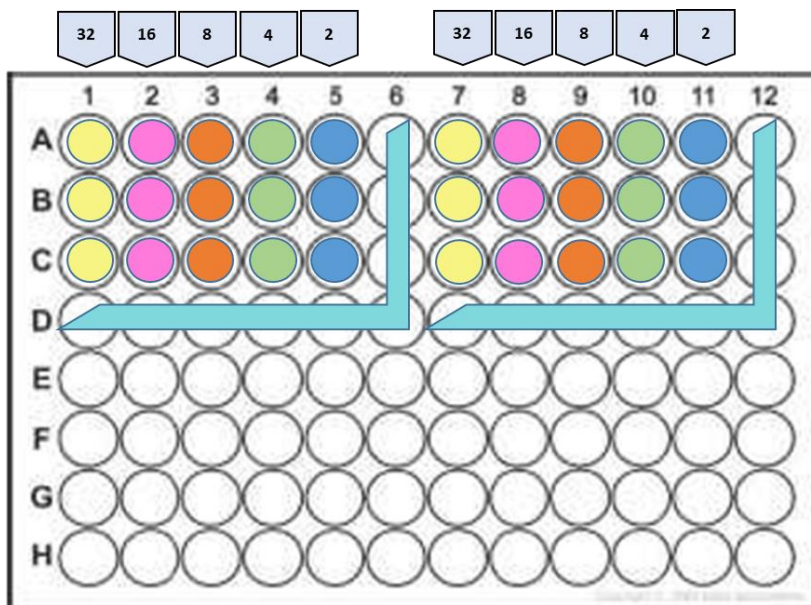


Figura 24. Diseño experimental para la estandarización de viabilidad y muerte celular en la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Diagrama para la estandarización de viabilidad y muerte celular para

el estudio citotóxico en Daoy. Del carril A1-5 al C1-5 se colocó células de la línea tumoral Daoy con medio base y a sus extremos se les colocó PBS. Cada carril contaba con una densidad diferente de células las cuales iban de 32,000 hasta 2,000 células por pozo también en ambas placas se contó con triplicados y réplicas de los triplicados, para la obtención de saturación celular en los pozos.

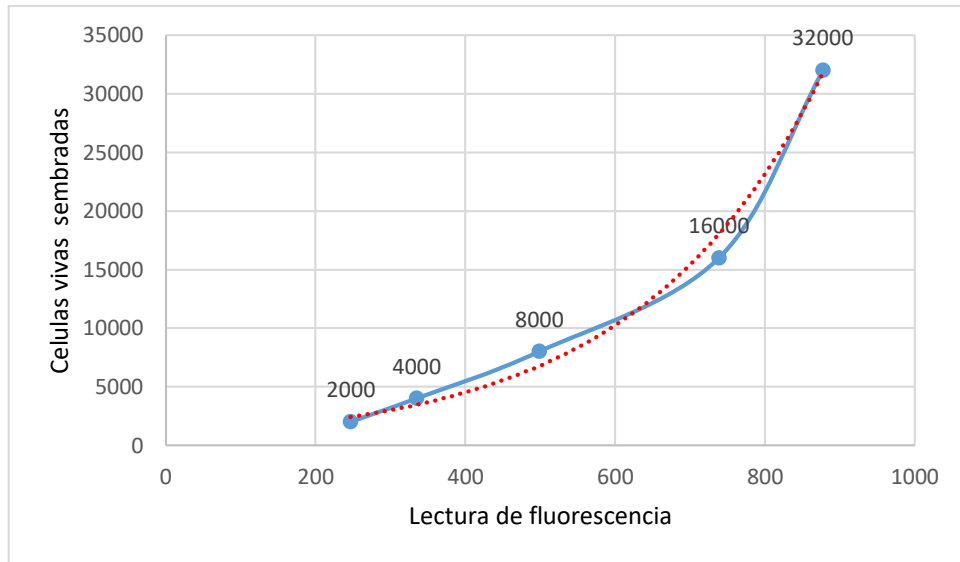


Figura 25. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Las células se sembraron en placas multipozo de 96 pozos las cuales se trataron con calceína para determinar su viabilidad. Cada punto representa el número de células sembradas por pozo en una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar una línea de tendencia lineal hasta 16,000 células y a partir de 32, 000 comienza una saturación celular en los pozos.

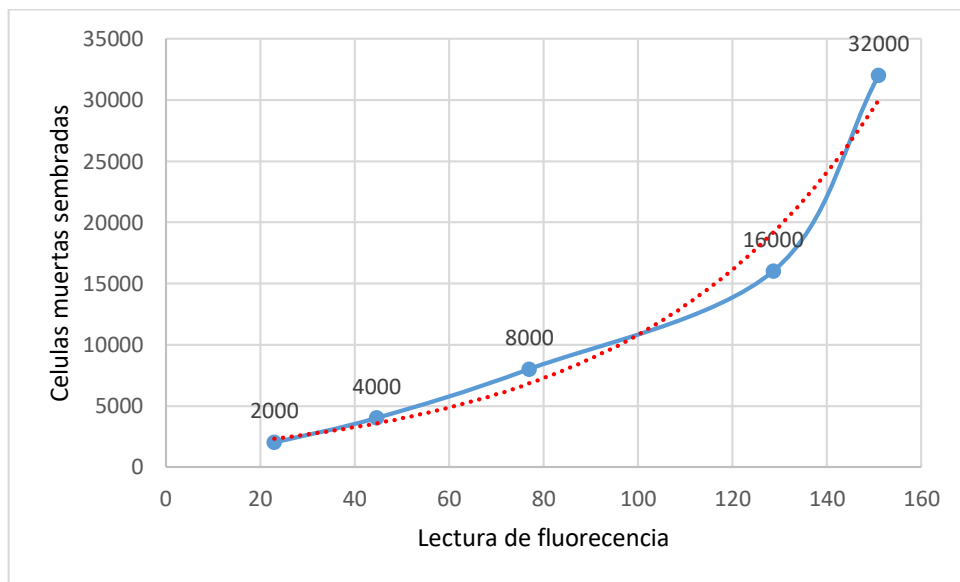


Figura 26. Muerte celular de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Las células se sembraron en placas multipozo de 96 pozos las cuales se trataron con etanol para determinar la muerte celular. Cada punto representa el número de células sembradas por pozo en una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar una línea de tendencia lineal hasta 16,000 células y a partir de 32, 000 comienza una saturación celular en los pozos.

Los resultados del análisis que se muestran en la Figura 25 (viabilidad), cada punto representa el número de células sembradas por pozo en una lectura de fluorescencia, donde se puede concluir que se muestra una línea de tendencia lineal hasta 16,000 células, a partir de 32, 000 comienza una saturación celular en los pozos. De igual forma, la figura 26 (muerte celular) se observa una línea de tendencia lineal hasta 16,000 células y a partir de 32,000 comienza una saturación celular en los pozos.

VIII.4. EVALUACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA

Una vez conociendo el número de saturación de las células en base a la viabilidad y muerte celular se procedió a realizar una evaluación para investigar el efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos los cuales fueron vincristina, etopósido y ciclofosfamida, utilizando cultivos de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Por lo que se determinó el volumen de medio por área cuadrada, así como el total de células por pozo (2,000 células por pozo). Posteriormente se realizaron cálculos tomando en cuenta, la masa molecular, IC50 de los fármacos ya antes mencionados y realizar sus correspondientes diluciones.

Se sembraron 2,000 células en 8 placas de 96 pozos con paredes opacas (cada placa representa 1 día), del carril B2 al B5 cada uno con 4 réplicas, donde la fila B2 es el control y las filas B3 a B5 son las células con los fármacos; a los extremos de los fármacos se le coloco PBS como blanco y en los bordes exteriores se adicione PBS para evitar la mayor evaporación posible (Figura 21).

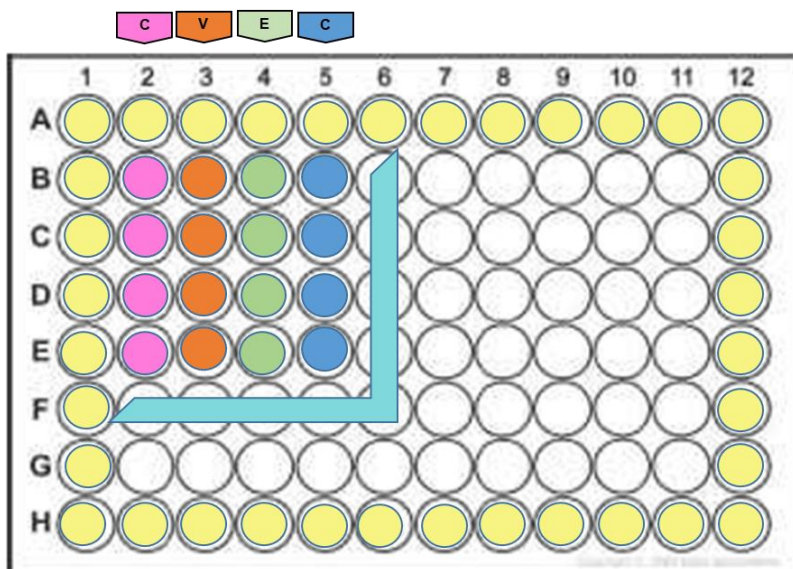


Figura 27. Diseño experimental para la evaluación de los fármacos antineoplásicos en la línea tumoral Daoy de meduloblastoma. Diagrama para la evaluación de los fármacos vincristina, etopósido y ciclofosfamida en Daoy. Del carril B2 al E2 se colocó el control el cual contenía células de la línea tumoral Daoy con medio base (DMEM-F12 sin hepes), en el carril B3 al E3 se colocó células de la línea tumoral Daoy con el fármaco vincristina, en el carril B4 al E4 se colocó células de la línea tumoral Daoy con el fármaco etopósido, en el carril B5 al E5 se colocó células de la línea tumoral Daoy con el fármaco ciclofosfamida y finalmente del carril B6 al F2-F6 se colocó PBS como blanco. A sus extremos se les colocó PBS para evitar la mayor evaporación posible.

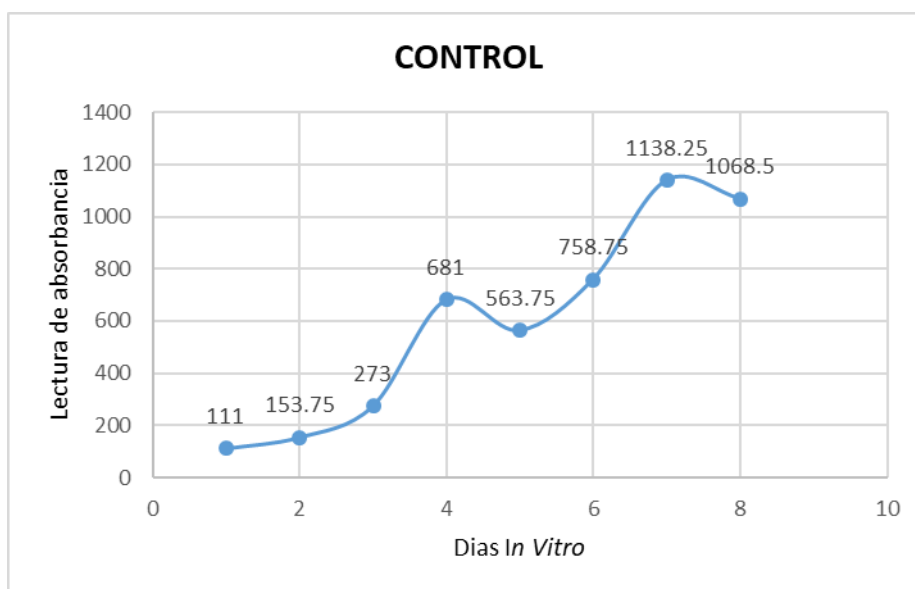


Figura 28. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma, control. Células sembradas sin fármacos antineoplásicos. La gráfica representa el número de células sembradas por placa

en 8 días *in vitro* mediante una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar como las células crecen sin ningún aditivo más que el medio base común.



Figura 29. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con el fármaco vincristina. Células sembradas tratadas con vincristina. La grafica representa el número de células sembradas por placa en 8 días *in vitro* mediante una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar el efecto de vincristina y su efecto dependiente en las células a la dosis administrada. En los cuales no se exhibe niveles de muerte celular sin embargo muestran un crecimiento al paso de los días.

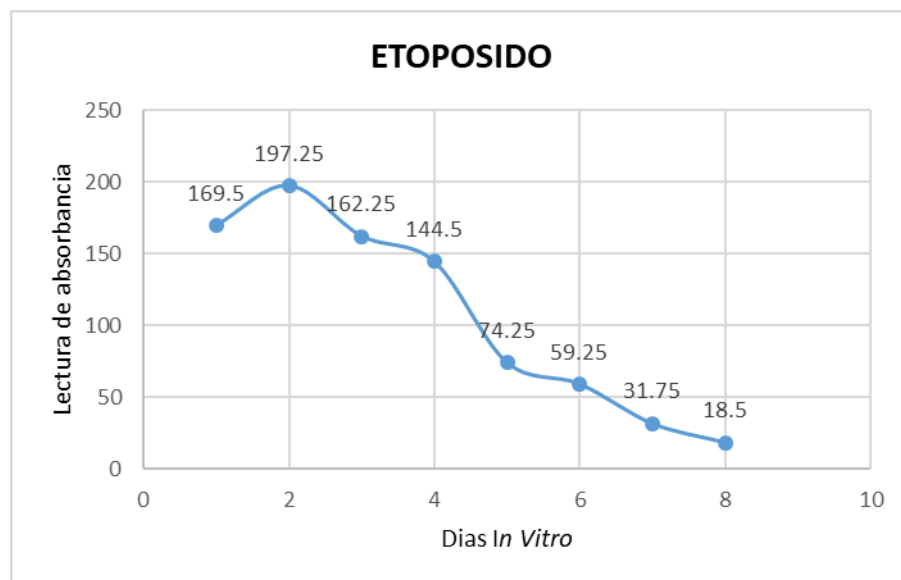


Figura 30. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con el fármaco etopósido. Células sembradas tratadas con etopósido. La gráfica representa el número de células

sembradas por placa en 8 días *in vitro* mediante una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar el efecto de etopósido y su efecto dependiente en las células a la dosis administrada. En los cuales se exhibe niveles de muerte celular al paso de los días.

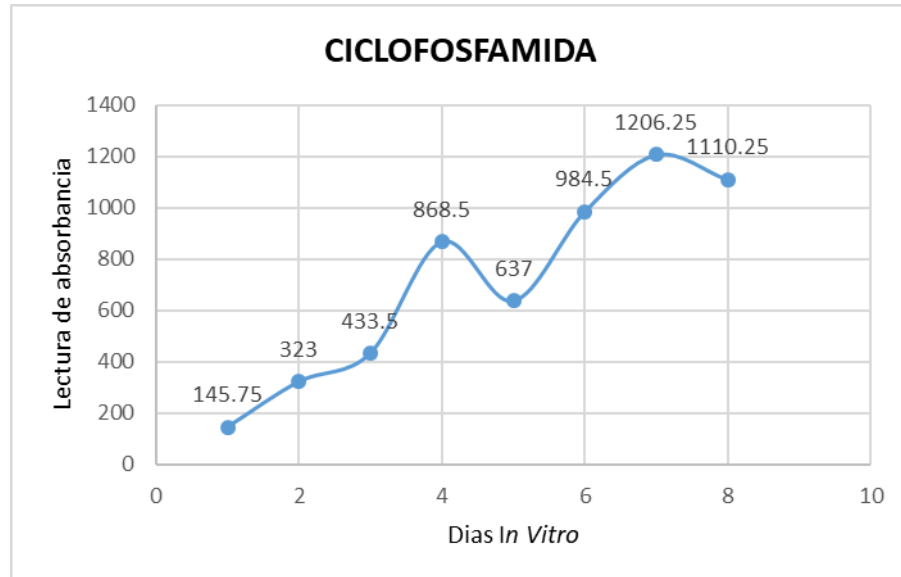


Figura 31. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con el fármaco ciclofosfamida. Células sembradas tratadas con ciclofosfamida. La gráfica representa el número de células sembradas por placa en 8 días *in vitro* mediante una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar el efecto de ciclofosfamida y su efecto en las células dependiente a la dosis administrada. En los cuales no se exhibe niveles de muerte celular sin embargo muestran un crecimiento al paso de los días, con una relación muy parecida a las células tratadas con vincristina.

Como se observa, en respuesta a la vincristina y ciclofosfamida, en las células de la línea celular Daoy mostraron un aumento en el crecimiento celular en comparación con el control durante los 8 días *in vitro* sugiriendo un posible efecto de resistencia en las concentraciones establecidas (Figura 28, 29 y 31), mientras que las células con el tratamiento de etopósido mostraron una disminución en su crecimiento sugiriendo un posible efecto de sensibilidad (Figura 30).

Por lo que los resultados sugieren que las células de la línea celular Daoy de meduloblastoma a cierta concentración de vincristina y ciclofosfamida conducen a un crecimiento celular lo que abre la posibilidad de un posible efecto de resistencia celular y por el contrario las células tratadas con etopósido exhiben una disminución celular lo que sugiere una posible sensibilidad al tratamiento (Figura 26).

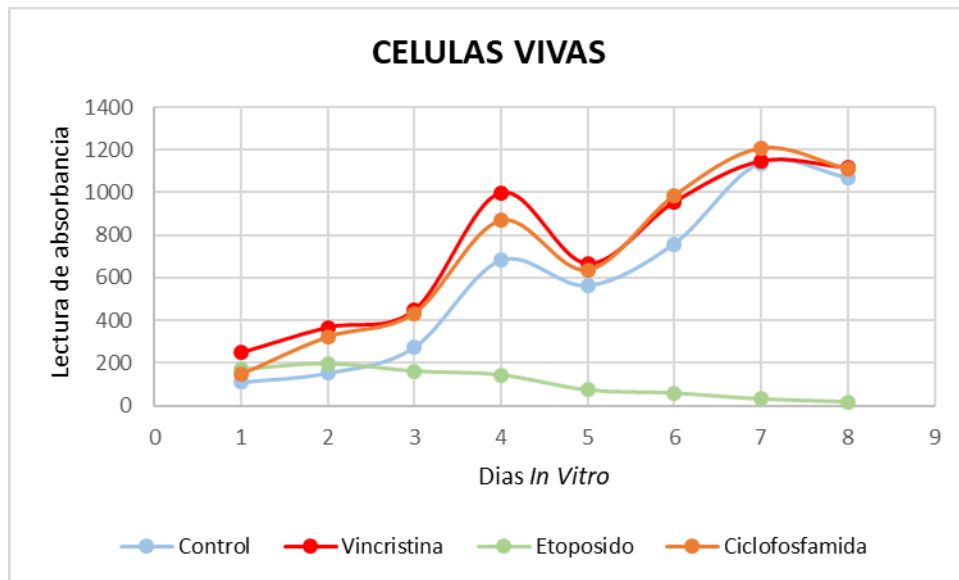


Figura 32. Viabilidad de células de la línea tumoral Daoy de meduloblastoma con todos los fármacos. Grafica con la correlación de los tres tratamientos y su correspondiente control. La grafica representa el número de células sembradas por placa en 8 días *in vitro* mediante una lectura de fluorescencia, donde se puede mostrar que tanto Vincristina como etopósido presentan una relación muy parecida al control e incluso con un número mayor de células, posteriormente, etopósido no se apegó a esto y se puede observar cómo decrece su número de células al pasar de los días.

Finalmente, la correlación de estos resultados sugiere que la presencia de las proteínas ABC específicamente ABCC2 Y ABCG2 en las células de la línea celular Daoy de meduloblastoma podrían estar induciendo la salida del fármaco y, por tanto, confiere una mayor viabilidad y exhibe un aumento en su crecimiento celular cuando se emplea vincristina y ciclofosfamida, y, por el contrario, exhiben una disminución en su crecimiento celular y mostrando una menor viabilidad celular lo que abre la posibilidad de que las células presenten un posible efecto de sensibilidad con etopósido, con lo que puede estar relacionado con lo ya reportado en la literatura de Guminski et al., 2006. The Human Protein Atlas., 2021 el cual menciona que MRP2 (ABCC2), se expresa en niveles bajos en cerebro específicamente en el cerebelo, líneas celulares de cerebro, así mismo con lo reportado por Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006; Morfouace et al., en el 2015, los cuales informan la presencia de BRCP (ABCG2) en leucemias agudas y algunos tumores sólidos como de pulmón, así como su expresión en gran medida, en el meduloblastoma G3 humano y de ratón. Lo sugiere que, a cierta concentración, vincristina y ciclofosfamida inducen las proteínas ABC, permitiendo la salida del fármaco y, por tanto, conduciendo a una resistencia celular.

IX. DISCUSIÓN

El cáncer es una de las enfermedades con mayor crecimiento en las últimas décadas a nivel mundial. A pesar de los tratamientos actuales la supervivencia de pacientes aún es muy baja, sobretodo en tumores cerebrales de alto grado. Desde la perspectiva de la quimioterapia, los MB primarios se tratan principalmente con quimioterapias combinadas que incluyen: etopósido, cisplatino, lomustina, ciclofosfamida y vincristina. El fracaso del tratamiento de quimioterapia es particularmente relevante sobre todo en niños menores de tres años, los cuales son tratados preferentemente con quimioterapia para minimizar los efectos adversos de la radioterapia en el cerebro en desarrollo, sin embargo, un número considerable de pacientes tienen tumores intrínsecamente resistentes a los fármacos que a menudo se atribuye a la expresión de bombas de eflujo de expulsión de drogas dependientes de ATP que pertenecen a la familia de transportadores ABC (ATP-binding cassette), las cuales son las responsables de expulsar diversos metabólicos y xenobióticos desde la célula, entre los que destacan fármacos anti-tumorales. Los enfoques actuales en las investigaciones apuntan a la optimización de tratamientos de cáncer cerebral, como la identificación de los transportadores de resistencia a fármacos presentes en estos tumores para la selección apropiada de tratamientos farmacológicos (Peigñan, 2010; Vaidyanathan *et al.*, 2014).

Debido a la existencia de poca información, análisis funcionales y farmacológicos detallado de los grupos y subtipos de meduloblastomas, existe un desconocimiento de los transportadores de resistencia en células de meduloblastoma y la poca información con respecto a la regulación de su actividad, ha contribuido en gran parte a la pobre eficacia de las terapias dirigidas al cáncer en el sistema nervioso central. En el presente trabajo, se establecieron las condiciones adecuadas para detectar a los transportadores ABC mediante PCRs y estudios citotóxicos *in vitro*.

Con los resultados obtenidos, determinamos la gran diferencia en la respuesta de las células de la línea celular de meduloblastoma a la vincristina, ciclofosfamida y etopósido, considerando que las células expresen varias proteínas MDR ya que se sabe que estas proteínas confieren resistencia a varios tipos de cáncer, lo que demuestra la importancia de estas proteínas en la respuesta de los meduloblastomas a los agentes quimioterapéuticos, por lo que se partió con una población de células tumorales de meduloblastoma (Daoy) con el objetivo de evaluar como primer parámetro las condiciones óptimas para su crecimiento. Posteriormente se realizó la evaluación para detectar la presencia de bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2 en la línea celular de meduloblastoma Daoy.

IX.1. EVALUACIÓN DE LA SINTESIS DE ARN

Para llevar a cabo la detección de la presencia de las bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2, se requirió la extracción de ARN de la línea tumoral de meduloblastoma Daoy. Por lo que se evaluó la contaminación con ADN genómico mediante un PCR y el resultado fue favorable ya que no se obtuvo bandas de amplificación en las muestras de interés y por el contrario se amplificó el gen GAPDH en todos los ciclos del control positivo de tal manera que el procedimiento de extracción de ARN fue correcto en la obtención de la fase acuosa libre de ADN, y proteínas así como en la digestión con la ADNasa, consecuente con los resultados correspondientes de las absorbancias a 260/230 y 260/280 que se encontraban en un rango promedio a 1.8, por lo que se determinó que las muestras contaban con pureza suficiente.

El siguiente criterio evaluado fue la integridad del ARN obteniendo dos bandas referentes a las subunidades ribosomales 28s y 18s, obteniéndose dichas bandas en la relación 2:1 de igual manera no se observó ninguna degradación ya que no se observa barrida ninguna de las bandas en el gel. El resultado fue positivo y se decidió el uso de los ARNs totales extraídos por ser considerados de pureza e integridad aceptables para la síntesis de cDNA.

IX.2. EVALUACIÓN DE LA SINTESIS DE cDNA

El cDNA recién sintetizado a partir del ARN total, se evaluó mediante RT-PCR con una curva de ciclos de 20 a 40, amplificando gen constitutivo (GAPDH) en las muestras seleccionadas.

El resultado esperado fue óptimo ya que se observó las bandas con intensidad en incremento del ciclo 20 al 40, considerando los cDNAs evaluados de buena calidad por lo que se decidió utilizarlos para la continuación de los PCRs para la detección de las bombas de eflujo con los cDNAs evaluados.

IX.3. PRESENCIA DE LAS BOMBAS DE EFLUJO ABCC2 Y ABCG2, EN LA LINEA TUMORAL DE MEDULOBLASTOMA, DAOY

Como se mencionó anteriormente, una propuesta de nuestro grupo de investigación es que las proteínas ABC son las responsables de expulsar diversos metabólicos y xenobióticos desde la célula, lo cual afecta los tratamientos para tratar los tumores de meduloblastoma. Actualmente se reporta la presencia de la expresión del gen ABCC2 en líneas celulares de cerebro, lo que correlaciona a la contribución de la resistencia a fármacos en células de mamíferos, también se sabe que transportan varios medicamentos contra el cáncer, como la antraciclina, el alcaloide de la vinca y el metotrexato, y medicamentos contra el VIH, como los inhibidores de la proteasa y confiere resistencia a varios fármacos contra el cáncer, incluidos el cisplatino, la doxorubicina, la epirubicina, el metotrexato, el etopósido y vincristina (Atlas, 2022). De igual manera el transportador dependiente de ATP, ABCG2 también conocida como proteína de resistencia al cáncer de mama, la cual funciona como un transportador de xenobióticos que puede desempeñar un papel importante en la resistencia a múltiples fármacos, por lo que se correlaciona con la posibilidad de que sirva como un mecanismo de defensa celular en respuesta a los múltiples fármacos.

Se ha confirmado su expresión en toda la distribución regional del tejido cerebral incluyendo la corteza cerebral y el cerebelo, en cuanto a su expresión en líneas celulares, su distribución se ha detectado en muchas líneas celulares incluyendo líneas de células cerebrales (Atlas, 2022).

Pese a que se sabe que una pequeña cantidad de transportadores ABC de la membrana plasmática pueden expulsar los fármacos y conferir resistencia, con el trabajo de Morfouace et al., 2015, se demostró que ABCG2 se expresa a niveles muy aumentados en el meduloblastoma G3 humano y en un modelo de ratón el cual se expresa fuertemente en la membrana apical de las células polarizadas, incluida la BHE, además ABCG2 está implicado como marcador de células madre de cáncer y es responsable de mantener un estado no diferenciador por lo que exhiben propiedades intrínsecas como pluripotencia, mayor capacidad de crecimiento y una tasa de supervivencia mejorada después de la exposición a fármacos citotóxicos por lo que es de particular interés para los regímenes terapéuticos.

Lo anterior podría sugerir que la expresión de dichos transportadores se encuentra en la línea tumoral de Meduloblastoma, Daoy, de acuerdo a su presencia en diversas líneas celulares de cerebro, por lo que se identificó 2 bombas de eflujo en la línea tumoral de meduloblastoma, Daoy. Por lo cual primeramente se realizó una estandarización por RT-PCR por ciclos evaluando la concentración de $MgCl_2$ y de la temperatura en la etapa de apareamiento en las cuales se determinó las condiciones óptimas para una amplificación del producto.

Con los resultados obtenidos se obtuvieron dos curvas, una curva de temperaturas de la etapa de apareamiento (62, 64, 66 y 68 grados Celsius) y una curva de concentraciones sin $MgCl_2$ (0 mM adicional, 0.5 mM, 1 mM, 1.5 mM y 2 mM), en las cuales su resultado mostro una amplificación del producto que, en ambos casos en la condición sin $MgCl_2$ (0 mM adicional) a 62°C, el producto se comienza a observar en el ciclo 20 y su amplificación se va incrementando conforme pasan los ciclos, sin embargo se determinó que para ambos transportadores se usaría sin $MgCl_2$ (0 mM adicional) y una temperatura en la etapa de apareamiento de 66°C, dado que estos resultados mostraron una mayor intensidad en la banda y menor cantidad de artefactos (datos mostrados en el apéndice).

Para cumplir uno de los objetivos más importantes en el desarrollo del presente proyecto, se llevó a cabo la detección molecular para determinar si la expresión de mRNA de las bombas de eflujo ABCC2 y ABCG2 se encontraban expresándose en la línea tumoral de Meduloblastoma Daoy, mediante RT-PCR.

Como primera instancia lo oligonucleótidos ocupados para detectar las bombas de eflujo ya estaban previamente diseñados para q-PCR.

Los resultados obtenidos de dichos genes fueron los esperados, demostrándose que en la línea celular de meduloblastoma Daoy existe expresión de los transportadores ABCC2 y ABCG2, por lo que estos datos muestran una relación como lo ya antes reportado sobre la expresión en múltiples tejidos, incluido el sistema nervioso central (SNC), lo que sugiere que algunos fármacos han sido relacionados con el aumento en sus concentraciones y pueden inducir a las proteínas ABC lo que se podría relacionar con lo visto en la resistencia a quimioterapia y radioterapia en pacientes con tumores cerebrales específicamente con meduloblastoma.

IX.4. EVALUACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Finalmente, el último parámetro evaluado y el determinante para la comparación con el trabajo realizado con la línea tumoral de meduloblastoma, Daoy, fue la evaluación de los fármacos antineoplásicos para determinar cuáles confieren una mayor viabilidad en relación con las bombas de eflujo, se ha descrito su amplio papel que juega en la expulsión de xenobióticos del cerebro, lo que abra la posibilidad de que confiera a las células resistencia a la gran variedad de fármacos y otros xenobióticos utilizados para tratar a los pacientes con Meduloblastoma y por otra parte, podría considerarse como un factor para la determinación del grado de malignidad de los diversos subgrupos y subtipos de meduloblastoma.

Con respecto a la citotoxicidad en cultivos celulares se suele expresar como la concentración de un agente que es letal para el 50% de las células (CL50) el cual depende del tiempo de incubación con el agente (Zhang *et al.*, 2007). Por consiguiente, Ivanov *et al.*, 2015 describe que los avances en el tratamiento del cáncer de modelos *in vitro* fisiológicamente son relevantes para detectar y priorizar nuevos fármacos y su administración, una de las posibles estrategias para superar la BHE son la interrupción de la barrera, el bloqueo de las bombas de eflujo, la utilización de transportadores y la administración local de fármacos al cerebro o por infusión en el líquido cefalorraquídeo, por otra parte, identificaron un rango en los niveles de etopósido entre 3 y 10 μM maximizaron la toxicidad para los tumores, sin embargo, este estudio muestra que el etopósido puede dañar las células en proliferación independientemente de su origen y sugieren que se deben considerar enfoques más específicos para mejorar la selectividad que limiten la exposición del tejido normal y maximicen los efectos tóxicos en los tumores para prevenir la toxicidad fuera del objetivo.

Por otra parte Shinwari *et al.*, 2011 evaluaron los efectos citotóxicos de la vincristina en la línea celular Daoy de meduloblastoma donde demostraron la citotoxicidad de vincristina la cual no aumentó de una manera dependiente de la dosis empleada, sino que se perdió y todas las células se volvieron resistentes mientras las concentraciones del fármaco aún eran bajas por consiguiente ellos sugieren que a cierta concentración, vincristina induce las proteínas MDR, lo que permitiría la salida del fármaco y, por tanto, conducir a una resistencia celular.

No obstante, para determinar lo anterior, en este proyecto se determinó con tres tipos de fármacos utilizados en el tratamiento de meduloblastoma, vincristina, ciclofosfamida y etopósido, para saber cuál de ellos confería una mayor viabilidad en presencia de la línea tumoral Daoy.

Inicialmente se llevó a cabo una estandarización para las condiciones del estudio citotóxico, tomando parte de las células Daoy del subcultivo del pase 9 las cuales se sembraron en placas de 96 pozos y se calculó el volumen de medio por área la cuales se dejaron un total de 96 horas para observar su crecimiento exponencial con base a su saturación tomándose en cuenta para establecer tiempos determinados sobre las células en las placa de 96 pozos y así conocer el momento óptimo antes de que estas lleguen a un estado de saturación y poder montar la estandarización para el estudio citotóxico en base a la viabilidad y la muerte celular.

Para la estandarización de la viabilidad y la muerte celular sobre la línea tumoral Daoy, se realizaron cálculos para determinar el volumen de células por pozo (datos mostrados en el apéndice), las cuales se colocaron en los carriles de las placas y estas se dejaron un total de 24 horas para permitir su adherencia,

los resultados mostraron que a los 4 días las células llegaban a la saturación en los pozos, posteriormente se aplicó el tratamiento para determinar su viabilidad y muerte celular.

Para los tratamientos de viabilidad y muerte celular se analizaron diversos protocolos, sin embargo, se decidió el utilizar el compuesto de calceína verde fluorescente impermeable a la membrana, que se retiene en las células viables con las membranas plasmáticas y que posteriormente se puede observar la densidad óptica determinada en un lector de placa de 96 pozos y consecutivamente se realizó una gráfica en la cual se visualizó el número de células sembradas en cada pozo en una lectura de fluorescencia en la cual se obtuvo una línea de tendencia lineal hasta 16,000 células y a partir de 32, 000 células comienzan una saturación celular en los pozos.

Para el tratamiento de muerte celular se realizó mediante el kit de ensayo de viabilidad/citotoxicidad de calceína en el cual contenía un homodímero III de etidio colorante vital para la cuantificación de células vivas y muertas, que de igual manera se determinó en un lector de placa de 96 pozos. Los resultados mostraron una similitud pues se obtuvo de igual manera una línea de tendencia lineal hasta 16,000 células y a partir de 32, 000 células comienzan una saturación celular en los pozos.

Una vez conociendo el número de saturación de las células en base a la viabilidad y muerte celular se procedió a realizar una evaluación para investigar el efecto citotóxico de los fármacos antineoplásicos los cuales fueron vincristina, etopósido y ciclofosfamida en la línea tumoral Daoy.

Las células se sembraron en un volumen de medio por área cuadrada en placas de 96 pozos, el medio se equilibró con las concentraciones deseadas de los fármacos vincristina, ciclofosfamida y etopósido, tomando en cuenta la IC50 para obtener un stock de los fármacos ya antes mencionados y realizar sus correspondientes diluciones, por lo que se sembraron las células con los fármacos en 8 placas de 96 pozos (cada placa representa 1 día).

Los resultados obtenidos fueron favorables y diversos ya que se visualizó que en respuesta a la vincristina y ciclofosfamida las células de la línea celular Daoy mostraron un aumento en su crecimiento celular en las concentraciones establecidas y presenta una línea de tendencia muy parecida al control durante los 8 días in vitro, sin embargo, las células con el tratamiento de etopósido muestran confiere una menor viabilidad celular mitigando su crecimiento. Estos resultados abren la posibilidad de que las células de la línea celular de meduloblastoma, Daoy a cierta concentración de vincristina y ciclofosfamida conducen a un incrementó en el crecimiento celular y una posible resistencia celular y por el contrario etopósido exhibe una posible sensibilidad celular, además los resultados se encuentran correlacionados con lo ya reportado en la literatura de Guminski *et al.*, 2006; así mismo con lo reportado por Sánchez-Suárez & Benítez-Bribiesca 2006; Morfouace *et al.*, en el 2015, los cuales informan la presencia de BRCP (ABCG2) en leucemias agudas y algunos tumores sólidos.

Por lo tanto, los presentes resultados muestran claramente que los fármacos quimioterapéuticos no siempre conducen a una mejor respuesta y que las células tumorales pueden responder de manera diferente a los distintos regímenes quimioterapéuticos que se tienen en la actualidad.

X. CONCLUSIÓN

- I. Se establecieron las condiciones óptimas para la propagación y crecimiento de la línea celular Daoy de meduloblastoma, mediante la determinación de las horas por división obteniendo un promedio de 31.40 horas y un de 97.26% de viabilidad lo que sugiere que el procedimiento de cultivo no afecto la sobrevivencia de las células tumorales.
- II. Se consiguió obtener el material genético de los cultivos celulares de Daoy de manera eficiente para realizar las pruebas correspondientes mediante PCR para detectar los transportadores ABCC2 y ABCG2, realizando a su vez curvas de concentraciones tanto de temperatura como de MgCl₂.
- III. Se detectaron los transportadores ABCC2 y ABCG2 en la línea celular Daoy de meduloblastoma por RT-PCR, los cuales han sido relacionados con el aumento de la resistencia a quimioterapia.
- IV. Se establecieron tiempos determinados sobre las células en la placa de 96 pozos para conocer el estado de saturación en el crecimiento celular en Daoy, esto con el fin de reconocer el momento óptimo para determinar la estandarización de viabilidad y muerte celular para el estudio citotóxico.
- V. Mediante la evaluación citotóxica, se observó un incremento en su crecimiento celular en Daoy cuando se vieron tratadas con vincristina y ciclofosfamida por el contrario una disminución en la línea celular Daoy cuando se le coloco etopósido.
- VI. Mediante la correlación del patrón de expresión de los transportadores ABCC2 y ABCG2 ya antes obtenidos, estos resultados dan una idea del posible efecto en la línea Daoy, por lo que se necesitan más pruebas conocer las posibles resistencias farmacológicas a vincristina y ciclofosfamida y por el contrario una posible sensibilidad con etopósido en la línea celular Daoy.

XI. PERSPECTIVAS

- Establecer una metodología para determinar cuantitativamente la confluencia sobre el cultivo celular inicial para el correcto crecimiento de dichas células.
- Repetición del presente experimento tomando en cuenta triplicados y replicas para calcular una respuesta más precisa de los efectos citotóxicos sobre la línea celular Daoy.
- Establecimiento de métodos para la detección células apoptóticas.
- Repetición del presente experimento tomando en cuenta un número mayor de transportadores de casete de unión a ATP (ABC), con la finalidad de determinar los niveles de expresión de dichos transportadores ABC.
- Evaluar un rango más amplio de fármacos antineoplásicos con distintas combinaciones a diferentes concentraciones en las diferentes líneas celulares de meduloblastoma para determinar la capacidad de resistencia o sensibilidad sobre las células de meduloblastoma.
- Inhibición de las bombas de eflujo para conocer los efectos de la viabilidad o muerte celular en las células tratadas con los fármacos antineoplásicos.
- Establecer protocolos que permitan la propagación de células de tejido primario para poder profundizar en una visión más a futuro, para lo cual se sugiere evaluar por medio de xenotrasplantes en un modelo animal el potencial tumorigénico, tanto de las líneas celulares como de células de tejido primario de meduloblastoma.
- Una vez determinado el punto anterior, el conocer los patrones de los fármacos antineoplásicos y por medio de un modelo animal *in vivo*, se podrá percibir una visión más significativa para predecir una respuesta de las células de meduloblastoma en regímenes quimioterapéuticos.

XII. BIBLIOGRAFÍA

- Acevedo, J. J., Ángeles, J. S., Rodríguez, V. M., & Santa-Olalla, J. (2011). CELULAS TRONCALES Y MEDICINA REGENERATIVA. In *Células troncales neurales* (pp. 89–114).
- Astudillo-de la Vega, H., Erika, R. G., Jorge, M. C., & Francisco, O. C. (2010). El papel de la quimioresistencia en los tumores sólidos. *Clinical case*, 9(3), 117-125.
- Atlas, T. human protein. (2022). ABCC2, ATP binding cassette subfamily C member 2. <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000023839-ABCC2>
- Butts, T., Green, M. J., & Wingate, R. J. (2014). Development of the cerebellum: simple steps to make a 'little brain'. *Development*, 141(21), 4031-4041.
- Campbell, K., & Götz, M. (2002). Radial glia: multi-purpose cells for vertebrate brain development. *Trends in neurosciences*, 25(5), 235-238.
- Carrasco-Torres, G., Fattel-Fazenda, S., López-Alvarez, G. S., García-Román, R., Villa-Treviño, S., & Vásquez-Garzón, V. R. (2016). The transmembrane transporter ABCC3 participates in liver cancer progression and is a potential biomarker. *Tumor Biology: The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 37(2), 2007–2014. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3999-5>
- Cavalli, F., Remke, M., Rampasek, L., Peacock, J., Shih, D., Luu, B., Garzia, L., Torchia, J., Nor, C., Morrissy, A. S., Agnihotri, S., Thompson, Y. Y., Kuzan-Fischer, C. M., Farooq, H., Isaev, K., Daniels, C., Cho, B. K., Kim, S. K., Wang, K. C., Lee, J. Y., ... Taylor, M. D. (2017). *Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. Cancer cell*, 31(6), 737–754.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2017.05.005>
- Cervantes, A. (2018). Resistencia a la quimioterapia: mecanismos y vías de modulación. Investigación Sobre El Cáncer En España. *De La Biología Molecular a La Clínica*, 93–99. <https://esteven.org/wp-content/uploads/2018/01/136676.pdf>
- Chabner, B. A., Amrein, P. C., Druker, B. J., Michaelson, M. D., Mitsiades, C. S., Goss, P. E., Ryan, D. P., Ramachandra, S., Richardson, P. G., Supko, J. G., & Wilson, W. H. (2006). Quimioterapia de enfermedades neoplásicas. In L. L. Brunton, J. S. Lazo, & K. L. Parker (Eds.), *Las bases farmacológicas de la terapéutica* (undécima, pp. 1315–1350). INTERAMERICANA, McGRAW-HILL.
- Cordon-Cardo, C., O'Brien, JP, Casals, D., Rittman-Grauer, L., Biedler, JL, Melamed, MR y Bertino, JR (1989). El gen de resistencia a múltiples fármacos (glicoproteína P) se expresa por las células

- endoteliales en los sitios de barrera hematoencefálica. *Actas de la Academia Nacional de Ciencias de los Estados Unidos de América*, 86 (2), 695-698. <https://doi.org/10.1073/pnas.86.2.695>
- Crawford, J. R., MacDonald, T. J., & Packer, R. J. (2007). Medulloblastoma in childhood: new biological advances. *The Lancet Neurology*, 6(12), 1073-1085.
- Dang, L. T., & Tropepe, V. (2010). FGF dependent regulation of Zfhx1b gene expression promotes the formation of definitive neural stem cells in the mouse anterior neurectoderm. *Neural development*, 5(1), 13.
- De Felipe, A. I. Á., & Duarte, M. M. P. (2008). Transportadores de tipo ABC: consecuencias de su interacción con flavonoides. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7(6), 296-311.
- De la Cruz Pabón, J. R., Hoyos, M. A. P., Restrepo, E. Q., & Montoya, A. E. T. (2018). Medulloblastoma: de la clasificación histológica a la molecular. *Medicina UPB*, 37(1), 47-54.
- Demeule, M., Régina, A., Jodoin, J., Laplante, A., Dagenais, C., Berthelet, F., ... & Béliveau, R. (2002). Drug transport to the brain: key roles for the efflux pump P-glycoprotein in the blood-brain barrier. *Vascular pharmacology*, 38(6), 339-348.
- Ellison, D. (2002). Classifying the medulloblastoma: insights from morphology and molecular genetics. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 28: 257-282. doi:10.1046/j.1365-2990.2002.00419.x
- Esquivel-Estudillo. (2017). Generación de precursores pancreáticos a partir de queratinocitos humanos. (Tesis de maestría). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Morelos, México.
- Fajardo-Gutiérrez, A., Urióstegui, M. L. C., & Villasís-Keever, M. A. (2003). Epidemiología del cancer en adolescentes. *Salud pública de México*, 45(1), 115.
- Gilbertson, R. J., & Ellison, D. W. (2008). The origins of medulloblastoma subtypes. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 3, 341-365.
- Guminski, A. D., Balleine, R. L., Chiew, Y. E., Webster, L. R., Tapner, M., Farrell, G. C., Harnett, P. R., & DeFazio, A. (2006). MRP2 (ABCC2) and cisplatin sensitivity in hepatocytes and human ovarian carcinoma. *Gynecologic Oncology*, 100(2), 239-246. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2005.08.046>
- INEGI. (2 de febrero, 2018). "estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer (4 de febrero)" [Comunicado de prensa]. Recuperado de: https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2018/cancer2018_nal.pdf
- Ivanov, D. P., Parker, T. L., Walker, D. A., Alexander, C., Ashford, M. B., Gellert, P. R., & Garnett, M. C. (2015). In vitro co-culture model of medulloblastoma and human neural stem cells for drug delivery

- assessment. *Journal of biotechnology*, 205, 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.01.002>
- Kandel, E., 2001. El cerebelo. In: E. Kandel, ed., *Principios de neurociencia*, 4th ed. Madrid: Mc Graw Hill Interamericana, pp.832,833-835.
- Kathawala, R. J., Wang, Y. J., Ashby, C. R., & Chen, Z. S. (2014). Recent advances regarding the role of ABC subfamily C member 10 (ABCC10) in the efflux of antitumor drugs. *Chinese Journal of Cancer*, 33(5), 223–230. <https://doi.org/10.5732/cjc.013.10122>
- Keppler, D. (2011). Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): Importance for pathophysiology and drug therapy. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 201, 299–323. https://doi.org/10.1007/978-3-642-14541-4_8
- Komori T. (2017). The 2016 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System: The Major Points of Revision. *Neurologia medico-chirurgica*, 57(7), 301–311. <https://doi.org/10.2176/nmc.ra.2017-0010>
- Kool, M., Korshunov, A., Remke, M., Jones, D. T., Schlanstein, M., Northcott, P. A., Cho, Y. J., Koster, J., Schouten-van Meeteren, A., van Vuurden, D., Clifford, S. C., Pietsch, T., von Bueren, A. O., Rutkowski, S., McCabe, M., Collins, V. P., Bäcklund, M. L., Haberler, C., Bourdeaut, F., Delattre, O., ... Pfister, S. M. (2012). Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Actaneuropathologica*, 123(4), 473–484. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0958-8>
- Kunjachan, S., Rychlik, B., Storm, G., Kiessling, F., & Lammers, T. (2013). Multidrug resistance: Physiological principles and nanomedical solutions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(13–14), 1852–1865. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2013.09.018>
- Mansoori, B., Mohammadi, A., Davudian, S., Shirjang, S., & Baradaran, B. (2017). The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 7(3), 339–348. <https://doi.org/10.15171/apb.2017.041>
- Mayani, H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Archives of medical research*, 34(1), 3-15.
- Mejía, L. F., & Neira, F. (2005). Meduloblastoma en adultos. *Revista Colombiana de Cancerología*, 9(1), 34-38.
- Mizrak, D., Brittan, M., & Alison, M. R. (2008). CD133: molecule of the moment. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*, 214(1), 3-9.

- Morales-Pérez, M., & García-Milian, A. J. (2017). Papel de la superfamilia ABC en la resistencia farmacológica. *Horizonte sanitario*, 16(2), 93-101.
- Morfouace, M., Cheepala, S., Jackson, S., Fukuda, Y., Patel, Y. T., Fatima, S., Kawauchi, D., Shelat, A. A., Stewart, C. F., Sorrentino, B. P., Schuetz, J. D., & Roussel, M. F. (2015). ABCG2 transporter expression impacts group 3 medulloblastoma response to chemotherapy. *Cancer Research*, 75(18), 3879–3889. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-15-0030>
- Munoz, M., Henderson, M., Haber, M., & Norris, M. (2007). Role of the MRP1/ABCC1 multidrug transporter protein in cancer. *IUBMB Life*, 59(12), 752–757. <https://doi.org/10.1080/15216540701736285>
- Obermeier, B., Daneman, R., & Ransohoff, R. M. (2013). Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. *Nature medicine*, 19(12), 1584–1596. <https://doi.org/10.1038/nm.3407>
- Okano, H., Kawahara, H., Toriya, M., Nakao, K., Shibata, S., & Imai, T. (2005). Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. *Experimental cell research*, 306(2), 349-356.
- Othman, RT, Kimishi, I., Bradshaw, TD, Storer, LC, Korshunov, A., Pfister, SM, Grundy, RG, Kerr, ID y Coyle, B. (2014). Superar múltiples mecanismos de resistencia a medicamentos en meduloblastoma. *Acta neuropathologica communications*, 2, 57. <https://doi.org/10.1186/2051-5960-2-57>
- Peigñan, L. V. (2010). PAPEL DEL TRANSPORTADOR MRP1 EN LA RESISTENCIA DE GLIOBLASTOMA HUMANO A DROGAS ANTINEOPLÁSICAS. Universidad Austral de Chile.
- Pietsch, T., & Haberler, C. (2016). Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma - a practical diagnostic guideline. *Clinical neuropathology*, 35(6), 344–352. <https://doi.org/10.5414/NP300999>
- Qian, X., Shen, Q., Goderie, S. K., He, W., Capela, A., Davis, A. A., & Temple, S. (2000). Timing of CNS cell generation: a programmed sequence of neuron and glial cell production from isolated murine cortical stem cells. *Neuron*, 28(1), 69-80.
- Riquelme, P. A., Drapeau, E., & Doetsch, F. (2008). Brain micro-ecologies: neural stem cell niches in the adult mammalian brain. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 363(1489), 123-137.
- Rivera-Luna, R., Niembro-Zúñiga, A. M., Zarco, A., Cárdenas-Cardós, R., Olaya-Vargas, A., Rueda-Franco, F., & Martínez-Avalos, A. (2007). Meduloblastoma en pediatría. Pronóstico y tratamiento en la actualidad. *Gaceta médica de México*, 143(5), 415-420.
- Rodríguez, F. B. (2012). Desarrollo embrionario del sistema nervioso central y órganos de los sentidos: revisión/Embryonic Central Nervous System and Sense Organ Development.

UniversitasOdontologica, 31(66).

- Sánchez-Suárez, P., & Benítez-Bribiesca, L. (2006). Procesos biomoleculares de la Resistencia a drogas. *Cancerología*, 1, 187-199.
- Santa-Olalla, J., & Covarrubias, L. (1999). Basic fibroblast growth factor promotes epidermal growth factor responsiveness and survival of mesencephalic neural precursor cells. *Journal of neurobiology*, 40(1), 14-27.
- Santa-Olalla, Ocampo-Roosens, Tello-Terán, Bailón-Franco, Anaya-Jara, Hernández-Sandoval, Gálvez-Molina, Ontiveros-Nevárez, Valderrama-Flores, Rembao-Bojorquez, Pérez-González, Hernández-García & Toledo-Hernández.(2016). Amplificación de células madre tumorales obtenidas de tumores del sistema nervioso central de humanos y su relevancia en la práctica médica (proyecto de Investigación). Hospital del Niño y el Adolescente Morelense, Morelos, México.
- Sato, T., Joyner, A. L., & Nakamura, H. (2004). How does Fgf signaling from the isthmus organizer induce midbrain and cerebellum development?. *Development, growth & differentiation*, 46(6), 487-494.
- Scheffer, G. L., Hu, X., Pijnenborg, A. C. L. M., Wijnholds, J., Bergen, A. A. B., & Scheper, R. J. (2002). MRP6 (ABCC6) detection in normal human tissues and tumors. *Laboratory Investigation*, 82(4), 515–518. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780444>
- Seri, B., García-Verdugo, J. M., Collado-Morente, L., McEwen, B. S., & Alvarez-Buylla, A. (2004). Cell types, lineage, and architecture of the germinal zone in the adult dentate gyrus. *Journal of Comparative Neurology*, 478(4), 359-378.
- Shinwari, Z., Al-Hindi, H., Al-Shail, E., Khafaga, Y., Al-Kofide, A., El-Kum, N., & Aboussekhra, A. (2011). Response of medulloblastoma cells to vincristine and lomustine: role of TRKC, CTNNB1 and STK15. *Anticancer research*, 31(5), 1721–1733
- Sinning, M. (2017). Clasificación de los tumores cerebrales. *Revista Médica Clínica Las Condes*, 28(3), 339-342.
- Tan, B., Piwnica-Worms, D., & Ratner, L. (2000). Multidrug resistance transporters and modulation. *Current opinion in oncology*, 12(5), 450-458.
- Testa, U., Castelli, G., & Pelosi, E. (2018). Genetic Abnormalities, Clonal Evolution, and Cancer Stem Cells of Brain Tumors. *Medical Sciences (Basel, Switzerland)*, 6(4), 85. <https://doi.org/10.3390/medsci6040085>
- The Human Protein Atlas. (n.d.). Retrieved December 1, 2021, from <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000023839-ABCC2>

- Ughachukwu, P., & Unekwe, P. (2012). Efflux pump-mediated resistance in chemotherapy. *Annals of medical and health sciences research*, 2(2), 191–198. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.105671>
- Vaidyanathan, G., Gururangan, S., Bigner, D., Zalutsky, M., Morfouace, M., Shelat, A., Megan, J., Freeman, B. B., Robinson, S., Throm, S., Olson, J. M., Li, X.-N., Guy, K. R., Robinson, G., Stewart, C., Gajjar, A., Roussel, M., Sirachainan, N., Pakakasama, S., ... Gopalakrishnan, V. (2014). MEDULLOBLASTOMA. *Neuro-Oncology*, 16(suppl 1), i71–i96. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nou074>
- Wechsler-Reya, R. J., & Scott, M. P. (1999). Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 22(1), 103-114.
- Wijaya, J., Fukuda, Y., & Schuetz, J. D. (2017). Obstacles to Brain Tumor Therapy: Key ABC Transporters. *International journal of molecular sciences*, 18(12), 2544. <https://doi.org/10.3390/ijms18122544>
- Wingate, R. J., & Hatten, M. E. (1999). The role of the rhombic lip in avian cerebellum development. *Development*, 126(20), 4395-4404.
- Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P., Gopalakrishnan, V., & Wolff, J. (2007). Measuring cytotoxicity: a new perspective on LC50. *Anticancer research*, 27(1A), 35–38.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Licenciatura en Biología

Programa Educativo de

Calidad *Acreditado* por el CACEB 2018-2023

Cuernavaca, Morelos a 28 de agosto de 2023

DRA. DULCE MARÍA ARIAS ATAIDE
DIRECTORA GENERAL DE SERVICIOS ESCOLARES
P R E S E N T E.

Por este conducto, los catedráticos suscritos comunicamos a Usted, que hemos revisado el documento que presenta la Pasante de Biólogo: **C. ARCOS ROBLES CIELO IZKAYRA**, con el título del trabajo: **EVALUACIÓN DE LA PARTICIPACIÓN DE BOMBAS DE EFLUJO EN LA EFICACIA DE DROGAS CITOTÓXICAS EN LA LÍNEA TUMORAL DAOY DE MEDULOBLASTOMA.**

En calidad de miembros de la comisión revisora, consideramos que el trabajo reúne los requisitos para optar por la Modalidad de Titulación por Tesis Profesional por Etapas como lo marca el artículo 26° del Reglamento de Titulación Profesional vigente de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

A T E N T A M E N T E
Por una humanidad culta

JURADO REVISOR

FIRMA

PRESIDENTE: M. EN C. CAROLINA ABARCA CAMACHO

SECRETARIO: DRA. MARÍA DEL CARMEN BELTRÁN NÚÑEZ

VOCAL: DR. JUAN JOSÉ ACEVEDO FERNÁNDEZ

SUPLENTE: DRA. MARÍA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMÍREZ

SUPLENTE: DRA. MARÍA DEL CARMEN GUTIÉRREZ VILLAFUERTE



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

MA DEL CARMEN BELTRAN NUÑEZ | Fecha:2023-08-29 18:34:33 | Firmante

bb6pokOMqp7hLyfHYosbUidjMOW/Pn9r/5dhZiteZtkJs71Yc2saJQBH2bXx4Ngo+HOQljF88gx1xd9tYpeZNsp5C9sANTFp0B9T0Kf7iYEKjcv6hxpw1NsVQDjtK9HX8R23d31mX4YVzeqblDWMmU6EEvZTaD1f5DXNDQWkUYalP+CqKuV0iHdn6MI5nQo76Cm1NbdMF0H7t/QflYLytlSibZ27VdnzZ7fglAp7F7QUmuBTU6kmN1j7firWIGPJT8Seb3/qdi89Wps6Z2oXzfnAhKQsc9Vpn63Pss1oiCOXTr2dA8t7vJ/13ygfVsjfVp7BrOw1V5dlZ11JrbQ==

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2023-08-29 18:40:00 | Firmante

q318aNoJGthIAwl5NxAdfX2dagk36a/JDlrYuoQciYSZJxk3cOUOvJbg+5HDNUncTpU6XuMkKY0g3rke3O+Ofod1mGOZU2tOwDWJ9eom0b1UBMunLKW95ACwcZgi5B1yiLqh9FcqXuZNP5YXVQuZr4490ZgjUGXQqzVip5h0GxWHHNFYtsfxHSNv44yiNzmTqJaSZfp3mG1nsCWHRRRRC7EaBd8RsKh8GBPTz21cfhujH5wQ3qx9F9SgQr8/QEGEioV9wN9rZ8kQvTPN7mOHxFsJBMdFM/KNDJfCeTajU1Jo6kc4RXAcM6eZ7TDNf1GsHHPU8FXt0Mlrmw3dEljTCw==

CAROLINA ABARCA CAMACHO | Fecha:2023-08-30 15:44:51 | Firmante

cqplhLowhkfSs420gApsB3KzwHda16WFJffAIKd7qME5TjdmI0NWwsDhDdbhoYlqezkG9R4GmGZQ4xT69RiPDfTt1+3JDsBqK4QLNI8Ne/M/56BTKi4OfriFcpkQNOXaMBft54L8m6p5TrZoVu4Dy4ZppTA9bWxYG1w5P62kTXkD0DvVKgFTG4e0jX9ix23a7o4nfrJrDgcDJASCEZ+G5gLEYjromfQ4gWnwdt+L2NzKxbw5GEOxo2sqKBsa4T0IJIePi4nBXjRu+A uVifalVa3KYrq5Q6ZMRIDNEWePoDqXSTKlnYU/EWSPmG0a9PRuN7UUYqRskZvAU2sksQA==

MARIA DEL CARMEN GUTIERREZ VILLAFUERTE | Fecha:2023-08-30 16:32:58 | Firmante

NloFxaX3jtZg0HJDSkawKidTpNGDKtmBWwek1I63cuO9ELaRl/ine3ciOanToMGgFHKI89+kMIDDL88VDX7oT1u7LPC9W/vCDUM/tl7H1StgxmQRZZs37lxLHxLmgI9GZBZ6Cx6qOti4JpGxO6QMzPsqlTbf4PFdNTUFSt5HlmQFsdvAsK85LGKJ+ZNP8soC9fFrEEOsCMF9sOypYtYqGCOHq2xljlnDZVeoRTKghdJqB/4LnYqW6uKtjT0x9dF+Nf8NHQtfiQwCs4eYIGPjCyrFqxTMTdCYTyd/0eNVqrJKdjaKGdqbcQDyYBxLvUEqfdL03/CjzLaKqN2f/UdnQ==

MARIA LUISA DEL CARMEN GARDUÑO RAMIREZ | Fecha:2023-08-30 19:56:03 | Firmante

WdPtPA25allxP3RVRH8RO4fwk7Kq/xE0jUr92LdnbrOVZTHuaSGNkbWsrRd9ci3ifx5XXW+WgY1OsuNSMtmHOBi+9osjXxBVYI/9Q0MkY2056t2iipxzbJtnxaeugE0p5yulcLoAdzLkHH0JQbfcLLH9uNkkhMi+uPHy0ZxNzVdpk12o3nDoE1oJhzj5SGVfjAU0UKJ5+gyTQnbghAlv6HouFOJSQC79eJWd+pvcJwE7oD2RK2bLkQgM8CAdjZuyoVDQF8tFaT Sug56jQcv+IPXHiRHvbs0ZjPP7n8oefLucMC3xiKLC5HG3k6OL4zrZ3YyEkjUCGonXouAXgnw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



j5nPiv9Xv

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/zRzEVRNaDW7XSvr25q6ZyvZXnOdvslu3>

