

La expresión del gen BAX en astrocitomas de bajo grado en niños correlacionado con tumores recurrentes

Pilar Eguía-Aguilar¹, Mario Solís-Paredes¹, Mario Pérezpeña-Díazconti¹,
Fernando Chico-Ponce de León², Miguel Ángel Méndez-García³ y Francisco Arenas-Huertero^{1,4}

¹Laboratorio de Biología Molecular, Departamento de Patología

²Hospital Infantil de México "Federico Gómez"

³Universidad Iberoamericana

⁴Universidad Simón Bolívar

Resumen

Los astrocitomas son tumores del sistema nervioso central y son los más frecuentes en los niños. Existen 2 grados del tumor: bajo y alto grado. Los de bajo grado tienen mejor pronóstico pero hasta el momento se utilizan criterios clínico-patológicos para predecir la respuesta del paciente. El presente estudio exploró la expresión del gen Bax como un marcador de mal pronóstico en este tipo de astrocitomas. Se analizó la expresión de este gen en 54 casos de astrocitomas pediátricos. El RNAm total se extrajo de tejido incluido en parafina y se amplificó un fragmento del gen Bax por RT-PCR. Los casos positivos a Bax vivieron la mitad del tiempo con respecto a los negativos ($p=0.05$). La expresión de Bax estuvo asociada a tumores recurrentes en los de grado I ($p=0.029$) y grado III ($p=0.0158$). Las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier también mostraron significancia en la reducción del tiempo de los pacientes positivos a Bax ($p=0.037$). La integración Bax en el análisis de regresión jerárquica a los predictores meses de supervivencia y grado, ésta se eleva de 0.492 a 0.663 ($p<0.05$). En conclusión, la expresión del RNAm de Bax representa un nuevo marcador de mal pronóstico en pacientes pediátricos con astrocitomas de bajo grado.

Palabras clave: Supervivencia, astrocitomas, gliomas, muerte celular, Bax.

Abstract

Astrocytomas are the solid tumors more frequent of the central nervous system in children. There are two grades of these tumors: low and high grade. Patients with low grade tumors have better prognosis, but in our medium only clinico-pathological criteria are the best predictors to response to therapy. In the present study, the usefulness of the expression of mRNA of Bax as marker of worse prognosis was studied in 54 cases of pediatric astrocytomas. The mRNA was isolated from formalin fixed paraffin-embedded tissue and a fragment of Bax gene was amplified by RT-PCR. Patients positive to Bax lived less (50%) than those with negative expression ($p=0.05$). Bax mRNA expression was associated to recurrent tumors of grade I ($p=0.029$) and III astrocytomas ($p=0.0158$). The Kaplan-Meier survival curves showed also significance in the reduction of the time survival in patients positive to Bax ($p=0.037$). When Bax expression is integrated to hierarchical multiple regression to predictors as grade and localization, it increases from 0.492 to 0.663 ($p<0.05$). In conclusion: the expression of mRNA of Bax is a new marker of worse prognosis in pediatric patients with astrocytomas.

Key words: Survival, astrocytoma, gliomas, death cell, Bax.

Introducción

Los astrocitomas son los tumores sólidos más frecuentes en la población pediátrica y representan más del 50% de los tumores intracraneos de los niños en México (Chico-Ponce de León et.al, 2006). De acuerdo con la OMS se clasifican en 4 grados: grado I o pilocítico, grado II o fibroso, grado III o anaplásico, y grado IV o glioblastoma multiforme (Louis et.al, 2007). De esta manera, la clasificación está basada en criterios histopatológicos. En los niños, los astrocitomas de bajo grado (grados I y II) son los más frecuentes (Chico-Ponce de León et.al, 2006). Y en general, la terapia de manejo es la cirugía, procurando retirar quirúrgicamente toda la masa tumoral. Sin embargo, estos pueden progresar a tumores de alto grado (grados III y IV) cuando se quedan masas residuales después de la cirugía (Zhu y Parada, 2002). También puede existir la posibilidad de que comiencen como tumores de alto grado: éstos se comportan de manera agresiva y terminan por reducir aún más el tiempo de supervivencia de los pacientes (Ohgaki y Kleihues, 2007).

Durante el tratamiento de los astrocitomas en los niños se procura evitar el uso de la radio o quimioterapia, pues el sistema nervioso del niño se encuentra en proceso de desarrollo y maduración todavía. Estos tratamientos pueden provocar daños y secuelas para toda la vida. Como se mencionó, la clasificación de acuerdo con la OMS utiliza criterios histopatológicos y ese es un factor de pronóstico inicial para el paciente: los tumores de menor grado (grado I y II) tienen mejor pronóstico que los de alto grado (grado III y IV). El promedio de supervivencia de los pacientes, posterior a la cirugía, es de 6 a 8 años para grado II, 3 años para grado III y 1 año para grado IV (Louis et.al, 2007).

Posteriormente, le siguen otros datos como la localización: si está debajo del cerebro (infratentoriales, cerebelosos) o en el cerebro (supratentorial). Los infratentoriales son de mejor pronóstico y generalmente son de bajo grado y más frecuentes en niños. Posterior a estos parámetros es el tamaño y el tipo de lesión que provoca: se mejora el pronóstico si es menor y de bordes regulares o quísticos (Chico-Ponce de León et.al, 2006; Louis et.al, 2007).

Sin embargo, existen casos de bajo grado que en un grupo de pacientes, a pesar de tener el mismo grado tumoral, localización y respuesta posquirúrgica inmediata, algunos de ellos pueden recurrir.

Esta característica no se puede identificar desde el diagnóstico y con los criterios clásicos de pronóstico de los pacientes.

Existen otros parámetros propios del tumor que pueden caracterizar a los astrocitomas como son la tasa de proliferación y los procesos de muerte celular en los que la apoptosis se encuentra alterada. La recurrencia tumoral depende de estos dos procesos (Collins, 2004). De esta manera, se propone analizar estas respuestas celulares en el manejo de los pacientes con astrocitomas de bajo grado, específicamente la apoptosis en el sistema nervioso central tiene un papel prioritario en el mantenimiento de la integridad del mismo (Konsantinidou et.al, 2005). En este sentido, la familia de las proteínas de Bcl-2, entre ellos Bax y Bak ejercen efectos importantes en las células astrocíticas. La interacción de las proteínas anti- (Bcl-2) y proapoptóticas (Bax) para formar heterodímeros u homodímeros, establece el efecto neto para realizar la respuesta final de muerte o resistencia a ésta. Las proteínas son citoplásmicas y en el caso que se encuentre incrementada la relación, por ejemplo de más homodímeros Bax/Bax que heterodímero Bax/Bcl-2 o Bcl-2/Bcl-2, la respuesta será muerte celular afectando la membrana de las mitocondrias, liberando el citocromo-C y activar el proceso (Malla et.al, 2010). En pacientes adultos con astrocitomas, la baja expresión o ausencia de Bax se asocia a un pronóstico desfavorable y menor supervivencia (Lindsten et.al, 2005). En pacientes adultos con astrocitomas fibrilares (grado II), la baja o igual relación de expresión de los mensajeros de Bcl-2/Bax se asociaron a pacientes con respuestas a quimio/radioterapia (Deininger et.al, 1999).

Objetivo

En este estudio se pretende evidenciar que la expresión del RNAm de Bax en muestras de pacientes con astrocitomas, correlaciona con enfermedad recurrente, principalmente en astrocitomas de bajo grado y grado III. Además los pacientes con expresión del RNAm de Bax viven la mitad del tiempo de supervivencia que los negativos a este gen. Este marcador promete ser un diferenciador de los tumores que pueden recurrir en los pacientes desde antes del tratamiento.

Método

Características de los casos y las muestras de estudio

Las muestras tumorales se obtuvieron por resección quirúrgica de un grupo de pacientes que fueron atendidos en el Hospital Infantil de México "Federico Gómez" entre 1999 al 2009. Las biopsias se fijaron en formalina al 10% para incluirse en parafina y llevar a cabo el diagnóstico histopatológico y confirmado por 2 evaluadores, para clasificarse de acuerdo a las organización mundial de la salud en grado I, II, III y IV. Sólo se incluyeron aquellas muestras que contenían al menos 70% de la lesión tumoral en el corte. De esta manera quedaron repartidos los casos en:

- 15 de grado I
- 12 de grado II
- 12 de grado III y
- 15 de grado IV.

Los datos clínicos tales como grado tumoral, recurrencia y supervivencia se correlacionaron con la expresión del gen Bax.

Extracción de RNA y reacción de RT-PCR del gen Bax

EL RNAm de cada tumor fue extraído de acuerdo con las instrucciones contenidas en el kit "Recover All Total Nucleic Acid Isolation" (AMBION), optimizado para tejidos incluidos en parafina. El cDNA se sintetizó a partir de 0.5 µg del RNA total utilizando un oligo (dT) de 15 politiminas, en un volumen final de 50 µl, de acuerdo con las instrucciones del kit TITAN (Roche). Las secuencias de los iniciadores para amplificar los fragmentos de los genes Bax y β-tubulina fueron: Bax-F: 5'-AAGCTGAGCGAGTGTCTCA-3'; Bax-R: 5'-TCATCTGGTAAGTCGTGCT-3'; β-TUB-F: 5'-ATCGCCGCGCTCGTCGT-3'; and β-TUB-R: 5'-GGCATCGTCGCCCGCG-3'. Las condiciones de la amplificación fueron desnaturalización inicial, 94°C/30s; 56°C/30s y 72°C/30s, a repetir por 30 ciclos; finalmente un ciclo de elongación a 72°C por 5 min y de salida a 20°C/5min.

Las bandas amplificadas se analizaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 2% y tinción con bromuro de etidio y luz ultravioleta. La imagen se grabó utilizando un analizador de imágenes para obtener el archivo digital.

Análisis densitométrico

La intensidad de cada banda de los fragmentos de los genes de Bax y de β-tubulina fue cuantificada utilizando el programa Image J. De esta manera, se obtuvo la densitometría de cada una para calcular la relación de expresión dividiendo la densidad del gen Bax de cada caso, entre la obtenida del gen β-tubulina correspondiente.

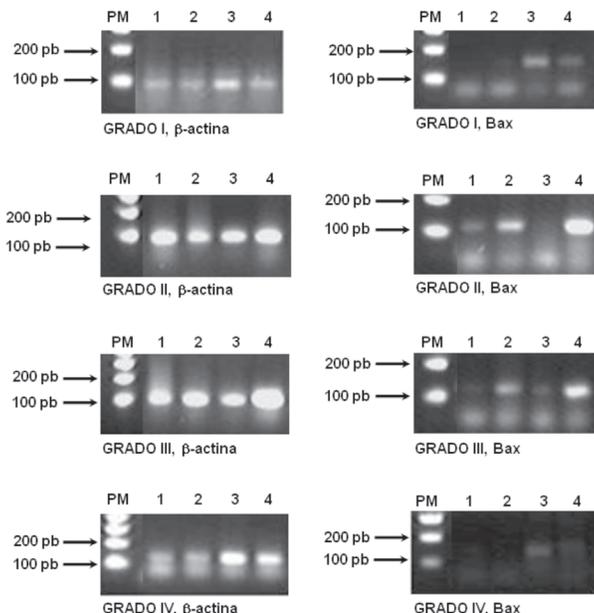
Análisis estadístico

El tiempo de supervivencia (meses) de los pacientes se expresó utilizando la mediana como medida de tendencia central. Las diferencias en los meses de supervivencia entre pacientes positivos o negativos a la expresión de Bax, se realizó mediante la prueba de Mann-Whitney. Para evaluar las diferencias en los casos positivos y negativos a la expresión de Bax en cada uno de los grupos, se utilizó la prueba de ji cuadrada. En ambos casos se consideraron significativas las diferencias cuando el valor de p fue menor a 0.05. También se realizaron curvas de supervivencia de Kaplan-Meier (regresión logística); así como un análisis multivariado de variables de supervivencia clásicas como grado y localización con la presencia de Bax.

Resultados

La calidad del RNAm extraído en las muestras incluidas en parafina fue óptima y en todos se logró la ampliación del gen constitutivo de β -actina. De esta manera se procedió a analizar la expresión del gen Bax en todos los casos (ver figura 1).

Figura 1.



RT-PCR de los genes de β -actina (izquierda) y Bax (derecha) de tumores astrocíticos pediátricos de acuerdo al grado histológico. Grado I. En los carriles 3 y 4 se ve la expresión en estos pacientes que tuvieron recurrencia tumoral y fallecieron. Grado II. Los carriles 1, 2 y 4 muestran pacientes que recurrieron, los de los carriles 2 y 4 fallecieron. Grado III. Los pacientes de los carriles 1 y 3 tuvieron recurrencia y se desconoce su estado actual; el paciente del carril 2 tuvo enfermedad recurrente y falleció; y finalmente el paciente del carril 4 también tiene recurrencia tumoral, se encuentra vivo y en seguimiento. Grado IV. Se muestra sólo un paciente positivo a Bax, pero los 4 pacientes ya fallecieron. Marcadores moleculares se indican a la izquierda de cada imagen.

En 26 de los 54 casos estudiados se expresó el RNAm de Bax (48.1%). La supervivencia se conoció sólo en 34 casos de los cuales 20 tuvieron tumores recurrentes (64.5%, ver tabla 1). Se registró el tiempo de supervivencia de los 34 casos conocidos y se realizaron comparaciones en las medianas del tiempo en meses. Se observó que los pacientes cuyos tumores fueron positivos a Bax vivieron casi la mitad en comparación con los pacientes negativos a este marcador (ver tabla 2); estas diferencias fueron significativas ($p=0.05$). Este hecho se corroboró posteriormente al realizar la regresión logística y obtener la curva de supervivencia de Kaplan-Meier (ver figura 2) que confirmó la diferencia significativa ($p=0.037$) entre los grupos positivos y negativos a Bax. Una tendencia similar se observó en los casos con tumores de grado II y grado III ($p=0.01$ y $p=0.05$, respectivamente, ver tabla 2). Estos resultados respaldan el hecho de considerar a la expresión de Bax como un marcador de tumores recurrentes.

Tabla 1.

Datos clínicos de los pacientes	
	n (%)
Clasificación de acuerdo a la OMS	54
Grado I	15, (27.7)
Grado II	12, (22.3)
Grado III	12, (22.3)
Grado IV	15, (27.7)

Expresión de mRNA de Bax (todas las muestras)	
Positive	26, (48.1)
Negative	28, (51.9)
Supervivencia de los pacientes	
Vivos	14, (25.6)
Fallecidos	20, (37.7)
Desconocido	20, (37.7)
Número de casos recurrentes*	
Bax Positive	20, (64.5)
Bax Negative	11, (35.5)
* Known in 31 cases	

Figura 2. Curva de supervivencia de Kaplan-Meier de los pacientes positivos y negativos a la expresión del RNAm del gen Bax.

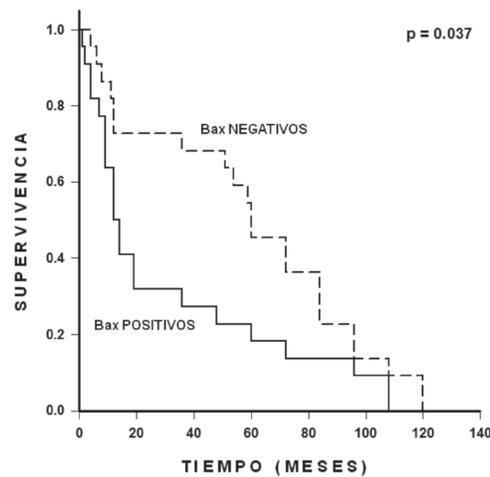


Tabla 2.

Tiempo de supervivencia después de la cirugía y expresión del RNAm de Bax de acuerdo al grado del tumor.			
	N	*Tiempo (meses)	
EXPRESIÓN DE Bax			
Positivo	20	31	
Negativo	11	59.5	**p=0.05
GRADO TUMORAL			
I			
Positivo	6	72	
Negativo	9	89	**p>0.10
II			
Positivo	7	10	
Negativo	4	39.5	**p=0.01
III			
Positivo	4	10.5	
Negativo	2	24	**p=0.05
IV			
Positivo	5	26.4	
Negativo	7	43	**p>0.10
* Conocido solo en 44 casos.			
** Prueba de Mann-Whitney.			

Se realizó un análisis de los casos que presentaron recurrencias, de acuerdo al grado histológico (ver tabla 3). Un dato importante fue que todos los casos con recurrencias tanto en grado I como en grado III fueron positivos a Bax. Este marcador molecular se presentó de manera más específica, ya que la expresión de otros marcadores de muerte como Bak-1, Bcl-2, Casp-3 y Casp-9 no mostraron ninguna selectividad (datos no mostrados). Estas diferencias entre los tumores recurrentes positivos y negativos a Bax tanto en grado I y grado III fueron significativas ($p=0.029$ y $p=0.0158$, respectivamente).

Tabla 3.

Número de casos positivos a la expresión del RNAm de Bax y su distribución de acuerdo a la recurrencia tumoral.			
GRADO	BAX POSITIVO/RECURRENCIA	BAX NEGATIVO/RECURRENCIA	
I	4	0	$p = 0.029^*$
II	6	4	$p = 0.2278$
III	5	0	$p = 0.0158^*$
IV	5	7	$p = 0.265$
* $p < 0.05$, Prueba de Fisher.			

Finalmente se realizó una correlación de los predictores y como era de esperarse, los meses de supervivencia tuvieron una correlación inversa con el grado tumoral, localización del tumor y presencia de Bax. Estos resultados permitieron proponer a estos parámetros como predictores de supervivencia en los astrocitomas pediátricos. El análisis de regresión lineal mostró una asociación entre la presencia de Bax y supervivencia. De esta manera se procedió a realizar un análisis de regresión múltiple con el objeto de ponderar los mejores predictores en astrocitomas. La regresión múltiple jerárquica se realizó y mostró a Bax como una variable que incrementa la varianza de 0.492 para meses de supervivencia sola, a 0.663 cuando el grado y la presencia de Bax se agregan (ver tabla 4).

Tabla 4.

Análisis de regresión jerárquica de los predictores.					
VARIABLE DE PREDICCIÓN	B	SBD	β	R ²	ΔR^2
				.492**	
Meses superv	-6.302	1.744	-.492		
				.599*	.117
Meses superv	-5.104	1.683	-.398		
Grado tumoral	-11.488	4.250	-.355		
				.663*	.081
Meses superv	-4.535	1.611	-.354		
Grado tumoral	-11.572	4.023	-.357		
Expresión Bax	-22.430	9.434	-.288		
** $p < 0.01$					
* $p < 0.05$					

Discusión

El objetivo del trabajo fue estudiar la relación que tiene la expresión del RNAm del gen de Bax en casos de astrocitomas pediátricos. Los resultados mostraron que el 48.1% de los casos fueron positivos a la expresión de Bax. Si se compara este porcentaje con otros encontrados en astrocitomas, principalmente de adultos que es donde más se ha trabajado, se observa que existe una gran variación de diferentes marcadores moleculares. Pueden ser tan elevados como la expresión de la esfingosin-cinasa-1 (Li et.al, 2008) en el 93.4%,

a tan bajos como 40% para la expresión de aurora B (Zheng et.al., 2007). Todos estos estudios han revelado la presencia de las proteínas por medio de inmunohistoquímica. Realmente existen muy pocos estudios que analizan la expresión de RNAm y todos se han realizado en astrocitomas de adultos. En este caso la variación en su expresión es del 79% para la survivina (Kajiwara et. al., 2003), hasta el 49% para la expresión del CDC25B (Nakabayashi et. al., 2006).

En este contexto nuestro 48.1% es comparable a los porcentajes encontrados en tumores de adultos. Sin embargo, este 48.1% que corresponde a 26 casos positivos a Bax, se incrementa considerando sólo los 31 casos donde se conoció la supervivencia. Porque fueron 20 de estos 26 que presentaron enfermedad recurrente y así corresponde a un 77% de casos que la expresión del RNAm del gen Bax identificó los casos recurrentes. Bax es un gen de expresión más general en muchos tipos celulares, esto puede explicar porque se encuentra en bajos porcentajes dentro de los astrocitomas, 48.1%; pero puede identificar en alto porcentaje a los recurrentes.

La clasificación de los astrocitomas de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud además permite proponer, con base en la experiencia acumulada en todos estos años, que el promedio de supervivencia posterior a la intervención quirúrgica es de 6 a 8 años para los pacientes con grado II, de 3 años para grado III y de menos de 1 año para grado IV (Louis et.al., 2007). En nuestro caso, los pacientes con astrocitomas de grados II y III y negativos a Bax vivieron el promedio de años propuesto por la OMS, pero cuando los tumores son positivos a Bax, los tiempos de supervivencia se reducen 4 y 3 veces, respectivamente (ver tabla 2). En este contexto, Rolhion y cols. (2001) encontraron que los pacientes con glioblastoma multiforme, si expresan el gen de la interleucina-6, viven sólo 6 meses, en contraste con la supervivencia de 16 meses en pacientes negativos a esta expresión.

Por su parte, Li y cols. (2010) comprobaron que la expresión de la integrina asociada a la cinasa 1 se incrementó hasta 5.6 veces en astrocitomas, comparada con la expresión observada en cerebro normal y efectivamente, está asociada a tiempos más cortos de supervivencia. Nakabayashi y cols. (2006) reportaron la duplicación en el tiempo

de supervivencia en pacientes con astrocitoma, cuando expresaron niveles bajos del mensajero de CDC25B, a más de 70 meses, que aquellos que lo expresaron en altas concentraciones lo que disminuye su supervivencia a 34 meses.

Conclusión

¿Cuál es el significado biológico de la expresión elevada del RNAm de Bax en los tumores que son recurrentes de los astrocitomas de los niños? No se tiene una respuesta directa. Lo que se debe recordar es que Bax es un factor proapoptótico que controla la apoptosis: es decir, en la medida en que se formen homodímeros Bax/Bax la respuesta global será muerte; el caso contrario resistencia a muerte (Lindsten et. al., 2005). La baja expresión de Bax está asociada a una progresión tumoral en corto lapso de tiempo en oligodendrogliomas en pacientes adultos (Deininger et. al., 1999). En este contexto, existen realmente muy pocos trabajos que describan la utilidad de marcadores pronósticos nuevos, de cómo se han descrito en adultos. Por ejemplo, se reporta que en glioblastomas pediátricos (grado IV), aquellos pacientes mayores de 3 años de edad al tener una expresión elevada de p53 se les asocia con peor pronóstico (Felix et. al., 1995). Así, la sobre-expresión o los niveles incrementados de algún biomarcador está asociada a mal pronóstico como sucede en nuestro estudio. Por ejemplo, Ganigi y cols. (2005) reportaron que la expresión de p53 y de bcl-2 está asociada a mal pronóstico en niños con glioblastomas. Otro ejemplo es el trabajo de Ray y cols. (2002) que observaron por medio de RT-PCR la expresión de Bax, analizando del centro del tejido tumoral hacia la periferia y encontraron cómo esta diferencia afecta la respuesta de apoptosis. Y en general en todos los estudios de astrocitomas de adultos, existe una tendencia de que la reducción o ausencia de expresión de la proteína de bax se asocia a un mal pronóstico y a menor supervivencia (Lindsten, 2005).

Existe una hipótesis propuesta por Mazurek y cols. (2001) que propone que cuando la relación de expresión Bcl-2/Bax es alta, existe la posibilidad de formar más heterodímeros bax-bcl-2 (proteínas) o más homodímeros bcl-2/bcl-2 (proteínas). Con base en lo anterior, se puede decir que la relación baja de Bcl-2/Bax se puede considerar como un factor

favorable de pronóstico y de respuesta a la quimio-radio-terapia en pacientes con astrocitomas de bajo grado (Mazurek, 2001).

La hipótesis de la relación de Bcl-2/Bax podría aplicar en nuestro caso. En 5/6 con tumor grado I y recurrentes, expresaron Bcl-2 y la relación de expresión fue de 1.9 a 8.38. Los 2 pacientes que fallecieron con un tumor grado I tuvieron 4.15 y 1.9 de relación de expresión de Bcl-2/Bax. Finalmente, en los casos de grado IV, los 4 casos positivos a Bax, y que fallecieron tuvieron una relación de expresión Bcl-2/Bax de 2.37, 6.18, 3.35 y 7.68 (resultados no publicados).

Los resultados de este trabajo tienen la limitante de no identificar a los glioblastomas multiformes (grado IV), pero se puede observar que este marcador es prometedor para los astrocitomas de bajo grado (I y II) e incluso los de grado III, que finalmente son grupos de pacientes que tienen más posibilidades de supervivencia y el hecho de identificar a aquéllos que serán recurrentes, resulta ser una gran aportación de este trabajo. Se está en este momento analizando la expresión de la proteína de bax mediante inmunohistoquímica, así como la expresión de bcl-2 con el objeto de correlacionar la expresión del RNAm de los dos genes con la expresión de las proteínas en estos casos. 

Agradecimientos

Se agradece a la Coordinación de Investigación de la Universidad Simón Bolívar el apoyo económico proporcionado para la realización del presente trabajo.

Referencias

Chico-Ponce de León, F., Castro-Sierra, E., Perezpeña-Díazconti, M., Gordillo-Domínguez, L., Santana-Montero, B., Rocha-Rivero, L., Vaca-Ruiz, M., Ríos-Alaniz, M., Sánchez-Herrera, F. y Valdés-Orduño, R. (2006). "Tumores intracraneanos del niño". En *Bol Med Hosp Infant Mex*. 63: 367-381.

Collins, V. (2004). "Brain tumors: classification and genes". En *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 75: 112-1111.

Deininger, M., Weller, M., Streffer, J. y Meyermann, R. (1999) "Antiapoptotic Bcl-2 family protein expression increases with progression of oligodendrogliomas". En *Cancer*. 86: 1832-1839.

Felix, C., Slavc, I., Dunn, M. et al. (1995). "p53 gene mutations in pediatric brain tumors". En *Med Pediatr Oncol*. 25: 431-436.

Ganigi, P., Santosh, V., Anandh, B., Chandramouli, B. y Sastry-Kolluri V. (2005), "Expression of p53, EGFR, pRband bcl-2 proteins in pediatric glioblastoma multiforme: a study of 54 patients". En *Pediatr Neurosurg*. 41: 292-299.

Kajiwara, Y., Yamasaki, F., Hama, S. et al. (2003) "Expression of surviving in astrocytic tumor. Correlation with malignant grade and prognosis". En *Cancer*. 97: 1077-1083.

Konstantinidou, A., Korkolopoulou, P. y Patsouris, E. (2005). "Apoptotic markers for primary brain tumor prognosis". En *J Neuro-Oncology*. 72: 151-156.

Li, J., Guan, H.-Y., Gong, L.-Y. et al. (2008). "Clinical significance of sphingosine kinase-1 expression in human astrocytomas progression and overall patient survival". En *Clin Cancer Res*. 14: 6996-7003.

Lindsten, T., Zong, W. y Thopson, C. (2005). "Defining the role of the Bcl-2 family of proteins in the nervous system". En *Neuroscientist*. 11: 10-15.

Louis, D., Ohgaki, H., Wiestler, O. et al. (2007). "The 2007 WHO classification of tumors of the central nervous system". En *Acta Neuropathol*. 114: 97-109.

Malla, R., Gopinath, S., Alapati, K., Gondi, Ch., Gujrati, M., Dinh, D., Mohanam, S. y Rao, J. (2010). "Downregulation of uPAR and Cathepsin B induces apoptosis via regulation of Bcl-2 and Bax and inhibition of the PI3K/Akt pathway in gliomas". En *PLoS ONE*. 39: e13731.

Mazurek, U., Bierzynska-Macyszyn, G., Gola, J., Orchel, J., Slowinski, J. y Wilczok, T. (2001). "BCL2 and BAX mRNA concentration profile in fibrillary astrocytoma". En *Folia Histochem Cytobiol*. 39:179-180.

Nakabayashi, H., Hara, M. y Shimizu, K. (2006). "Prognostic significance of CDC25B expression in gliomas". En *J Clin Pathol*. 59: 725-728.

Ohgaki, H. y Kleihues, P. (2007). "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma". En *Am J Pathol*. 170: 1445-1453.

Ray, S., Patel, S., Welsh, C., Wilford, G., Hogan, E. y Banik, N. (2002). "Molecular evidence of apoptotic death in malignant brain tumors including glioblastoma multiforme: upregulation of calpain and caspase-3". En *J Neurosci Res*. 69: 197-206.

Rolhion, C., Penault-Llorca, F., Kémény, J. et al. (2001). "Interleukin-6 overexpression as a marker of malignancy in human gliomas". En *J Neurosurg*. 94: 97-101.

Zeng, W., Navaratne, K., Prayson, R. y Weil, R. (2007). "Aurora B expression correlates with aggressive behavior in glioblastoma multiforme". En *J Clin Pathol*. 60: 218-221.

Zhu, Y. y Parada, L. (2002). "The molecular and genetic basis of neurological tumors". En *Nature Rev Cancer*. 2: 616-626.