

eman ta zabal zazu



Universidad
del País Vasco

Euskal Herriko
Unibertsitatea

La vía de regulación sonic hedgehog como
diana terapéutica en tumores pediátricos
malignos del sistema nervioso

Tesis Doctoral

Mónica Sánchez Sánchez

2017

A Hugo

AGRADECIMIENTOS

Todo mi agradecimiento al Dr. Javier Sáez Castresana, director de esta tesis, al Dr. Francisco Javier de la Rosa, por su enseñanza en el laboratorio y su labor en los experimentos in vivo, y a Manu, mi marido y mejor amigo, sin los cuales no podría haber hecho realidad este trabajo.

Muchas gracias, eternamente.

Mónica

INDICE

<u>RESUMEN</u>	27
<u>INTRODUCCIÓN</u>	31
<u>1 EL SISTEMA NERVIOSO</u>	33
1.1 Origen embrionario del sistema nervioso.....	33
1.1.1 Desarrollo y diferenciación de las células del tubo neural.....	34
1.1.2 Desarrollo y diferenciación de las células de la cresta neural.....	36
1.1.3 Desarrollo y diferenciación del sistema nervioso simpático.....	37
1.2 Las células madre en el sistema nervioso	38
1.2.1 Introducción.....	38
1.2.2 Células madre neurales y neurogénesis del sistema nervioso central.....	38
1.2.3 Células madre de la cresta neural y neurogénesis del sistema nervioso periférico.....	39
1.3 El cerebelo	41
1.3.1 Introducción.....	41
1.3.2 Desarrollo del cerebelo.....	41
1.3.3 Neurogénesis del cerebelo.....	42
<u>2 DESARROLLO DE LA VÍA SONIC HEDGEHOG</u>	42
2.1 Introducción.....	43
2.2 Componentes de la vía de señalización Shh	45
2.3 Activación de la vía de señalización Shh.....	51
2.4 Actividad aberrante de la vía Shh ligada al cáncer.....	53
2.5 Modelos de mantenimiento de la vía Shh	53
<u>3 TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO</u>	55
3.1 Clasificación de los tumores del sistema nervioso según la OMS.....	55
3.2 Tumores neuroblásticos de la glándula adrenal y del SNS.....	56
3.2.1 Neuroblastomas.....	57
3.2.1.1 Histopatología.....	58
a. NB indiferenciado.....	58
b. NB pobremente diferenciado.....	58
c. NB diferenciado.....	58

3.2.1.2	Tumorigénesis del neuroblastoma.....	60
3.2.1.3	Etiología.....	60
3.2.1.4	Diagnóstico.....	60
3.2.1.5	Alteraciones en los neuroblastomas.....	62
3.2.1.5.1	Alteraciones moleculares y cromosómicas.....	62
a.	Contenido de DNA.....	62
b.	Ganancia de 17q.....	63
c.	Amplificación de MYCN.....	63
d.	Pérdidas alélicas en 1p.....	64
e.	Pérdidas alélicas en 11q.....	64
f.	Actividad telomerasa.....	65
g.	Expresión de receptor de neurotrofina	65
3.2.1.5.2	Alteraciones de la vía Shh.....	66
3.2.1.6	Pronóstico y tratamiento.....	66
3.2.2	Ganglioneuroblastoma.....	67
a.	Ganglioneuroblastoma entremezclado.....	67
b.	Ganglioneuroblastoma nodular	67
3.2.3	Ganglioneuroma.....	68
a.	Ganglioneuroma en maduración.....	68
b.	Ganglioneuroma maduro.....	68
3.3	Meduloblastomas.....	69
3.3.1	Histopatología.....	70
3.3.1.1	Subtipos histológicos.....	70
a.	MB clásico.....	70
b.	MB anaplásico.....	70
c.	MB desmoplásico/nodular	71
d.	MB de células grandes.....	71
e.	MB con extensa nodularidad.....	71
3.3.1.2	Grupos moleculares.....	72
a.	Grupo Wnt.....	73
b.	Grupo Shh.....	73
c.	Grupo 3.....	74
d.	Grupo 4.....	75
3.3.2	Tumorigénesis del meduloblastoma.....	75

3.3.3 Etiología.....	77
3.3.4 Diagnóstico.....	77
3.3.5 Alteraciones en los meduloblastomas.....	78
3.3.5.1 Alteraciones citogenéticas y moleculares.....	78
3.3.5.2 Alteraciones de la vía Shh.....	78
3.3.6 Pronóstico y tratamiento.....	79

OBJETIVOS.....83

MATERIAL Y MÉTODOS..... 87

1 MUESTRAS.....89

1.1 Líneas celulares 89

1.2 Cultivo celular.....89

2 EXPRESIÓN GÉNICA ANALIZADA MEDIANTE RT-PCR Y PCR A

TIEMPO REAL..... 89

2.1 Extracción de RNA y tratamiento con DNAsa en líneas celulares..... 90

2.2 Retrotranscripción 90

2.3 Condiciones de la RT-PCR..... 91

2.4 PCR a tiempo real..... 91

3 AMPLIFICACIÓN DEL GEN MYCN..... 92

3.1 Extracción del DNA genómico..... 92

3.2 PCR a tiempo real..... 92

3.3 Método de cuantificación..... 92

4 METILACIÓN..... 93

4.1 Introducción..... 93

4.2 Extracción del DNA..... 94

4.3 Tratamiento con bisulfito..... 94

4.4 MCA-Met en tiempo real..... 94

4.5 Tratamiento de desmetilación con 5-Aza-2' desoxicitidina..... 96

4.6 Estudio de la re-expresión mediante qRT-PCR..... 97

4.7	Análisis de los datos.....	97
5	<u>TRATAMIENTOS CELULARES</u>	97
5.1	Tratamiento con ciclopamina.....	97
5.2	siRNA contra GLI1.....	98
6	<u>PROLIFERACIÓN CELULAR</u>	99
7	<u>FORMACIÓN DE COLONIAS EN AGAR BLANDO</u>	99
8	<u>EXPERIMENTO IN VIVO</u>	100
8.1	Líneas celulares.....	100
8.2	Tratamiento de las líneas celulares con ciclopamina.....	100
8.3	Tratamiento de las líneas celulares con siRNA contra GLI1.....	100
8.4	Xenotrasplante.....	101
9	<u>TABLAS DE MATERIALES Y MÉTODOS</u>	103

RESULTADOS111

1	<u>CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES</u>	113
1.1	Expresión de genes Shh en líneas celulares.....	113
1.1.1	Neuroblastomas.....	113
1.1.2	Meduloblastomas.....	114
1.2	Amplificación génica de MYCN.....	115
1.2.1	Neuroblastomas.....	115
1.2.2	Meduloblastomas.....	116
1.3	Análisis de metilación de promotores.....	116
1.3.1	MCA-Met.....	117
1.3.2	Tratamiento de desmetilación con 5-Aza-2'-desoxicitidina.....	117
1.3.3	Análisis de expresión de HHIP tras el tratamiento con 5-Aza-2'-desoxicitidina.....	118

2 INHIBICIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN Shh MEDIANTE CICLOPAMINA..... 118

2.1	Expresión de GLI1	118
2.2.1	Inhibición de la vía Shh en líneas celulares de neuroblastoma.....	118
2.2.2	Inhibición de la vía Shh en líneas celulares de meduloblastoma.....	119

2.2 Efecto del tratamiento con ciclopamina en la viabilidad celular.....	119
2.2.1 Proliferación celular en líneas celulares de neuroblastoma.....	119
2.2.2 Proliferación celular en líneas celulares de meduloblastoma.....	120
2.3 Clonogenicidad in vitro tras el tratamiento con ciclopamina.....	121
2.3.1 Colonias en agar blando en líneas celulares de neuroblastoma.....	121
2.3.2 Colonias en agar blando en líneas celulares de meduloblastoma.....	121
2.4 Efecto de la inhibición de la vía Shh mediante siRNA contra GLI1.....	122
2.5 Análisis estadísticos.....	124
2.6 Experimento in vivo.....	124

DISCUSIÓN..... 129

1 CARACTERIZACIÓN DE LAS LÍNEAS CELULARES..... 131

1.1 Neuroblastomas y meduloblastomas..... 131

1.2 Amplificación de MYCN..... 132

1.3 Metilación de promotores en genes supresores de tumores 133

1.3.1 HHIP..... 133

1.3.2 SUFU..... 133

2 INHIBICIÓN DE LA VÍA Shh..... 133

2.1 Viabilidad celular..... 134

2.2 Formación de colonias en agar blando..... 134

3 TUMORIGÉNESIS IN VIVO..... 135

4 OTRAS POSIBILIDADES DE INHIBICIÓN DE LA VÍA Shh..... 135

CONCLUSIONES..... 143

BIBLIOGRAFÍA..... 147

ANEXOS..... 167

ANEXO I: Abreviaturas 169

ANEXO II: Referencias de productos fungibles..... 173

ANEXO III: Relación de tablas..... 175

ANEXO IV: Relación de figuras..... 177

ANEXO V: Clasificación de la OMS 179

RESUMEN

La presente tesis propone el estudio de la vía de regulación sonic hedgehog en tumores pediátricos malignos, como son el meduloblastoma y el neuroblastoma. El tema de estudio se introduce mediante una descripción del desarrollo del sistema nervioso, diferenciando el origen neuroectodérmico del meduloblastoma, del origen de los neuroblastomas a partir de la cresta neural. Posteriormente se especifican los genes reguladores más importantes de la vía sonic: GLI, SMO, PTCH, SUFU y HHIP, así como la localización celular y la función de las proteínas codificadas por esos genes. Los dos primeros codifican proteínas que actúan como reguladoras positivas de la vía, mientras que los tres últimos codifican proteínas supresoras tumorales. La hiperactividad de la vía sonic se asocia al desarrollo de diversos tipos de cáncer, entre ellos los sujetos a estudio en esta tesis.

Tras revisar las alteraciones genéticas más importantes de estos tumores, se pasó al estudio experimental, que constó de las siguientes fases: 1) Expresión de los genes asociados a la vía sonic, incluyendo el estado de metilación de los promotores de los genes supresores tumorales. 2) Modelo de inhibición in vitro de la vía sonic, mediante ciclopamina, que actúa inhibiendo a SMO, y mediante siRNA contra GLI. 3) Respuesta celular a la inhibición de la vía sonic, atendiendo principalmente a la viabilidad celular y a la clonogenicidad en agar blando. 4) Modelo in vivo de xenotrasplante de células tratadas in vitro, y no tratadas, a ratones inmunodeprimidos.

Los resultados del trabajo apuntan hacia las siguientes conclusiones: 1) La vía sonic hedgehog está activa en meduloblastomas y neuroblastomas, como se mostró a través del análisis de expresión de sus reguladores más comunes, y mediante el estudio epigenético de algunos de los genes supresores de tumores. 2) La inactivación de la vía indujo una caída en la viabilidad celular y en la clonogenicidad en agar blando, lo cual es indicativo de una disminución de la tumorigenicidad in vitro en las células tratadas. 3) El modelo de xenotrasplante mostró que la ciclopamina fue capaz de reducir eficazmente la tumorigénesis in vivo de las líneas de meduloblastoma DAOY y D283Med en ratones inmunodeprimidos, mientras que DAOY mostró una menor reducción de crecimiento tumoral que D283Med tras el tratamiento con siRNA.

INTRODUCCIÓN

1 EL SISTEMA NERVIOSO

1.1 Origen embrionario del sistema nervioso

El sistema nervioso humano se divide en dos subsistemas con diferentes funciones: el sistema nervioso central (SNC) y el sistema nervioso periférico (SNP).

El SNC es el centro de procesamiento principal del cuerpo humano. Controla y coordina los procesos intelectuales y todas las actividades conscientes e inconscientes que llevamos a cabo en respuesta a diferentes estímulos.

El SNP se subdivide en dos subsistemas:

- Sistema nervioso somático-sensorial, responsable de nuestras actividades conscientes en relación con el medio ambiente externo y de nuestras acciones motoras.
- Sistema nervioso autónomo, responsable de nuestras actividades inconscientes, manteniendo en un nivel constante la homeostasis del medio interno: la presión sanguínea, la función cardíaca y respiratoria, la temperatura corporal o la secreción glandular, entre otras.

El crecimiento neural es uno de los programas del desarrollo embriológico más temprano y, sin embargo, el último en ser completado tras el nacimiento. Así, tras la fecundación de un óvulo por un espermatozoide se produce una serie de rápidas divisiones y, en el comienzo de la tercera semana del desarrollo embrionario, aparece en la región dorsal media del embrión la denominada *placa neural*. Posteriormente sus bordes laterales se elevan y forman los *pliegues neurales* que continuarán elevándose y acercándose a la línea media hasta fusionarse constituyendo el *tubo neural*.

El tubo neural se polariza dorsoventralmente de tal modo que se producirá una diferenciación celular en la región dorsal distinta a la de la región ventral. Entre las estructuras dorsales se incluirán la *placa del techo* y la *cresta neural*, constituyendo esta última una estructura separada y discreta que tan solo perdura en etapas tempranas del desarrollo, mientras que las estructuras ventrales darán lugar a la *placa del suelo* y a las *neuronas motoras*¹.

Así, a pesar de un origen embrionario común, el tubo neural y la cresta neural darán lugar a diferentes componentes del organismo (Figura 1).

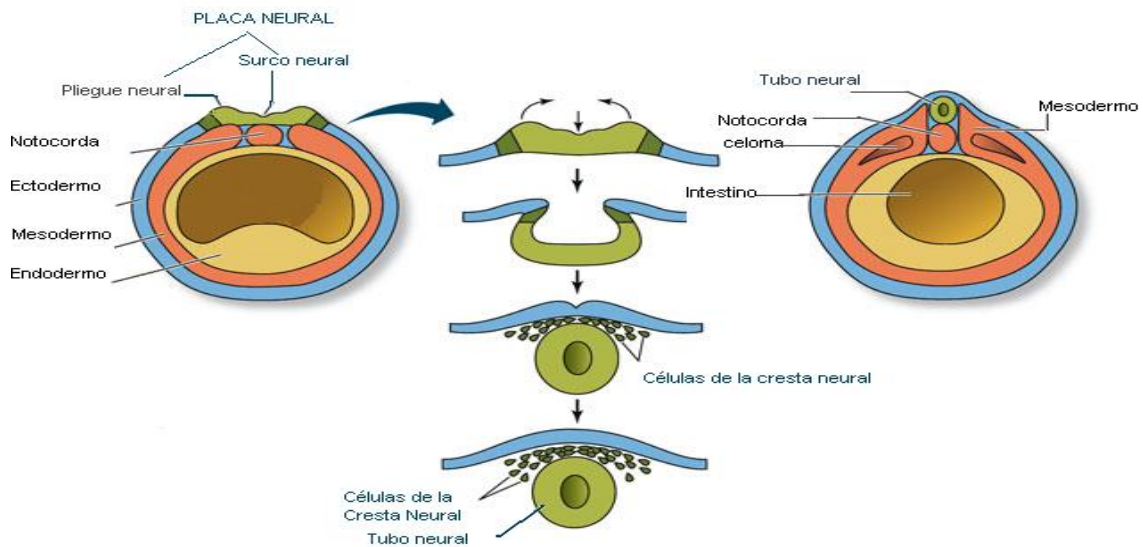


Figura 1. Formación del tubo neural y de la cresta neural (obtenida de Life: The Science Biology, 8ª edición, 2007)

1.1.1 Desarrollo y diferenciación de las células del tubo neural

En los extremos caudal y craneal del tubo neural la fusión se retarda presentando unos *neuroporos* que se obliteran unos días más tarde. En el extremo cefálico del tubo neural se formarán tres dilataciones, las *vesículas encefálicas primarias*: 1) **prosencefalo** o cerebro anterior, que a las cinco semanas estará formado a su vez por una sección anterior, el *telencefalo*, con dos evaginaciones laterales, *los hemisferios cerebrales*, los cuales formarán los ventrículos laterales (primer y segundo ventrículo) quienes darán lugar al cuerpo estriado - caudado y putamen -, el hipocampo y al neocórtex; y que se comunican por medio de los *agujeros interventriculares de Monro* con la sección posterior, *el diencefalo* (tercer ventrículo), que formará el subtálamo, el hipotálamo, el tálamo y el epitálamo; 2) **mesencefalo** o cerebro medio (vesícula intermedia); y 3) **rombencefalo** o cerebro posterior, dividido en *metencefalo*, que más adelante dará lugar a la *protuberancia* y al *cerebelo*, y en *mielencefalo*, quien conformará el bulbo raquídeo.

En su interior el tubo neural se divide en el *conducto del epéndimo o central*, constituyendo la que será la luz de la médula espinal; el *cuarto ventrículo* -luz del

rombencéfalo-; el *tercer ventrículo* -luz del diencefalo- ; y los *ventrículos laterales* - luz de los hemisferios cerebrales- (Figura 2).

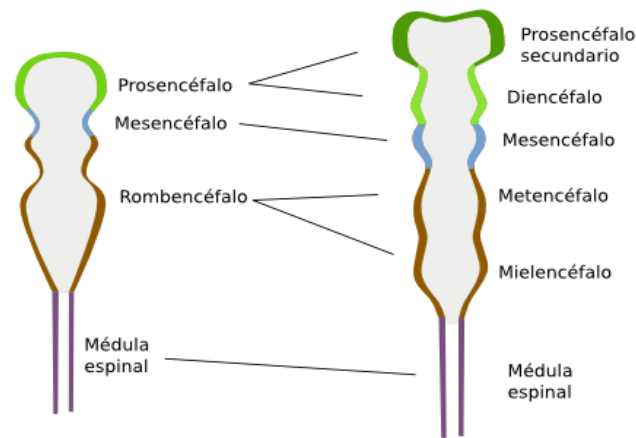


Figura 2. Formación de las vesículas encefálicas a partir del tubo neural rostral (obtenida del Atlas de Histología Vegetal y Animal, El Sistema Nervioso Central, Facultad de Biología, Universidad de Vigo, 2016)

La pared del tubo neural está dividida en dos zonas: una zona *ventricular o capa del manto* - adyacente a la luz del tubo - formada por *células neuroepiteliales*, que se extienden formando un grueso epitelio llamado *neuroepitelio o capa neuroepitelial*. Una vez cerrado el tubo neural, comienzan a dar lugar a unos nuevos tipos celulares primitivos: *neuroblastos*, *astroblastos*, *oligodendroblastos* y *ependimoblastos*, que posteriormente se diferenciarán en neuronas, astrocitos, oligodendrocitos y ependimocitos respectivamente y más adelante formarán la *sustancia gris*. Por la continua adición celular a la capa del manto se observarán unos engrosamientos ventrales o *placas basales*, que forman las áreas motoras; los engrosamientos dorsales son las *placas alares*, y constituyen las áreas sensitivas. La otra zona, más externa, es denominada *capa marginal*: carece de núcleos y en ella se distinguen las prolongaciones celulares que, como consecuencia de la mielinización adquirirán un aspecto blanco y constituirán la *sustancia blanca*¹.

El SNC está cubierto por tres capas contiguas de tejido conectivo, *las meninges*, llamadas *duramadre*, *membrana aracnoidea* y *piamadre*, estando el espacio entre estas dos últimas capas lleno de *líquido cefalorraquídeo*.

1.1.2 Desarrollo y diferenciación de las células de la cresta neural

Durante la invaginación de la placa neural aparece un grupo de células que se originan entre el límite de dicha placa, a ambos lados del surco neural, y el ectodermo no neural gracias a una inducción producida entre ambos tejidos² (Figura1). Así, los precursores que tienen el potencial para formar la cresta neural están en principio contenidos dentro de la porción dorsal del tubo neural³ y tienen origen ectodérmico siendo denominadas *células de la cresta neural*, las cuales gracias a sus propiedades pluripotentes se diferenciarán en muy diversos tipos celulares: neuronas (como las del SNP simpático y parasimpático), células gliales (como las células de Schwann, importantes en la mielinización de los nervios periféricos), melanocitos, odontoblastos, células endocrinas (como las células cromafines de la médula adrenal) y células mesenquimales (las cuales reciben la denominación de “mesoectodermo” o “ectomesénquima” en oposición a aquellas derivadas del mesodermo)⁴. Es decir, diferentes sistemas como son la piel, los dientes, las glándulas adrenales, huesos y tejidos blandos de cabeza y cuello⁵, el tracto gastrointestinal y el tejido neural participan de un mismo origen celular, lo cual conlleva profundas implicaciones para la comprensión de los tumores denominados PNET (Primitive Neuro-Ectodermal Tumors) o tumores neuroectodérmicos primitivos que si bien son poco frecuentes son muy agresivos. Resulta, por tanto, importante la función de la cresta neural. Incluso ha llegado a ser denominada “la cuarta capa germinal”⁶.

Podemos dividir las células de la cresta neural en al menos cuatro poblaciones axiales diferentes (craneal, cardíaca, vagal y troncular) cada una de la cuales migrará a lo largo de una única vía y contribuirá a un único tipo celular y tisular específico, que será distinto para cada nivel axial. En la región craneal se producirá una migración dentro de los arcos faríngeos formando el *ectomesénquima*, contribuyendo a la formación de tejidos en una zona del cuerpo que característicamente contiene derivados del mesodermo (cartílago, hueso y tejido conectivo) (Figura 3).

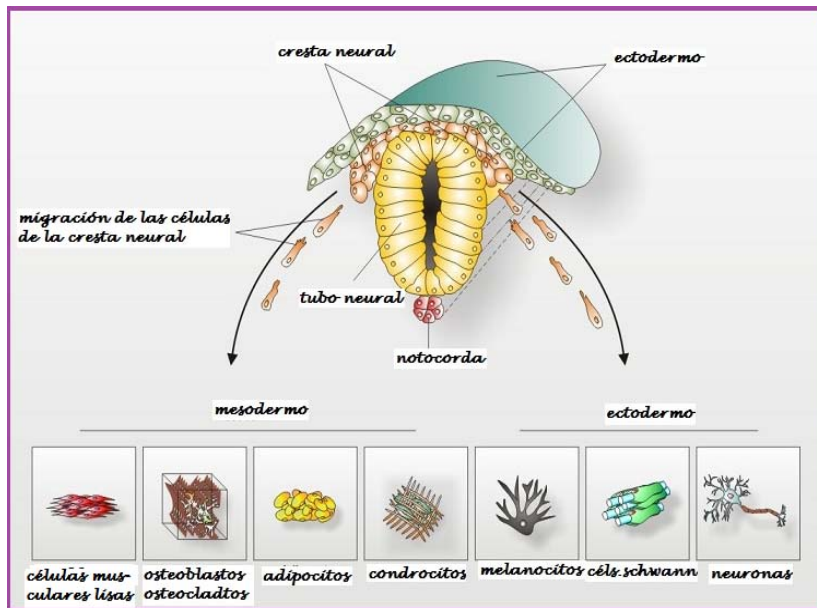


Figura 3. Migración y diferenciación de las células de la cresta neural a lo largo de la vía ventral desde el tubo neural dorsal (obtenido de Stem Cell Rev 2012, 8(3):658-71).

1.1.3 Desarrollo y diferenciación del sistema nervioso simpático

En el curso de la quinta semana del desarrollo del embrión algunas células pluripotenciales derivadas de la porción torácica de la cresta neural emigran a cada lado de la médula espinal hacia la región situada inmediatamente por detrás de la aorta dorsal, constituyendo los dos cordones simpáticos primitivos a cada lado de la columna vertebral. Desde su posición en el tórax, los neuroblastos emigran hacia las regiones cervical y lumbosacra, extendiendo las cadenas simpáticas. Algunos neuroblastos simpáticos migran por delante de la aorta y forman los *ganglios preaórticos*, como los *celíacos* y los *mesentéricos*. Otros emigrarán hacia el corazón, los pulmones y el aparato gastrointestinal dando origen a los *plexos viscerales simpáticos*. Una subpoblación de estas células invade la cara medial de la corteza primitiva de la glándula suprarrenal dando origen a la médula de la misma¹, y dicha subpoblación adquiere la capacidad de responder a los glucocorticoides y, bajo la influencia de estas hormonas, van perdiendo los rasgos neuronales y adquiriendo la expresión de marcadores endocrinos. Este período se caracteriza por un gran crecimiento y apoptosis neuronal.

Todos estos procesos biológicos están modulados por las interacciones con las dianas tisulares inervadas, ya que únicamente las neuronas inmaduras que establecen conexiones con las estructuras orgánicas dianas desarrollarán la diferenciación

progresiva, adquiriendo maduración neuronal o el fenotipo celular cromafínico, caracterizados por el establecimiento de conexiones sinápticas y la síntesis y liberación de los neurotransmisores específicos. Los neuroblastos que no consiguen interconectarse con los órganos dianas experimentan la muerte celular programada por el fenómeno de la apoptosis⁷.

1.2 Las células madre en el sistema nervioso

1.2.1 Introducción

Las células madre se caracterizan por su capacidad de **autorregeneración** mediante divisiones celulares mitóticas, asimétricas y simétricas, y por ser células con capacidad de **diferenciación multilinaje**, es decir, pueden ser totipotenciales, como las del cigoto que constituyen el embrión o el trofoblasto de la placenta; pluripotenciales que se pueden diferenciar en casi todos los tipos celulares que surgen de las tres capas germinales; o multipotenciales que darán lugar a una diferenciación celular limitada en función de su localización⁸.

Las células madre pluripotenciales del sistema nervioso neural se pueden dividir en *células madre neurales* (CMN), que se localizarán en el SNC, y en *células madre de la cresta neural* (CMCN), que lo harán en el SNP y en otros tejidos, compartiendo características con las primeras, ya que, como ya se ha indicado, las células de la cresta neural tienen su origen en algunas células del tubo neural.

1.2.2 Células madre neurales y neurogénesis del sistema nervioso central

Las células madre neurales (CMN) tienen la capacidad de diferenciarse en neuronas, células de la astrogliá y de la oligodendroglía⁹, por lo que pueden dirigir los procesos neurogenéticos durante el desarrollo y maduración del SNC. De este modo, durante las fases tempranas del desarrollo embrionario del SNC las CMN experimentan divisiones simétricas que mantienen la población de células madre y, posteriormente, durante la fase neurogénica, pasan a dividirse asimétricamente con el objeto de producir más células madre y precursores de la proliferación, principalmente pertenecientes al linaje neural, que migran a sus localizaciones específicas dando lugar a todas las células del SNC. Tras esto se produce un descenso del número de CMN, aunque una pequeña cantidad permanece en regiones concretas¹⁰.

En la década de los sesenta Joseph Altam describió la neurogénesis en algunas áreas del cerebro postnatal y adulto de la rata aunque las CMN del cerebro del ratón adulto no fueron aisladas hasta 1992¹¹ momento a partir del cual ésta se describió en varios mamíferos, incluido el ser humano¹². Así, la neurogénesis persiste en la vida adulta fundamentalmente en la zona subgranular del giro dentado del hipocampo, cumpliendo un papel importante en la memoria témporo espacial, y en la que es la mayor región neurogénica del adulto, la zona subventricular (ZSV) de los ventrículos laterales del prosencéfalo desde donde migran hacia el bulbo olfatorio en el caso de los mamíferos mientras en el ser humano su destino es desconocido, aunque en el cuerpo estriado adyacente a él se sabe que se produce neurogénesis¹³ (Figura 4).

La consecuencia principal de este hecho es la presencia de células indiferenciadas, células madre mitóticamente activas y progenitores celulares dentro de esas regiones cerebrales específicas, pudiendo contribuir posteriormente a la formación de células tumorales.

1.2.3 Células madre de la cresta neural y neurogénesis del sistema nervioso periférico

Una vez que se han formado las células de la cresta neural, éstas sufren un proceso de inducción en el cual la disminución en la expresión de las moléculas de adhesión celular como la E-cadherina promueve la delaminación o salida de las células de la cresta neural desde la placa neural, al mismo tiempo que tiene lugar el comienzo de la migración celular hacia el cuerpo¹⁴ siguiendo vías precisas. Así, las cuatro poblaciones axiales -craneal, cardíaca, vagal y troncular- migran a lo largo de estas únicas vías, como ya se señaló en el punto 1.1.2.

Desde el punto de vista de la biología de las células madre, las células de la cresta neural representan una fuente de células madre pluripotenciales en el adulto¹⁵ por lo que resulta de gran interés saber si las células de la cresta neural individualmente son pluripotenciales o si, por el contrario, la mayoría de estas células son restringidas, ya sea al principio de la migración o poco después. Los datos hasta la fecha apuntan hacia un número restringido de células con capacidad pluripotencial¹⁴ existiendo diversos tipos identificados en un número creciente de tejidos adultos en animales y seres humanos como es el caso del sistema nervioso entérico, la córnea, los folículos pilosos y la piel^{14, 16, 17}. Asimismo, cuando las células madre de la cresta neural se han diferenciado tras los estadios postmigratorios, exhiben una plasticidad fenotípica, como las células

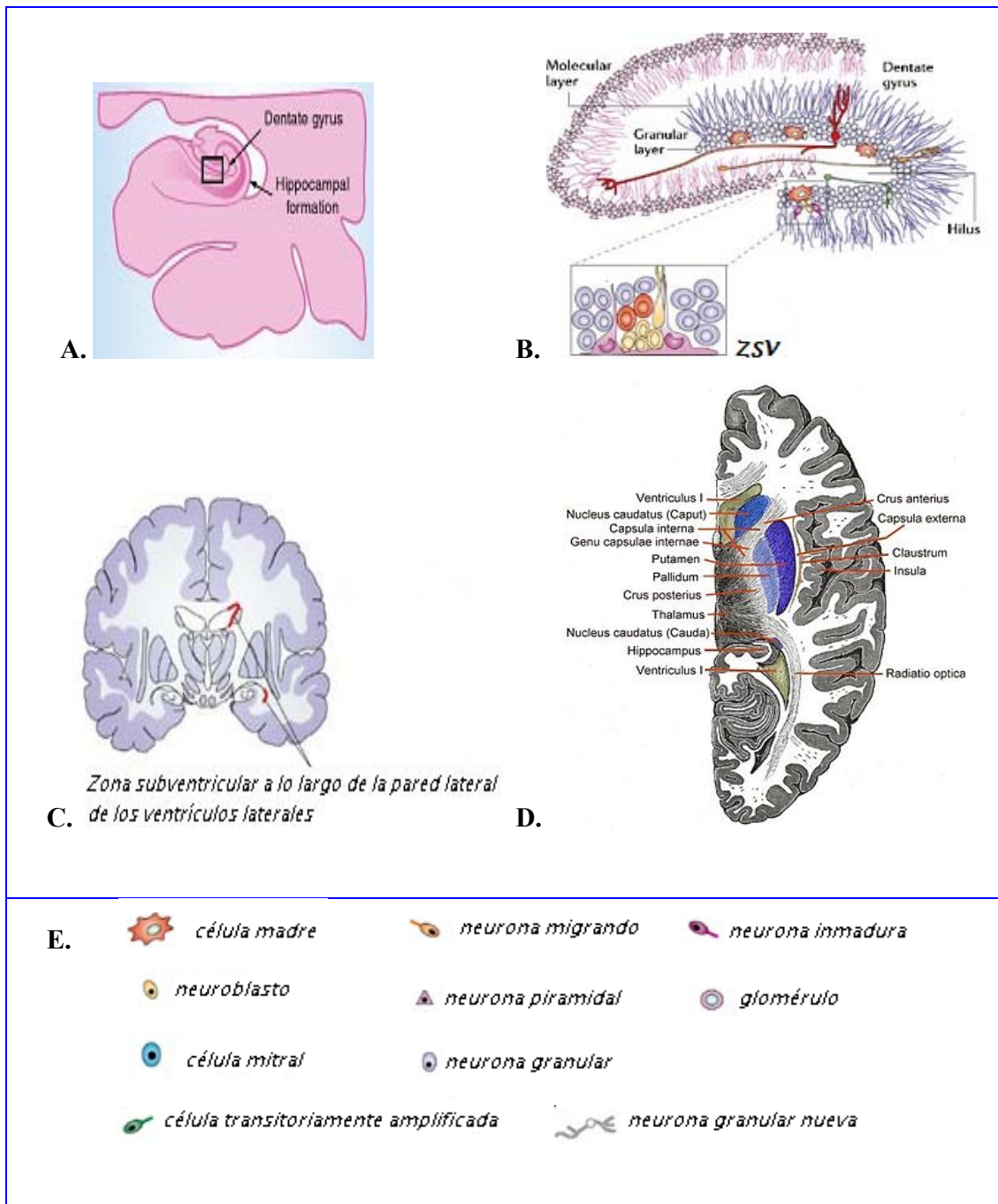


Figura 4. Zonas de actividad neurogénica en el cerebro adulto. (obtenido y adaptado de Nature Reviews Cancer 2006, 6(6):425-36).

- A. Localización del giro dentado del hipocampo.
- B. Giro dentado que contiene un área neurogénica, la Zona Subgranular, y ZSV.
- C. Localización de la ZSV en los ventrículos laterales.
- D. Sección horizontal del cuerpo estriado.
- E. Tipos celulares implicados en la maduración del SNC.

epidérmicas y las células de Schwann de los nervios periféricos que, en cultivos celulares aislados, son capaces de revertirse en progenitores pluripotenciales de la cresta neural dotadas de autorregeneración^{18, 19}, lo que sugiere una potencial función para repararse²⁰.

De todo ello se deduce que, la existencia de dichas células en tejidos adultos sumada a la capacidad de los progenitores para adquirir nuevamente fenotipos pluripotenciales, podría ser la causa de algunos tipos tumorales aparentemente no relacionados entre sí.

1.3 EL CEREBELO

1.3.1 Introducción

Situado en la fosa craneal posterior, dorsal al tronco del encéfalo e inferior al lóbulo occipital, el cerebelo constituye tan solo el 10 % del total del volumen cerebral y, sin embargo, lo conforman muchas más neuronas que en el resto del encéfalo²¹. Su función es la de ser el centro de la coordinación postural y motora. Así mismo, está implicado en una serie de funciones cognitivas y afectivas, las cuales dependen de interacciones precisas entre, al menos, cinco tipos de neuronas. De éstas, las más abundantes son las *células granulosas* (neuronas secretoras de glutamato) que, a su vez, son reguladas por la actividad de las células de Purkinje que transmiten señales desde el cerebelo a otras partes del cerebro²².

1.3.2 Desarrollo del cerebelo

El cerebelo se desarrolla a partir de las porciones dorsolaterales de las placas alares del metencéfalo que se curvan en sentido medial y forman los labios rómbicos, quienes en la porción caudal del metencéfalo están muy separados, pero inmediatamente por debajo del mesencéfalo se acercan en la línea media, quedando comprimidos en dirección céfalocaudal y formando la *placa cerebelosa*. Esta placa presenta una pequeña formación en la línea media, el *vermis*, y dos porciones laterales, los *hemisferios cerebelosos*¹.

Tras la formación de la estructura cerebelosa existen dos compartimentos germinativos, la *zona ventricular* (ZV) localizada en el techo del cuarto ventrículo y los *labios rómbicos* (LR).

1.3.3 Neurogénesis del cerebelo

La neurogénesis en el cerebelo está estrictamente compartimentalizada. Los progenitores de la ZV alcanzan a neuronas GABAérgicas y los de los LR a células glutamatérgicas²³ generándose, de este modo, diferentes categorías neuronales dependiendo de la etapa del desarrollo.

Las neuronas desde los núcleos cerebelosos profundos -como el núcleo dentado- y de la corteza cerebelosa son las primeras liberadas en los inicios de la neurogénesis, lo que incluye a las neuronas glutamatérgicas de los núcleos profundos derivadas de los LR, las proyecciones neuronales GABAérgicas de los núcleos olivares y las células de Purkinje derivadas de la ZV. Las interneuronas locales de ambos fenotipos de neurotransmisores se forman durante la última etapa de la embriogénesis y el desarrollo postnatal temprano. Finalmente, tanto los progenitores de los LR como los de la ZV, alcanzan a las neuronas que pueblan el cerebelo adulto mediante migraciones secuenciales²³.

Algunas de las células del neuroepitelio emigran hacia la superficie del cerebelo y forman la *capa granulosa externa* (CGE) que, en el sexto mes del desarrollo comienza a liberar diversos tipos celulares: las células en cesta, estrelladas y granulosas. Durante este período la CGE se expande gracias a la acción de la proteína Shh secretada por las células de Purkinje²⁴ aunque dicha actividad gradualmente va cesando hasta que estas células postmitóticas migran hacia el interior, hacia la *capa granulosa interna* (CGI) donde frenan su actividad para finalizar su proceso de maduración durante las primeras semanas postnatales.

2 DESARROLLO DE LA VÍA SONIC HEDGEHOG

Existen evidencias de que los mismos mecanismos que controlan la neurogénesis de las CMN y CMCN, es decir, la autorrenovación y la diferenciación, se hallan implicados en la formación de los tumores del SN. La malignidad tumoral puede adquirirse o mantenerse en un estado de células madre que poseen características de replicación ilimitada y autorrenovación. Los programas de desarrollo Sonic Hedgehog (Shh), Notch y Wnt/ β catenina juegan un papel muy importante en la determinación de las células madre y la renovación de diversos tejidos y, del mismo modo, la alteración de dichas vías parece ser un tema recurrente en la tumorigénesis embrionaria²⁵, como sucede en los MB y NB.



Figura 5. Estructura tridimensional del dominio de señalización de Shh (obtenido de Hall, T.M y cols, Nature 1995, 378(6553):212-6).

2.1 Introducción

El gen *hedgehog* (*erizo*) original se halló en *Drosophila* y su nombre se debe a la apariencia del fenotipo mutante que daba origen a un embrión cubierto de denticulos puntiagudos con aspecto de un erizo. Presenta tres formas o ligandos homólogos en los mamíferos: *Sonic (Shh)*, *Indian (Ihh)* y *Desert (Dhh)* *Hedgehog* -cuyos nombres están referidos al popular personaje de un vídeo juego de Sega el primero y los siguientes a dos especies de erizo²⁶-. Las proteínas Shh (Figura 5) son secretadas por las células, como las de Purkinje en el cerebelo, y actúan tanto de modo paracrino como autocrino en las células diana. Dichas proteínas tienen dos unidades funcionales:

- N-terminal 19 kDa (amino-terminal) o Shh-N con actividad señalizadora²⁷ es la porción soluble y se ha observado que permanece asociada a la superficie celular^{27, 28}
- C-terminal 25 kDa (carboxi-terminal) o Shh-C con propiedad autocatalítica²⁹, cuya función es desconocida, y que difunde libremente en la célula^{27, 28}.

La vía de señalización Ihh juega un rol durante la osificación endocronal y la diferenciación condral, de modo que su mutación sin sentido heterocigótica se relaciona con la braquidactilia A1 caracterizada por la ausencia o acortamiento de las falanges medias de los dedos³⁰ y su mutación en homocigosis está asociada a la displasia acrocápito-femoral, una enfermedad ósea recientemente descrita que se caracteriza por

una estatura corta con extremidades acortadas y epífisis cónicas apreciables radiográficamente principalmente en manos y caderas³¹.

La vía de señalización Dhh se relaciona con la diferenciación gonadal y el desarrollo perineural estando por ello asociada su mutación homocigótica a la disgenesia gonadal parcial acompañada de polineuropatía miofascicular³².

La vía de señalización Shh es un sistema altamente conservado cuyo gen es el más ampliamente estudiado entre los de la familia hedgehog de los vertebrados. Participa en la regulación de la formación y supervivencia de las células progenitoras en el desarrollo embrionario animal orquestando la comunicación entre diferentes tipos celulares, su proliferación, diferenciación y especialización³³. Se requiere su participación en el establecimiento de varios órganos como el cerebro, pulmón, piel, próstata, intestino y extremidades. En concreto en el desarrollo del cerebelo los precursores de las células granulares precisan de proteína Shh para su proliferación durante el período perinatal. También la vía Shh controla el desarrollo del crecimiento del cerebro ventral/corteza cerebral³⁴.

Tras el nacimiento, la vía Shh permanece activa en aquellos lugares en los que continúa la renovación de los tejidos en el adulto y durante los procesos de daño y reparación³⁵. Es por ello que algunos síndromes humanos son debidos a alteraciones genéticas que afectan a los genes de esta vía³⁶, como alteraciones esqueléticas, espina bífida oculta, manchas palmares/plantares, o queratoquistes mandibulares, lo cual es reflejo de la importancia de la vía durante el desarrollo. Del mismo modo, en la evolución se ha producido una selección positiva dando como resultado un mayor crecimiento del cerebro en comparación con otras especies de primates³⁷.

Los diferentes tejidos y órganos requieren distintos niveles de expresión de Shh en diversos estadios para el desarrollo normal y su funcionalidad, por lo que cualquier alteración de la actividad de la vía puede derivar en alteraciones de los mismos a nivel de control del desarrollo, como la holoprosencefalia causada por la falta de división del lóbulo frontal del cerebro del embrión para formar los hemisferios cerebrales bilaterales (las mitades izquierda y derecha del cerebro), causando defectos en el desarrollo de la cara y en la estructura y el funcionamiento del cerebro. Así, se ha visto que, en los embriones mutantes de ratón Shh^{-/-} se produce una forma dominante de holoprosencefalia, con ciclopía y fusión de los hemisferios cerebrales, mientras que los

ratones Shh^{+/-} no la padecen. Así mismo, alteraciones aparentemente no relacionadas, como la microftalmia colobomatosa no sindrómica o el síndrome de incisivo central maxilar único³⁶, pueden asociarse a múltiples anomalías de la línea media, como la holoprosencefalia^{34,38}, asociándose así con alteraciones genéticas de Shh.

Del mismo modo, las mutaciones que reactivan inapropiadamente la señalización Shh, cuando ha cesado el período crítico de organogénesis y debería haber cesado definitivamente su actividad, están ligadas al desarrollo de diferentes tumores³⁹.

2.2 Componentes de la vía de señalización Shh

En la Tabla 1 se muestran las principales acciones de los diferentes genes de la vía de señalización Shh y sus repercusiones clínicas.

- **Ptch1 (Patched1)** es un receptor que presenta 12 dominios transmembrana y se une a cualquiera de los tres ligandos Hh (Shh, Ihh y Dhh) con igual afinidad en mamíferos. Su gen correspondiente se localiza en el locus 9q22.3. Su función es inhibir a SMO por medio de un mecanismo que no es conocido con exactitud, si bien se sugiere que se produce algún tipo de cambio conformacional^{40,41}. Se ha aludido a la posibilidad de que Ptch1 desplace a la 3 β -hidroxiesteroide Pro-vitamina D3, que estando ligada a Smo le inhibe⁴⁰. De hecho, la adición exógena de Pro-vitamina D3 es un inhibidor más potente de Smo que la ciclopamina⁴⁰. Sin embargo, los inhibidores de la vía Shh basados en la vitamina D3 también interactúan con las acciones propias de esta vitamina, por lo que para su uso terapéutico se están evaluando análogos de la vitamina D3 que contienen un anillo A aromático que muestra una potencia y selectividad mejorada frente a la señalización de Shh⁴².

PTCH1 actúa como un **gen supresor tumoral** de esta vía, siendo también uno de los genes diana regulados por Gli1^{43,44}.

En ratones se ha visto que los heterocigotos PTCH1-mutantes presentan anomalías similares a los pacientes con síndrome de Gorlin (la tríada clásica de esta enfermedad hereditaria de carácter autonómico dominante son la presencia de múltiples nevus, queratoquistes odontogénicos e hiperqueratosis palmoplantar)⁴⁵.

- **SMO (Smoothed)** es un receptor con 7 dominios transmembrana, del tipo GPCR (receptor acoplado a proteínas G), esencial para la activación de la vía Shh y conservado desde las moscas a los humanos, localizándose en el cromosoma 7p32.3. Antes de ser activada la vía Shh, Smo se encuentra inhibido por Ptch1. Tras la unión de Shh a Ptch1 y a otros co-receptores, se produce la traslocación de SMO al cilio primario, posiblemente en vesículas, donde se inicia la transducción de señal. Se discute cómo es dicha transducción pero se plantea la cuestión de si existen varias vías que puede depender del tipo celular o tejido, del momento del estado de diferenciación de la célula o del organismo, así como de una serie de otros factores (incluidas las diferencias entre especies). Una de esas vías conduce a la no fosforilación de Gli, el cual se estabiliza y es capaz de iniciar la transcripción^{46, 47}.

SMO puede, además, funcionar como un **oncogén** y su activación no regulada conduce al desarrollo del cáncer⁴⁸. La ciclopamina, un alcaloide natural de la planta *Veratrum Californicum*⁴⁹, inhibe directamente a SMO.

- **HHIP (Hedgehog-interacting protein)** es una proteína multidominio cuyo gen se localiza en el locus cromosómico 4q31.21-31.3, que actúa como un antagonista endógeno de los tres ligandos Hh con la misma afinidad que PTCH1^{50,51}.

HHIP se expresa en la mayoría de los tejidos humanos fetales y adultos⁵² y es una de las dianas para la intervención en la angiogénesis tumoral debido a su participación en el modelado vascular⁵³. Su expresión tiene lugar en células localizadas cerca de aquellas que expresan Shh; la expresión ectópica de Shh lleva a expresión ectópica de HHIP lo que indica que éste sea una de las dianas de transcripción de la señalización Shh, además de formar parte de un feedback negativo con el ligando Shh⁵⁰.

HHIP, como PTCH1, es considerado como posible **gen supresor tumoral** debido a su papel inhibitorio de la vía de señalización Shh. De hecho, ambos son activados transcripcionalmente en respuesta a la

señalización Shh. Así, en experimentos en los que se produce una ganancia de función, Shh se une a HHIP y debilita la señalización de la vía^{50, 54} al dificultarse la unión de Shh a Ptch1.

La sobreexpresión de Hhip en los animales causa defectos graves en el esqueleto y la pituitaria mientras que la pérdida de función de Hhip produce malformaciones de pulmón, esqueleto, estómago y páncreas, aunque curiosamente, las consecuencias de la pérdida de función de Hhip son relativamente menores en la médula espinal, si bien la función de Hhip en la médula espinal en desarrollo se hace evidente cuando la actividad de Ptch1 se reduce.

- **SUFU (Supressor of Fused)** localizado en el cromosoma 10q24.3, es importante en el desarrollo embrionario en relación con la vía Shh al actuar como un regulador negativo mediante la inhibición del transporte de Gli desde el citoplasma al núcleo. De hecho, la pérdida de heterocigosidad de su locus cromosómico se produce en las neoplasias de próstata, pulmón, mama, y en los MB⁵⁵⁻⁵⁷.

El gen SUFU humano codifica tres productos proteicos diferentes de 433, 481 y 484 aminoácidos⁵⁸, aunque también se ha informado acerca de dos variantes que codifican 359 y 388 aminoácidos⁵⁹, compartiendo todos ellos una región N-terminal de 340 residuos, correspondiente a los ocho primeros exones, que muestran, sin embargo, regiones C-terminales variables. El dominio C-terminal de interacción con SUFU (SIC) y el dominio N-terminal de interacción con SUFU (SIN) se requieren para la inactivación de Gli^{57, 60}; posiblemente la unión simultánea a SIC y SIN sea esencial para la eficacia de Sufu en condiciones fisiológicas, si bien, el secuestro de Gli en el citoplasma se realiza principalmente a través del dominio SIN, mientras que la inhibición de la actividad de Gli en el núcleo es dependiente del dominio SIC⁶¹. La sobreexpresión de SUFU inhibe la transcripción Gli-dependiente y promueve la localización citoplásmica de Gli^{62, 63}.

SUFU regula tanto la vía Shh como la Wnt (ambas contribuyen al desarrollo de los MB⁶⁴), inhibiendo la proliferación celular y actuando

como un **gen supresor**^{65, 66}. De ello se deduce que, la ausencia de expresión de SUFU promueve la tumorigénesis⁶⁷.

- **GLI1 (GLI family zinc finger 1):** La *familia de proteínas Gli* son factores de transcripción del tipo dedos de Zn, ya que poseen el diseño C2-H2 correspondiente a secuencias de histidina/cisteína entre iones de cinc (estructuralmente hablando, un tramo conservado de nueve aminoácidos conecta el C-terminal de histidina de un dedo al N-terminal de cisteína del dedo próximo) y cuya mutación conlleva la falta de función de las proteínas Gli y, consecuentemente, la falta de expresión de sus genes diana: PTCH1, GLI1, miembros de la vía Wnt y MYCN entre otros (Figura 6) . GLI1 en humanos actúa como un **oncogén**^{68, 69}.

Localizado en el locus cromosómico 12q13.3-14.1, Gli1 regula la expresión de una corriente de genes diana⁷⁰ (que presentan en su mayoría la secuencia de GLI1 de unión 5'-GACCACCCA-3'⁷¹) y es un activador transcripcional absoluto, y el principal de la vía Shh, implicado en la determinación del destino celular, la proliferación y modelación⁷². La expresión de Gli1 es muy dependiente de la activación de la señal Shh, de forma que se utiliza como lectura de la activación de la misma.

Las proteínas Gli circulan a través de los cilios, tanto en su forma reprimida como en su forma activada; habiéndose observado que su región N-terminal se une a complejos histona-deacetilasa vía SUFU, lo que ayuda en el plegamiento del DNA en los cromosomas⁷³. El complejo Gli-Sufu lleva a la inhibición de la actividad transcripcional de Gli1. La vía de transducción mediante la cual SMO activa a Gli1 aún es discutida, como ya se ha comentado con anterioridad⁴⁷.

- **GLI2 (GLI family zinc finger 2)**, localizado en el locus cromosómico 2q14.2, codifica una proteína que consta de un extremo N-terminal, que es menor en humanos que en ratones o ranas, existiendo cuatro isoformas: alpha, beta, gamma y delta⁷⁴

Se ha sugerido que podría tener una función represora, si bien hay estudios sobre el papel doble que juega Gli2 presentando una función activadora de la proliferación de los queratinocitos y represora de la diferenciación epidérmica⁷⁴.

Mutaciones que se producen tarde en el desarrollo sugieren que la regulación de transcripción de Gli1/Gli2 es interdependiente. En ratones se ha demostrado que la falta de función de Gli2 puede ser compensada por Gli1. Así, los embriones de ratón sin Gli2 desarrollan defectos del tubo neural que pueden ser resueltos mediante sobreexpresión de Gli1⁷⁵. Por otra parte, se ha demostrado que Gli2 compensa a su vez la pérdida de Gli1 en ratones transgénicos Gli^{-/-} que son fenotípicamente normales⁷⁶ lo que sugiere que, en la embriogénesis, Gli1 y Gli2 regulan un conjunto similar de genes. Así mismo, los estudios sugieren papeles superpuestos de Gli2 con Gli3 en el desarrollo embrionario⁷⁶.

Gli2 se ha relacionado con el síndrome de Greig⁷⁷, una cefalopolisindactilia que cursa con macrocefalia, hipertelorismo y polidactilia pre o postaxial; el síndrome de Pallister-Hall⁷⁸, que entre otros signos presenta polidactilia; la polidactilia preaxial de tipo IV; y la polidactilia postaxial tipos A1 y B⁷⁹.

- **GLI3 (GLI family zinc finger 3)**, localizado en el locus cromosómico 7p14.1, codifica una proteína del tipo dedos de zinc. Gli3 se une a la región de DNA de los genes diana de la vía Shh reconocida por Gli1, llevando a cabo principalmente una función supresora^{80, 81}, si bien, Gli3 también muestra funciones transcripcionales positivas^{25, 75}. Además, Gli3 puede ser necesaria para la regulación transcripcional de Gli1⁸².

Con respecto a la forma de actuación de Gli3 hay diferentes opiniones: unas aluden al hecho de que Gli3 actúa mediante la forma completa de 190 kDa, que sería la activadora, por medio de la inducción de la expresión de Gli1 al unirse a la región promotora 5' de GLI1. Otras sugieren que una forma truncada de 89 kDa, mediante la acción proteolítica de la PKA (protein kinasa A), es la represora de la vía Shh, estando presente en dicha forma cuando la vía no está activada, según

se ha observado en células en cultivo y cultivos de xenotrasplantes⁸³. Sin embargo, otros autores refieren que la escisión proteolítica de Gli3 parece no ser absolutamente imprescindible para su función represora y, de hecho, se ha demostrado en cultivos celulares que Gli3 puede ejercer dicha función mediante su forma completa³⁶.

GEN	ACCIÓN	REPERCUSIÓN CLÍNICA
PTCH1	Gen supresor tumoral	Síndrome de Gorlin o carcinoma basocelular, MB, cáncer de mama.
SMO	Oncogén	MB.
GLI1	Oncogén (factor de transcripción)	Cáncer esofágico, de próstata, sarcoma de Ewing, leucemia linfocítica crónica de células B.
GLI2	Oncogén (factor de transcripción)	Carcinoma oral de células escamosas.
SUFU	Gen supresor tumoral	MB, MB desmoplásico/nodular.

Tabla 1. Genes de la vía de señalización Shh y sus repercusiones clínicas.

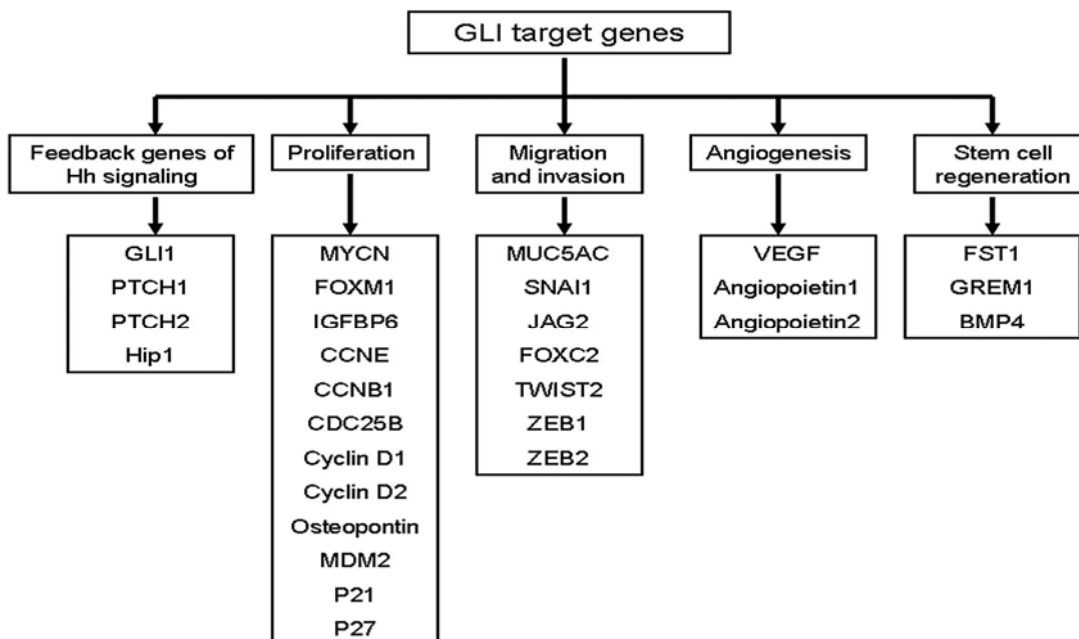


Figura 6. Genes diana de GLI (obtenido de Sait Turner y cols. Genetic Testing and Molecular Biomarkers, 2016, Vol. 20, nº 2, pp. 1-7).

2.3 Activación de la vía de señalización Shh

La vía Shh (Figura 6) es activada por un ligando soluble Hh que media la señalización y que es sintetizado como un precursor proteico que experimenta una división autoproteolítica para formar fragmentos de proteína aminoterminal. Una molécula de colesterol se unirá al extremo C-terminal del ligando proteico Hh, y una molécula de palmitato se unirá a su extremo N-terminal. Estas modificaciones facilitan el transporte del ligando Hh desde las células de origen a las células diana que activan la vía de modo paracrino por medio de su unión al receptor Ptch1 (Figura 7).

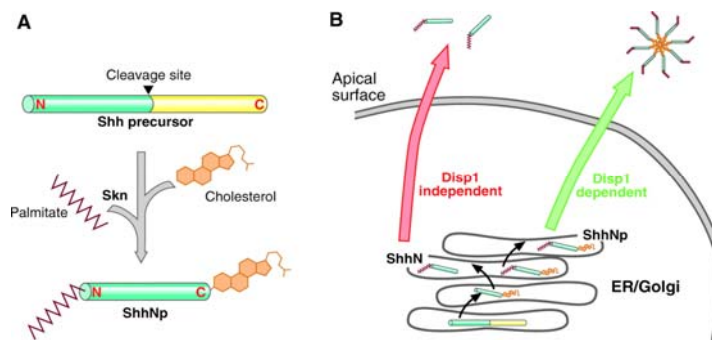


Figura 7. Modificaciones para el transporte del ligando Shh desde las células de origen a las células diana (obtenido de Development 2008, 135(15):2489-503).

Cuando no hay ligando, el receptor Ptch1 mantiene inhibida la señal de Shh por medio de algún tipo de cambio conformacional no bien conocido de SMO. La activación de Smo se produce cuando Ptch1 es previamente activado por la unión de Shh a Ptch1 y a otros co-receptores; se produce la traslocación de SMO al cilio primario, posiblemente en vesículas, donde se inicia la transducción de señal. y se produce la liberación por medio de vías diferentes, como la que conduce a la no fosforilación de Gli⁴⁷, el cual se estabiliza y es capaz de iniciar la transcripción en cascada de la familia de factores de la transcripción Gli (Gli1, Gli2 y Gli3)^{84, 85}, si bien existen datos contrarios que refieren una protección por medio de la fosforilación de una degradación prematura⁸⁶. Se sabe que las proteínas Gli circulan a través de los cilios, tanto en su forma reprimida como en su forma activada⁴⁷, entrando finalmente en el núcleo donde actúan como reguladores de transcripción de las regiones promotoras de varios genes diana (Figura6). Su activación es regulada a diferentes niveles, con inhibidores como Sufu⁷³ y activadores como Dyrk1. Datos actuales establecen que existe otro nivel de regulación a través de la compartimentalización celular; el cilio primario, de modo que, la maquinaria ciliar afecta a la actividad Shh por medio del transporte activo de Ptch1 y SMO dentro y fuera de su estructura⁸⁷

(Figura 8). El cilio primario, considerado hace décadas como un órgano vestigial del desarrollo embrionario, ha ido adquiriendo cada vez más importancia por su implicación no sólo en el desarrollo sino en el cáncer y en un grupo de enfermedades conocidas como ciliopatías. Estructuralmente, a diferencia de los cilios móviles que presentan una estructura de 9 pares de microtúbulos rodeando un par central y un ancla centriolar denominado cuerpo basal, los cilios primarios carecen de dicho par central; y, desde el punto de vista funcional, se entienden como estructuras que sirven de ancla para las moléculas que serán transportadas corriente arriba y abajo en su interior mediante kinesinas y dineínas. Las kinesinas y dineínas son las encargadas del transporte de proteínas unidas a un complejo IFT (Intra Flagelar Transport). En el caso de las kinesinas dicho transporte se realiza hacia la parte superior del cilio y, en el de las dineínas, hacia el cuerpo basal del mismo⁸⁸.

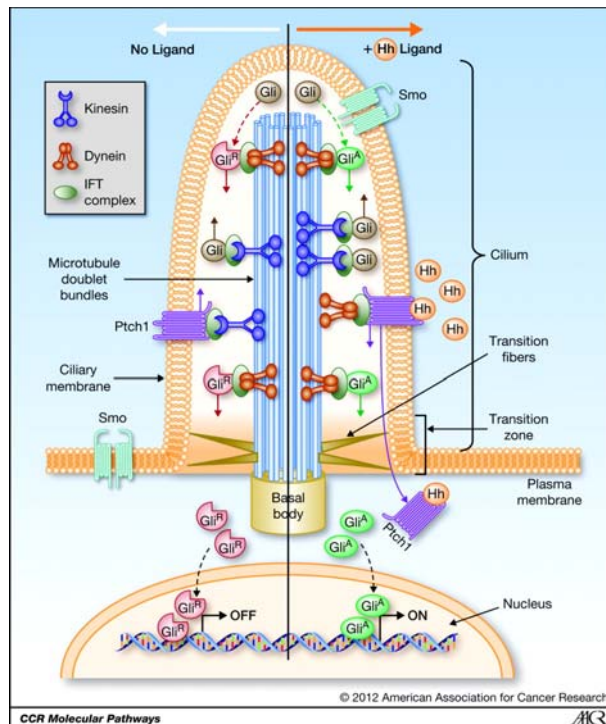


Figura 8. Regulación de la vía de señalización Shh en el cilio primario (obtenido de Clin Cancer Res, 2012, 18(9): 2429-35).

- En ausencia de Shh (izquierda): Ptch1 unida al complejo IFT (Intra Flagelar Transport) es trasladada por la kinesina, encargada del transporte de proteínas hacia la parte superior del cilio, en el interior de éste. Smo se localiza inactivo en la membrana celular fuera del cilio y Gli se encuentra en su forma represora (GliR).
- En presencia de Shh (derecha): Ptch1 unida al complejo IFT es trasladada por la dineína, encargada del transporte de proteínas hacia el cuerpo basal del cilio, fuera de éste. Smo es trasladada ahora dentro del cilio y promueve, en consecuencia, la forma activada de Gli (GliA) que, siendo llevada fuera del cilio, se dirige al núcleo donde se activa la expresión de los genes diana de la vía Shh.

2.4 Actividad aberrante de la vía Shh ligada al cáncer

El papel de la vía Shh en el cáncer se estableció a partir del descubrimiento de que las mutaciones causantes de la pérdida de función en el gen PTCH1 subyacían al síndrome del carcinoma basocelular nevoide o síndrome de Gorlin, enfermedad caracterizada por desarrollar carcinomas basocelulares en la piel a edad temprana que muestran, además, una elevada incidencia de otras neoplasias como el meningioma, fibroma ovárico y cardíaco, rhabdomioma y, principalmente, el MB⁴⁵. Del mismo modo, se ha comprobado que las formas esporádicas de carcinoma basocelular presentan frecuentemente mutaciones inactivadoras de PTCH1, o menos habitualmente, mutaciones activadoras de SMO^{89, 90}. Así mismo, también se produce en algunos casos sin que se requiera la mutación de PTCH1 y SMO, como la asociación entre la vía Shh y Gli1 en varias neoplasias como son los MB, NB y PNET, o algunos tumores de pulmón⁹¹, intestino cefálico o anterior (el constituido desde la boca hasta el duodeno)⁹², próstata⁹³, ovario⁹⁴, estómago⁹⁵ o el melanoma maligno⁹⁶ (Tabla 2).

2.5 Modelos de mantenimiento de la vía shh

Se han propuesto tres modelos para explicar la implicación de la señalización aberrante en el desarrollo y/o mantenimiento de la vía Shh dependiente del cáncer^{110, 111}, una de ellas ligando- independiente y otras dos ligando-dependientes con distinto carácter, autocrino o paracrino (Figura 9).

- I. **Ligando-independiente:** la vía se activa de forma intrínseca mediante mutaciones que implican pérdida de función en componentes inhibidores de la vía, como Ptc1 y Sufu, o por medio de mutaciones que implican ganancia de función de componentes activadores como SMO. Es la forma de activación aberrante de la vía Shh que se reconoció en pacientes con asociación de carcinoma basocelular y MB. Se presentan alteraciones genéticas de la vía, afectando a componentes que promueven el crecimiento celular intrínseco y/o a propiedades de supervivencia de los tumores¹¹².

<i>GEN</i>	<i>REQUERIDO POR LAS CMN PARA</i>	<i>IMPLICACIÓN EN LA TUMORIGÉNESIS DEL SN</i>
Citoquinas (Shh)	Proliferación de precursores de las células granulares y de CMN.	Predisponen a MB en humanos y ratones. La interferencia de esta vía de señalización lleva a la regresión de los MB ^{39, 97-102} .
PTCH	Proliferación de precursores de las células granulares y de CMN.	Mutado en subtipos de MB. Gli1, Ptch se expresan en tumores como oligodendrogliomas y PNET. En sinergia con p53 e Ink4c en ratones genéticamente definidos con MB ^{103,104, 105} .
SMO	Proliferación de precursores de las células granulares y de CMN.	Mutado en subtipos de MB y PNET ¹⁰³ .
GLI (1-2-3)	Proliferación de precursores de las células granulares y de CMN. Gli1 se expresa en CMN de los cerebros de ratón adulto <i>in vivo</i> .	Gli1, Ptch se expresan en algunos tumores como oligodendrogliomas y PNET. Gli1 se requiere en la formación de MB Ptch+/- en ratón. ^{102, 103, 106-108}
SUFU	Regulador negativo de las vías Shh y Wnt.	Mutado en subtipos de MB humanos. Algunas de las mutaciones oncogénicas fallan en reprimir la señal Wnt ^{103, 109} .

Tabla 2. Genes importantes en la función de las CMN y su implicación en los tumores del sistema nervioso¹⁰.

- II. **Ligando-dependiente, autocrina:** Las células tumorales producen una activación autónoma de la vía Shh. Aquellos tumores con elevada expresión de ligandos Hh en los que, sin embargo, no se identifican alteraciones genéticas de los componentes de la vía, como los de colon, mama, pulmón, páncreas, próstata, glioblastomas o melanomas, sugieren que estos ligandos podrían ser la base de una señalización autocrina ouxtacrina de la vía Shh ligando dependiente¹¹².
- III. **Ligando-dependiente, paracrina:** las células de tumores de próstata, páncreas o colorrectal, producen ligando Hh, y las células estromales cercanas responden mediante la producción adicional de factores de crecimiento para apoyar el crecimiento tumoral o su supervivencia, como el IGF (factor de crecimiento insulínico) y VEGF (factor de crecimiento endotelial vascular)¹¹⁰.

Existe una variante de este modelo: el **paracrino reverso**, en el que las células estromales secretan ligando Hh afectando a la activación de la vía Shh en las células tumorales, las cuales a su vez inducen la producción de factores que mantienen la secreción de Hh o inducen a otros factores promotores tumorales^{110, 111}, como se ha observado en linfoma no Hodgkin y mieloma múltiple¹¹³.

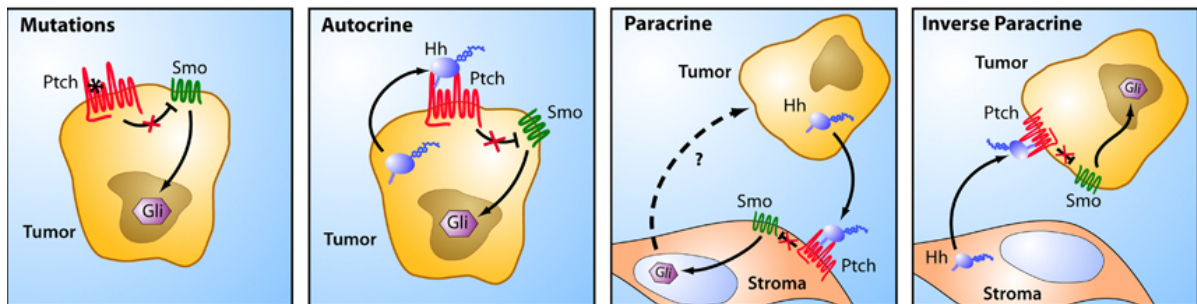


Figura 9. Modelos de la activación de la vía Shh que contribuyen al cáncer (obtenido y adaptado de Leukemia 2011, 25(11): 1665-73).

3. TUMORES DEL SISTEMA NERVIOSO

3.1 Clasificación de los tumores del sistema nervioso según la OMS

Según la clasificación de la OMS realizada en 2007 y realizando un trabajo combinado entre el grupo internacional de neuropatólogos oncológicos y los investigadores de los tumores cerebrales -la clasificación se encuentra en el anexo-, los tumores del sistema nervioso pueden clasificarse en siete categorías¹¹⁴. En esta clasificación se encuentran incluidos todos los tumores del SNC y, así mismo, también se clasifican aquellos pertenecientes al SNP y a otros tejidos no neuronales como los pertenecientes al sistema meníngeo, por ejemplo.

Una clasificación más reciente de 2016 utiliza parámetros moleculares que se suman a los histológicos para definir algunas entidades tumorales como los gliomas, meduloblastomas y otros tumores embrionarios, además de incorporar nuevas entidades o eliminar otras que no son relevantes desde el punto de vista diagnóstico o biológico. Se espera que con esta clasificación se facilitarán los estudios clínicos, experimentales y epidemiológicos de los tumores del sistema nervioso.

TUMORES DEL TEJIDO NEUROEPITELIAL:

- ❑ Tumores astrocíticos
- ❑ Tumores oligodendrogiales
- ❑ Gliomas mixtos
- ❑ Tumores ependimarios
- ❑ Tumores del plexo coroideo
- ❑ Tumores gliales de origen incierto
- ❑ Tumores neuronales y neuro-gliales mixtos
- ❑ **TUMORES NEUROBLÁSTICOS**, que se subdividen en:
 - Neuroblastoma Olfatorio (Aestesioneuroblastoma)
 - Neuroepitelioma Olfatorio
 - **NEUROBLASTOMAS (NB) DE LA GÁNDULA ADRENAL Y DEL SNS**, que se subdividen en:
 - NB indiferenciado
 - NB pobremente diferenciado
 - NB diferenciado

 - **GANGLIONEUROBLASTOMA**, que se subdivide en:
 - Ganglioneuroblastoma entremezclado
 - Ganglioneuroblastoma nodular (compuesto)

 - GANGLIONEUROMA**, que se subdivide en:
 - Ganglioneuroma en maduración
 - Ganglioneuroma maduro
- ❑ Tumores del parénquima pineal
- ❑ **TUMORES EMBRIONARIOS**, que se subdividen en:
 - **MEDULOBLASTOMA (MB)**, subdividido en:
 - MB clásico
 - MB anaplásico
 - MB desmoplásico/nodular
 - MB de células grandes
 - MB con extensa nodularidad
 - Medulomioblastoma
 - MB melanótico
 - Tumores neuroectodérmicos primitivos del SNC (cPNET)
 - Teratoide Atípico/Tumor Rabdoide (AT/TR)

3.2 Tumores neuroblásticos de la glándula adrenal y del sistema nervioso simpático

De acuerdo con el Comité Internacional de Patología del Neuroblastoma (INCP), también denominado Clasificación de Shimada, dentro de los tumores neuroblásticos existen tres categorías que en orden decreciente de malignidad se clasifican como sigue¹¹⁵:

3.2.1 Neuroblastomas

- a. NB indiferenciado
- b. NB pobremente diferenciado
- c. NB diferenciado

3.2.2 Ganglioneuroblastomas

- a. Ganglioneuroblastoma entremezclado
- b. Ganglioneuroblastoma nodular o compuesto

3.2.3 Ganglioneuromas

- a. Ganglioneuroma en maduración
- b. Ganglioneuroma maduro

3.2.1 Neuroblastomas

Los NB pertenecen al grupo de tumores neuroblásticos del sistema nervioso que pueden ser cerebrales (NB del SNC) y periféricos (fuera del SNC), siendo en estos últimos en los que nos centraremos, ya que, los cerebrales compartiendo las mismas características, sin embargo, no tienen capacidad de regresión o diferenciación espontánea, mientras que los periféricos, sí la tienen.

Su incidencia es de 10,2 casos/1.000.000 niños menores de 15 años, siendo el tumor más común diagnosticado durante el primer año de vida¹¹⁶ y, en general, durante la infancia al representar el 7-10 % de todas las neoplasias pediátricas. La edad media de diagnóstico es a los 18 meses¹¹⁷, siendo el 40 % diagnosticado al año de edad, el 75 % antes de los 4 años, y el 98 % antes de los 10 años¹¹⁸. Su prevalencia es de 1 caso/100.000 nacidos vivos -lo que representa cerca de 100 nuevos casos/año en España.- manteniendo una incidencia bastante uniforme en todo el mundo, al menos en los países industrializados.

Su presentación clínica es muy variable, pudiendo abarcar desde una masa tumoral que no causa síntomas a un tumor primario que produce enfermedad crítica como resultado de la invasión local, la diseminación extensa, o ambas cosas¹¹⁸. Por otra parte, resulta muy interesante el hecho de que la mayoría de los niños experimenten una completa regresión espontánea de este tumor tras una mínima terapia o que evolucionen a un ganglioneuroma, tumor neuroblástico de comportamiento benigno. No obstante, los pacientes mayores de 1 año de edad presentan frecuentemente diseminación metastásica en el momento del diagnóstico,

que crece de modo inexorable incluso a pesar de los tratamientos intensivos multimodales¹¹⁶.

De cara a conseguir un sistema de estadificación que unifique los criterios internacionales de diagnóstico y respuesta al tratamiento de los NB, se desarrolló en 1988 el Sistema de Estadificación Internacional del Neuroblastoma (INSS)¹¹⁹, que es un sistema de estadificación post-quirúrgico. Posteriormente, en 2009, se creó un nuevo sistema basado en los Factores de Riesgo Definidos por Imagen (IDRF) para establecer un consenso enfocado hacia la estratificación del riesgo, denominado Grupo Internacional de Riesgo del Neuroblastoma (INRG), de forma que se trata de un sistema de estadificación pre-quirúrgico¹²⁰. En la Tabla 3 se establece la equivalencia entre ambos.

3.2.1.1 Histopatología

Los NB son tumores definidos como neuroblásticos pobres en estroma de células de Schwann y que, a su vez, se dividen en:

a. Neuroblastoma indiferenciado que normalmente requiere para su diagnóstico de técnicas suplementarias como la inmunohistoquímica, microscopía electrónica y/o citogenética (lo más frecuente es utilizar un panel de marcadores inmunohistoquímicos para realizar su diagnóstico histopatológico). Su diagnóstico diferencial incluye el rabdmiosarcoma primitivo, el PNET/sarcoma de Ewing o el tumor de Wilms. (Figura 10a).

b. Neuroblastoma pobremente diferenciado en el cual son sus características morfológicas, como la presencia de neurofilamentos microscópicos, lo que sirve de base a su diagnóstico, teniendo un 5 % o menos de sus células tumorales características citomorfológicas de diferenciación (Figura 10b).

c. Neuroblastoma diferenciado que generalmente presenta abundantes neurofilamentos, con más de un 5 % de células tumorales presentando diferenciación hacia células ganglionares (Figura 10c).

	<u><i>Características generales de INSS</i></u>		<u><i>Características generales de INRG</i></u>
1	Localizado. Completa escisión macroscópica, con/sin enfermedad microscópica residual. Nódulos linfáticos ipsilaterales negativos para tumor microscópico.	L1	Tumor localizado que no afecta a estructuras vitales y está confinado en cuello, tórax, abdomen, o pelvis.
2	Localizado. Incompleta escisión macroscópica. Nódulos linfáticos ipsilaterales no adheridos negativos para tumor microscópico.	L2	Tumor locoregional con 1 o más IDRFs. Puede ser ipsilateral afectando a compartimentos contiguos (ej/lado izdo de abdomen y lado izdo de tórax). Si son lados contralaterales (ej/lado izdo de abdomen y lado dcho de tórax) se define como enfermedad metastásica.
2B	Localizado con/sin completa escisión macroscópica. Nódulos linfáticos ipsilaterales no adheridos positivos. Nódulos contralaterales negativos microscópicamente.	M	Enfermedad metastásica distante. Implicación nodular linfática no regional*.
4	Cualquier tumor primario con diseminación linfática distante, hueso, médula ósea, hígado, piel, u otro órgano (excepto lo definido en 4S).		* Si un tumor abdominal superior tiene extensión a nódulos de mediastino inferior o un tumor pélvico tiene nódulos linfáticos inguinales, se consideran enfermedad locoregional. La ascitis y el derrame pleural, incluso con células malignas, no se considera enfermedad metastásica a no ser que disten mucho del compartimiento del tumor primario.
4S¹²¹	Tumor primario localizado en menores de 1 año (como en estadio 1, 2 o 2B) con diseminación limitada a piel, hígado o médula ósea (<10% de células malignas).		

Tabla 3. Equivalencia de gradación de los neuroblastomas de la INSS/ INRG.

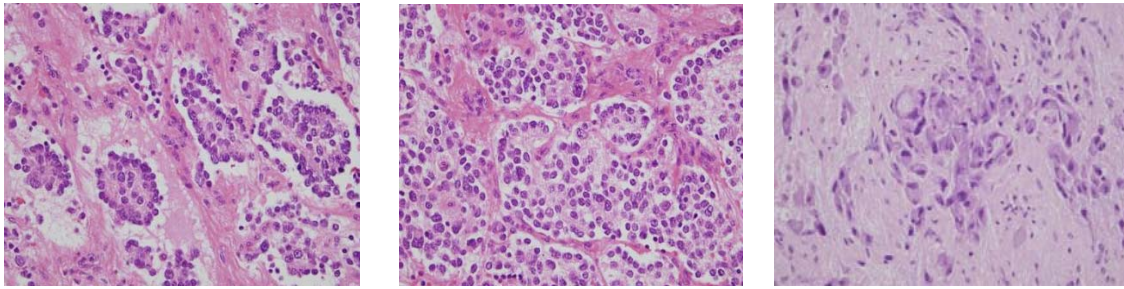


Figura 10. Clasificación histológica de los neuroblastomas (obtenido de <http://dx.doi.org/10.1594/seram2014/S-0885>).

a. NB indiferenciado. b. NB pobremente diferenciado. c. NB diferenciado.

3.2.1.2 Tumorigénesis del neuroblastoma

Este tipo de tumor de origen embriológico del sistema nervioso autónomo se cree que se desarrolla a partir de células derivadas de la cresta neural¹²². Se trata de la presencia de células anómalas que no evolucionaron desde su estado inmaduro en el feto y persisten en el desarrollo adulto del sistema nervioso simpático.

3.2.1.3 Etiología

La etiología de los NB todavía nos es muy desconocida pero puede decirse que:

- Los factores ambientales no parecen ser la causa principal, ni factores químicos, ni biológicos ni radiación¹¹⁸.
- Hay un subtipo de NB familiar que sugiere un factor hereditario, siendo el gen ALK (anaplastic lymphoma kinase) identificado como factor predisponente para éste¹²³ y que, además, ha sido hallado mutado en NB esporádicos¹²⁴. Así mismo, tanto la activación de la línea germinal como las mutaciones somáticas en ALK, la amplificación génica y los reordenamientos se correlacionan con un estadio avanzado de los NB^{123, 124}.

3.2.1.4 Diagnóstico

Los NB, por ser tumores del linaje simpático adrenal de la cresta neural, se desarrollan allí donde se ubica el sistema nervioso simpático¹²⁵, de modo que, se pueden presentar en cualquier localización a lo largo de la espina dorsal, sea en el cuello, región torácica, abdominal o pélvica, en los ganglios paraespinales¹¹⁶ y típicamente en la médula adrenal, donde aparecen la mitad de todos los NB^{118, 125}.

Su diagnóstico está basado en la presencia de las características histopatológicas del tejido tumoral o en la existencia de células tumorales en la médula ósea aspiradas mediante biopsia, acompañada de concentraciones elevadas de catecolaminas en orina. Así mismo, en los pacientes de alto riesgo se observa una elevación de las concentraciones de lactato deshidrogenada, ferritina o cromogranina en suero, si bien son relativamente inespecíficas y no resultan ser factores pronósticos independientes a la luz de las co-variantes biológicas actuales. Se precisa, por tanto, de marcadores genéticos específicos y datos histopatológicos obtenidos mediante biopsia de cara al plan de tratamiento, sobre todo si se trata de niños menores de 18 meses¹²⁵.

En lo que se refiere a su presentación clínica podemos resumir ésta en tres situaciones básicas:

1. Tumor localizado: Entorno al 40 % de los pacientes pueden ser diagnosticados de modo accidental al observar, en un estudio ecográfico prenatal, desde una masa intra-adrenal a tumores grandes y localmente invasivos en cualquier ubicación a lo largo de la cadena simpática. Los tumores paraespinales en las regiones torácica, abdominal y pélvica se dan en el 5-15 % de los pacientes, y se pueden extender hacia el foramen neural causando síntomas relacionados con la compresión de los pares craneales y de la médula espinal. De este modo, más del 5 % de nuevos casos diagnosticados presentarán signos neurológicos relacionados con el pinzamiento de la médula, como debilidad motora, dolor y pérdida sensorial.

2. Enfermedad metastásica: Cerca de la mitad de los pacientes presentan evidencia de metástasis hematógenas, distinguiendo entre la diseminación a distancia -como al hueso cortical, médula ósea, hígado y ganglios linfáticos no contiguos- y la extensión locorregional a ganglios adyacentes al tumor primario. A diferencia de la enfermedad localizada, que suele cursar con un estado funcional normal y pocos síntomas en el momento del diagnóstico, los enfermos con metástasis a menudo presentan extensas masas tumorales, localizándose a la palpación una masa abdominal habitualmente en el lado izquierdo, cursando la enfermedad con dolor y distensión abdominal, náuseas, vómitos,

diarrea/estreñimiento, fiebre y pérdida de peso, además de algunos signos clásicos del NB diseminado, como equimosis periorbitaria (ojos de mapache), proptosis, o ambos, debido a una inexplicable tendencia de este tumor a metastatizar al hueso orbitario. La enfermedad ósea generalizada y la afectación de la médula ósea pueden causar dolor óseo, cojera o irritabilidad, y más aún, síntomas de fracaso medular. Ocasionalmente, se puede producir una hipertensión renina-dependiente debido al compromiso vascular renal. La diseminación en el SNC no se suele observar en el momento del diagnóstico, aunque se puede dar a lo largo de la progresión de la enfermedad o en la recaída.

3. Enfermedad en estadio 4S: En un 5 % de los casos se presentan con tumores primarios pequeños y localizados, pero con metástasis en hígado, piel, o médula ósea, que frecuentemente regresan espontáneamente. Este estadio fue descrito por D'Angio y colaboradores¹²¹ como un fenotipo clínico llamativo o chocante, de ahí su denominación: el estadio 4S (S=especial). No obstante, en este estadio los niños menores de 2 meses pueden presentar una extensión intrahepática rápidamente progresiva que puede causar compromiso respiratorio.

3.2.1.5. Alteraciones en los neuroblastomas

3.2.1.5.1 Alteraciones moleculares y cromosómicas

a. Contenido de DNA

Por medio de la citometría de flujo se puede determinar el contenido de DNA en los NB, lo que ha demostrado que el promedio de DNA (DI = DNA Index) es un marcador pronóstico en pacientes jóvenes menores de 2 años con presencia de enfermedad diseminada¹¹⁸.

Los modelos genéticos de NB sugieren que los tumores menos agresivos muestran un defecto fundamental en la mitosis asociado a ganancias y pérdidas cromosómicas completas, lo que podría explicar por qué la aproximación a la triploidía parece ser favorable y, por el contrario, los NB malignos padecen un defecto fundamental en la estabilidad genómica que tiene como resultado la

reordenación cromosómica, translocaciones inestables, y un contenido de DNA cercano a la diploidía¹¹⁸.

b. Ganancia de 17q

Junto con las alteraciones del cromosoma 1p las copias adicionales del 17q son un hallazgo constante en las líneas celulares y tumores primarios de los NB, apareciendo en cerca del 50% un segmento adicional del mismo, constituyendo, por tanto, la alteración genética más frecuente en estos tumores y siendo más común en estadios avanzados, niños mayores de 1 año y en tumores que presentan también pérdida de 1p, amplificación de MYCN y ploidía -en el rango de diploidía o tetraploidía-, mientras que la triploidía se asocia a un pronóstico más favorable¹²⁶. La amplificación de MYCN y la ganancia de 17q son factores predisponentes significativos de evolución desfavorable¹²⁷.

c. Amplificación de MYCN

La aberración genética más asociada a la evolución negativa de los neuroblastomas es la amplificación del oncogén MYCN, localizado en el gen 2p24, que se presenta como una zona de tinción homogénea (HSRs) o en cromosomas dobles menudos (DMs)¹¹⁸, de tal forma que, una amplia región del cromosoma 2p24 -que incluye la región MYCN -es amplificada, presumiblemente porque supone una ventaja para las células. En general existe una correlación entre el número de copias de MYCN y su expresión. Así, los tumores con amplificación de MYCN expresan RNA y niveles proteicos de MYCN en mayor nivel que aquellos que no muestran dicha amplificación y, por el contrario, los que no muestran amplificación muestran niveles heterogéneos de expresión del MYCN; pero hay que tener en cuenta que incluso altos niveles de expresión no implican necesariamente un mal pronóstico. Todo ello sugiere que el nivel de MYCN no alcanza un “nivel límite” asociado a mala evolución en estos tumores, mientras que en los tumores con MYCN amplificado dicho nivel se supera en todos los casos¹²⁶, lo cual se observa en el 40–50 % de NB de alto riesgo, siendo una de las claves de predicción de mal pronóstico, asociado a estadio avanzado de la enfermedad, progresión tumoral rápida, y baja supervivencia a pesar del tratamiento intensivo¹¹⁸. Así mismo, la amplificación de MYCN se asocia a mal pronóstico en pacientes que, sin embargo, muestran un patrón de enfermedad favorable como en el caso de los tumores localizados en el estadio 4S del INSS, recalcando de este modo la importancia biológica de la amplificación del MYCN.

d. Pérdidas alélicas en 1p

La delección del brazo corto del cromosoma 1 (1p) se puede hallar en el 25-35 % de los NB, por lo que se ha correlacionado con las categorías clínicas de estos tumores (su presencia en el estadio 4S o en NB localizados se asocia a mal pronóstico)¹²⁸. Debido a la alta incidencia de esta mutación y a que se produce tanto en las etapas iniciales como en las finales de la enfermedad¹²⁹, parece que la delección en 1p se trata de un evento temprano en la tumorigénesis de los NB. Dicha delección corresponde a la región variable de 1p32 a 1pter, si bien la pequeña región localizada en 1p36.2-1p36.3 es la identificada en la mayoría de los casos¹²⁶. Se han detectado también correlaciones significativas entre la delección de 1p y la amplificación del gen MYCN¹²⁷.

Dentro del cromosoma 1p los genes que se hallan implicados en la patogénesis del NB no han podido ser identificados a pesar de los esfuerzos investigadores, pudiendo existir dos posibles genes supresores en 1p36.33: uno que codifica la proteína p73 (homólogo del gen supresor p53 e implicado en la regulación de la angiogénesis¹³⁰), y el gen HKR3 (human Krüppel-related 3). Ambos se encuentran delecionados en casi todos los casos de NB¹²⁶.

e. Pérdidas alélicas en 11q

Por medio del análisis de polimorfismos de DNA y CGH, se ha detectado la pérdida alélica de 11q en un 43 % de pacientes de NB dentro de un estudio de 267 casos, lo que la convierte en la delección más común en los NB¹³¹.

Mediante estudios de LOH se han detectado delecciones a nivel del brazo q del cromosoma 11 en un 5-32 % de NB^{131, 132}. Mientras que la pérdida de todo el cromosoma 11 se produjo en un 19 % de NB -lo que está asociado a un estadio de baja agresividad tumoral-, la LOH en 11q se observó en el 22 % de los NB primarios¹³³ -principalmente en estadios de alta agresividad tumoral que no presentan amplificación de MYCN-, hecho que aparece en más del 50 % de los NB en estadio 4. Este estadio se caracteriza además por una correlación positiva con delecciones en 3p, 4p y 14q, y una correlación inversa con la delección 1p. Incluso la ganancia 17q se presenta con frecuencia en estos casos¹²⁶.

f. Actividad telomerasa

Los telómeros son estructuras especializadas que se sitúan en el final de los cromosomas eucariotas y que son importantes de cara a la protección y replicación cromosómica. El final de los cromosomas no se puede replicar y tiene como consecuencia el acortamiento de los telómeros en las sucesivas divisiones celulares, de modo que, dicho acortamiento se cree que juega un papel en el envejecimiento celular, si bien los mecanismos exactos no son conocidos aún¹³⁴. No obstante, hay células como las germinales, que expresan la telomerasa, ribonucleoproteína que puede compensar el acortamiento del telómero añadiendo DNA en forma de pequeñas secuencias repetidas sobre el final de sus cromosomas, de modo que, este mantenimiento de los telómeros se puede asociar a la característica inmortalidad de las células tumorales. Se ha detectado actividad telomerasa en más del 94% de los casos de NB, aunque no ha sido así en la glándula adrenal normal ni en ganglioneuromas^{135, 136}. Hiyama y colaboradores¹³⁷ han estudiado la actividad de la telomerasa en 79 NB de pacientes no tratados, mostrando una correlación directa entre la actividad de la misma y la mala evolución de estos pacientes, así como entre la elevada expresión de la telomerasa y la amplificación de MYCN, de modo que la actividad telomerasa podría suministrar información pronóstica, si bien la actividad de ésta se correlaciona mejor *per se* con el grado histológico de malignidad tumoral.

g. Expresión del receptor de neurotrofina

Los factores responsables de la regulación de la transformación maligna de los neuroblastos del sistema nervioso simpático a células de NB todavía no son bien conocidos, aunque probablemente entre ellos están implicados una o más de las vías de receptores de neurotrofinas que llevan a la diferenciación de las células¹¹⁸.

Los receptores de neurotrofina con actividad tirosín-quinasa, TrkA, TrkB, TrkC y p75NTR junto a sus ligandos (factor de crecimiento nervioso (NFG), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofina-3 y neurotrofina-4/5), son reguladores importantes de la supervivencia, crecimiento y diferenciación de las células neurales¹³⁸, en concreto del SNS, estando alterada su señalización en el fenotipo del NB. Así se observa que, TrkA se expresa en NB de buen pronóstico: células de NB con elevada expresión de TrkA se diferencian cuando son expuestas al factor de crecimiento nervioso o experimentan apoptosis en ausencia del mismo, por lo que la señalización NFG/TrkA podría producir diferenciación o regresión de algunos

NB en función de su microambiente particular. También se ha identificado recientemente una variante oncogénica reguladora del desarrollo neural próxima a TrkA, la TrkAIII, que antagoniza la anti-oncogénica señalización NFG/TrkA y que promueve el crecimiento tumoral de los NB.

Por el contrario, en el caso de TrkB, éste se relaciona con los NB de evolución desfavorable, si bien, una isoforma truncada que carece del dominio catalítico tirosín-quinasa se podría expresar en NB favorables. La forma completa de TrkB al lado del ligando BDNF se relaciona generalmente con NB que tienen amplificación de MYCN¹²⁵.

3.2.1.5.2 Alteraciones de la vía Shh

La activación de la señal Shh en los NB no está tan clara como en MB¹³⁹. Con respecto al receptor Ptch1 se observa una expresión de tipo mixto en los NB. De este modo, explorando la participación de mecanismos epigenéticos, se ve que el gen PTCH1 muestra hemimetilación raramente, pero cuando esto sucede el NB exhibe una alta expresión de PTCH1, mientras que la no metilación del promotor PTCH1 se correlaciona con baja expresión en las líneas celulares de NB, algo que está ya bien determinado en el caso de los MB¹⁴⁰.

3.2.1.5.3 Pronóstico y tratamiento

El tratamiento se realiza tras el análisis del grupo de riesgo al que pertenece el paciente en función de¹¹⁶:

- Edad.
- Estadio INSS / INRG.
- Grado de diferenciación tumoral
- Tipo histológico
- Características moleculares, como la amplificación MYCN, ploidía del DNA y delección de 11q.

De este modo quedan establecidos tres grupos terapéuticos:

- I. **Alto riesgo:** Precisan un tratamiento agresivo con elevadas dosis de terapia multimodal que incluye inducción quimioterápica (vincristina, cisplatino, etopósido, doxorubicina), cirugía, quimioterapia mioablativa a altas dosis, seguido de rescate de células madre e irradiación. La continuación del

tratamiento con ácido retinoico puede ser prolongada y podría incluir inmunoterapia.

A pesar de la agresividad de la terapia la supervivencia es baja (40-50 %), por lo que el hallazgo de nuevas terapias específicas podría mejorar sustancialmente ésta¹¹⁶.

- II. **Riesgo intermedio:** Incluye quimioterapia de moderada intensidad y cirugía, obteniendo una supervivencia del 90-95 %.
- III. **Bajo riesgo:** Con el tratamiento quirúrgico exclusivamente se logra un 98 % de supervivencia, por lo que es el de elección en estos casos. De cara a realizar el seguimiento del estado de remisión se utiliza un método de radiodiagnóstico, la metayodobenzilguanidina (MIBG), que es una sustancia radioactiva que se adhiere a las células de neuroblastoma y que permite destacar las células tumorales en la imagen, de este modo es posible identificar la localización y la extensión de la enfermedad¹⁴¹.
- IV. **4S:** Se considera de forma individual, ya que presenta un fenotipo favorable que, a pesar de su rápida e implacable progresión, suele regresar espontáneamente, ofreciendo por ello a los pacientes únicamente tratamiento de soporte¹¹⁶.

3.2.2 Ganglioneuroblastoma

a. Ganglioneuroblastoma entremezclado cuyo estroma, que constituye el 50% del volumen total del tumor, es rico en células de Schwann y muestra una apariencia transicional hacia la diferenciación o maduración. No obstante, el proceso no es completo, como se pone en evidencia a nivel microscópico con diseminación “residual” de focos de células neuroblásticas (Figura 11a).

b. Ganglioneuroblastoma nodular, también denominado compuesto, término que implica que el tumor está formado por clones biológicamente diferentes, caracterizándose por la presencia macroscópica de nódulos neuroblásticos, frecuentemente hemorrágicos, que son pobres en estroma y que coexisten con un ganglioneuroblastoma entremezclado, rico en estroma, o con un ganglioneuroma, con dominio del componente estromal. Al examen microscópico se observan grandes

demarcaciones entre los nódulos neuroblásticos y el estroma, sea éste rico o dominante (Figura 11b).

3.2.3 Ganglioneuroma

Se trata de un tumor compuesto por estroma de células de Schwann, pudiendo diferenciarse dos subtipos:

a. Ganglioneuroma en maduración, compuesto principalmente por estroma ganglioneuromatoso, que domina el tejido tumoral, con un componente menor de diseminación, de un modo uniforme o no, de neuroblastos diferenciados y/o células ganglionares en maduración, junto a células ganglionares maduras (Figura 11c).

b. Ganglioneuroma maduro, formado por un estroma de células de Schwann maduras junto a células ganglionares, también maduras (Figura 11d).

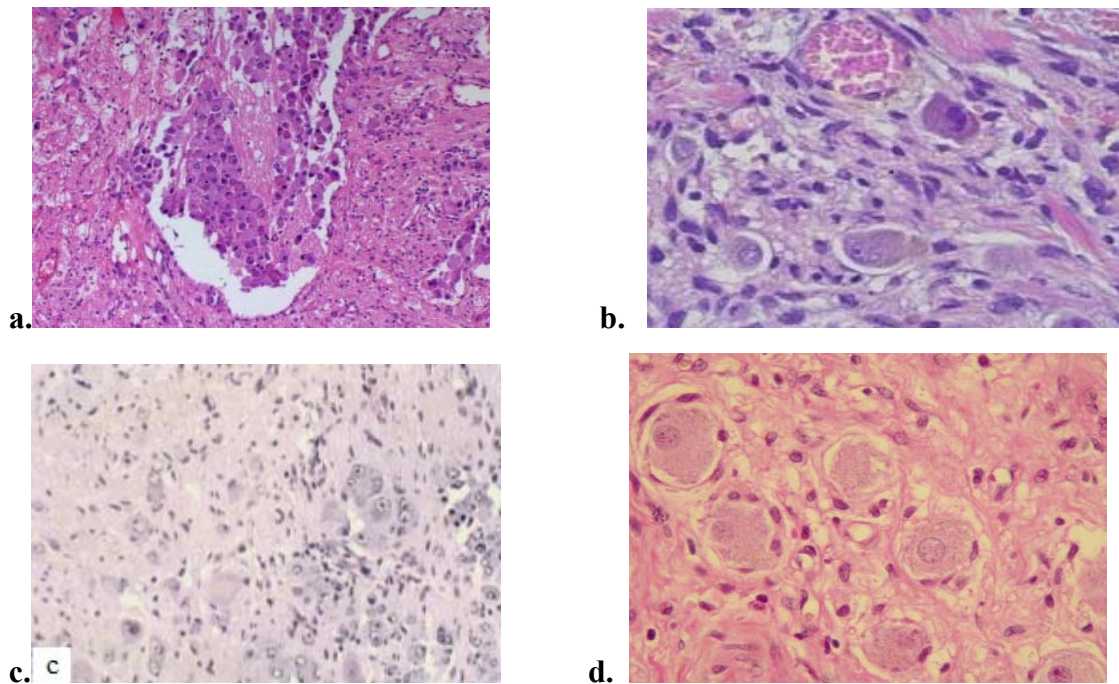


Figura 11. Tumores neuroblásticos.

a. Ganglioneuroblastoma entremezclado (obtenido de Case Rep Otolaryngol.1454932, 2016).

b. Ganglioneuroblastoma nodular (obtenido de Surg Case Rep. 1:79, 2015).

c. Ganglioneuroma en maduración.

d. Ganglioneuroma maduro (obtenido de Int. J. Odontostomat. 5(1):33-37, 2011).

3.3 Meduloblastomas

En un principio denominado espongioblastoma cerebeloso, Bailey y Cushing en 1925¹⁴² pasaron a denominarlo meduloblastoma, tal y como hoy se le conoce. El MB es un tumor extremadamente maligno e invasivo que se localiza en el cerebelo²², creciendo típicamente en el cuarto ventrículo, y no habiendo sido todavía identificada su célula progenitora en la embriología humana aunque se especula que pueda derivar de remanentes de la capa granular externa cerebelosa.. Según la clasificación de la OMS corresponde histológicamente a los tumores de morfología celular “embrionaria” de grado IV¹⁴³, lo que ha dado lugar a controversias ya que, inicialmente fueron clasificados como gliomas y más tarde dentro de los cPNETs debido a sus similitudes histológicas -compartiendo una morfología indiferenciada similar-. Sin embargo, actualmente gracias a evidencias moleculares, biológicas y clínicas, se ha demostrado que el MB constituye un tipo tumoral específico con características moleculares propias¹⁴⁴.

Los MB representan el 4-6% de los tumores intracraneales primarios y el 15-30 % de los tumores cerebrales infantiles por lo que son los tumores cerebrales malignos más comunes en la edad pediátrica¹⁴⁵, aunque se dan menos frecuentemente en adultos jóvenes^{146, 147}.

La incidencia anual del MB ha sido estimada entre 5 y 10 casos por millón en niños menores de 15 años de edad. Son más comunes en niños entre 3 y 8 años, dándose el pico de incidencia a los 7 años. El 21% aparecen en menores de 3 años, mientras que el 67% de los MB se dan en niños entre los 3 y los 16 años, y el 12% en mayores de esta edad, por lo que la edad media de presentación es a los 7,3 años de edad. Así mismo, los MB pueden aparecer en adultos aunque son raros (1%) y la mayor parte se producen entre los 21 y 40 años de edad. Por sexos su incidencia es mayor en hombres que en mujeres (~ 60 % en varones).

Debido a la localización axial de las lesiones y a su asociación con el cuarto ventrículo, estos tumores suelen producir metástasis en el sistema ventricular y en la médula espinal, generalmente a través del LCR (25 –45 %), pero solo aparecen metástasis al diagnóstico en el 10-30 % de los pacientes¹⁴⁸. Las metástasis extracraneales, aunque infrecuentes (5 % de los casos) se producen en hueso, hígado y nódulos linfáticos.

3.3.1 Histopatología

En la actualidad el MB es reconocido como una patología heterogénea tanto histológicamente como molecularmente. En este sentido, los investigadores opinan que los marcadores moleculares adquirirán progresivamente una mayor importancia en el diagnóstico y la clasificación de los MB, existiendo una cierta correlación entre grupos moleculares y subtipos histológicos, si bien el tipo histológico clásico de MB, por ejemplo, aparece en los cuatro grupos moleculares, mientras los desmoplásicos y casi todos los MB con extensa nodularidad y diferenciación neuronal avanzada pertenecen al grupo molecular Shh^{64, 149}, y los anaplásicos/de células grandes, aunque se dan en los cuatro grupos, tienden a pertenecer mayoritariamente al grupo 3 de MB.

3.3.1.1 Subtipos histológicos

Desde el punto de vista histológico son clasificados en 5 subtipos muy heterogéneos que exhiben un comportamiento clínico muy variable:

a. Meduloblastoma clásico

Este MB se compone de áreas formadas por células pequeñas hipercromáticas y poco diferenciadas que presentan una elevada relación núcleo-citoplasma. Se trata de un tumor de densa celularidad en el que las células se ordenan en hileras paralelas junto a otras áreas denominadas rosetas de Homer-Wright (Figura 12a) formadas por células tumorales dispuestas en forma circular. Pueden existir áreas de necrosis y pseudorosetas perivasculares²⁶.

b. Meduloblastoma anaplásico

Se trata de un tumor de celularidad densa formado por células que poseen un marcado pleomorfismo nuclear -redondo, oval o con forma de zanahoria- e hipercromático, con un citoplasma escaso (Figura 12c). Las llamadas rosetas de Homer-Wright son típicas pero no son una característica constante, estando frecuentemente asociadas a una mayor actividad mitótica, a menudo con formas atípicas. Si bien todos los tipos de MB muestran algún grado de atipia, estos cambios son particularmente pronunciados y amplios en esta variante.

La anaplasia ha sido asociada a las metástasis y la recurrencia tumorales, y algunos autores sugieren que este fenotipo tumoral puede representar un estadio final tras la acumulación de mutaciones, de forma similar al cáncer colorrectal¹⁵⁰.

Ocasionalmente se pueden observar células gigantes multinucleadas, núcleos gigantes, proliferación vascular, calcificación y hemorragias masivas¹⁴³.

c. Meduloblastoma desmoplásico/nodular

La variante de MB desmoplásico/nodular (25 % de casos) es más frecuente en los hemisferios cerebelosos y aparece más en pacientes adultos.

En las lesiones desmoplásicas podemos observar a las células tumorales en dos disposiciones, ya sea comprimidas en esbeltas columnas o bien organizadas en zonas nodulares donde las células tumorales poseen núcleos redondos y vesiculares que crean un “islote pálido” (zonas libres de reticulina) entre las cuales se deposita reticulina¹⁵¹, de ahí el término desmoplasia. Estas células que rodean a los nódulos son más irregulares e hiper cromáticas (Figura 12b). Así mismo, existen rosetas Homer-Wright, células ganglionares maduras, e inmunoreactividad para marcadores neuronales como la NFP (Proteína de Neurofilamento) que indican diferenciación neuronal¹⁴³.

Algunos autores sugieren que este tipo tumoral tiene mejor pronóstico que el MB clásico¹⁵². Cuando no hay patrón nodular pero existe un incremento de la cantidad de reticulina y fibras de colágeno se considera como una variante del MB desmoplásico. La extensión tumoral en la membrana aracnoidea implica una reacción fibroblástica que le proporciona un aspecto particular.

d. Meduloblastoma de células grandes

Los tumores con alto grado de malignidad, los MB de células grandes y los anaplásicos, muestran una superposición citológica considerable. Ambos están asociados con una reducción de la supervivencia^{143, 153}.

Se trata de una variante infrecuente de MB (4% de todos los casos) que presentan a menudo rasgos de células esféricas con un núcleo grande, redondeado o pleomórfico (Figura 12c), cromatina abierta y un prominente nucleolo central, con un citoplasma más abundante de cantidad variable. Hay en ellos grandes áreas de necrosis en las que tiene lugar una intensa actividad mitótica y elevada apoptosis¹⁵⁴ rodeando a las células tumorales.

Histológicamente son similares a los tumores teratoides/rabdoides.

e. Meduloblastoma con extensa nodularidad

Esta variante de MB (5% de casos) que presenta una extensa nodularidad y diferenciación neuronal avanzada, está estrechamente relacionada con el MB

desmoplásico/nodular y fue denominado anteriormente como “neuroblastoma cerebeloso”¹¹⁴. Es más frecuente en niños menores de 3 años y se caracteriza por una nodularidad extensa e importante diferenciación neuronal, diferenciándose del MB desmoplásico porque posee una estructura lobular muy amplia debido a que, entre los nódulos, las zonas libres de reticulina llegan a ser inusualmente grandes y ricas en tejido similar a neurofilamentos (Figura 12d) y, en ella, se pueden observar células ganglionares maduras y células internodulares que recuerdan a los neurocitos del neurocitoma central. Se ha sugerido que se puede tratar de una entidad tumoral diferente¹⁴³.

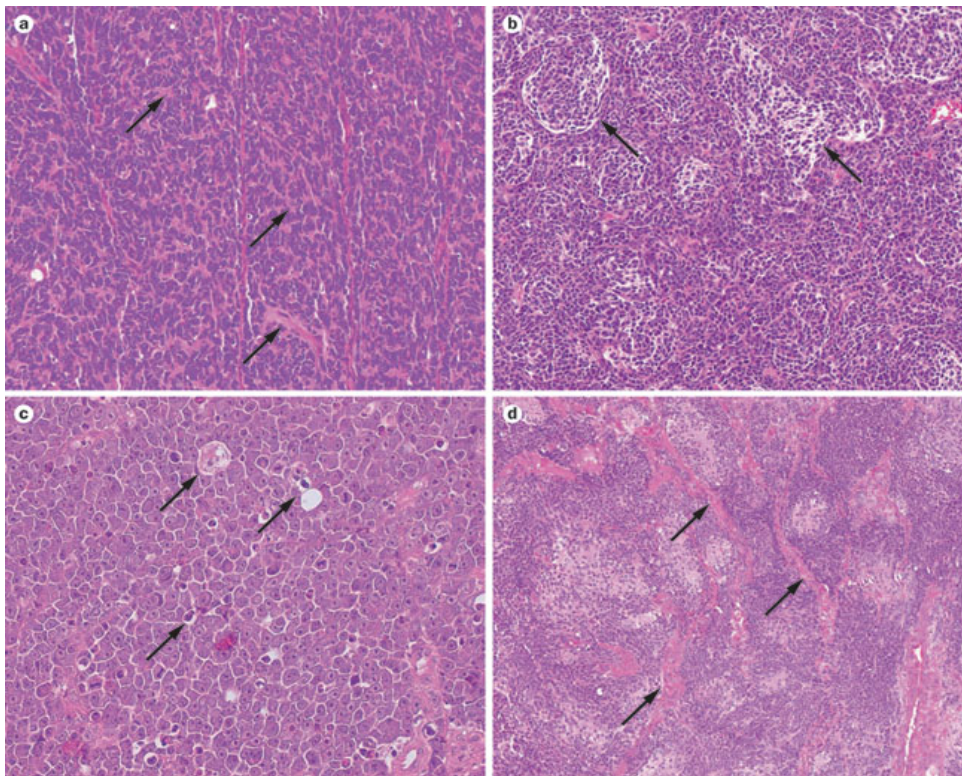


Figura 12. Subgrupos histológicos de meduloblastomas (obtenido de Nat Rev Neurol 2012, 8(6):340-51).

- a. MB clásico.**
- b. MB desmoplásico/nodular.**
- c. MB de células grandes/anaplásico.**
- d. MB con extensa nodularidad.**

3.3.1.2 Grupos moleculares

Esta clasificación de los MB se basa en diferencias genéticas, epigenéticas y fenotípicas halladas en estudios realizados por diferentes grupos de investigación a nivel mundial¹⁵⁵. Así, en la conferencia de Boston de 2010 se llegó a esta nueva clasificación molecular basada en la de 2007 -con mayor consistencia incluso que la clasificación

molecular de los glioblastomas- y se incluye en la última clasificación de tumores cerebrales de la OMS en 2016. Publicaciones recientes han revelado una compleja subdivisión de estratificación de riesgo dentro de los subgrupos moleculares, identificando un número de grupos más pequeños dentro de los cuatro grandes con mejor o peor pronóstico¹⁵⁶.

a. Grupo Wnt

Este **subtipo 1 o grupo Wnt** representa alrededor del 10% de los MB y es el mejor conocido debido a su buen pronóstico (índice de supervivencia mayor del 95%) en relación con los grupos restantes^{64, 157-160}. Las complicaciones derivadas del tratamiento o de la aparición de neoplasias secundarias antes que la recidiva del MB propiamente dicho suelen ser la causa de fallecimiento, por lo que actualmente se discute si sería interesante reducir la terapia para evitar los sobre-tratamientos. Así mismo, estudios recientes indican que los MB de este grupo no presentan una barrera hematoencefálica intacta,¹⁶¹ lo que sugiere potencial para un mejor acceso a los fármacos pudiendo explicar su mayor quimiosensibilidad y el pronóstico favorable. Estos MB aún pudiéndose presentar a cualquier edad, son infrecuentes en menores de 3 años y no presentan predominio masculino.

En este grupo se engloban aquellos MB pertenecientes al subtipo histológico clásico, aunque algunos presenten histología de anaplásico/de células grandes, si bien conservando un buen pronóstico.

A nivel molecular destacan las mutaciones en la línea germinal en el gen APC (Síndrome de Turcot)¹⁶², mutaciones somáticas en el exón 3 de CTNNB1 -que codifica la β -catenina¹⁶³- y monosomía del cromosoma 6¹⁵⁷. Investigaciones recientes describen que estos MB tienen origen en el tronco cerebral, a partir de células del labio rómbico inferior del cerebelo¹⁶⁴.

b. Grupo Shh

Los MB de este **subtipo 2 o grupo Sonic hedgehog** representa entorno al 30% de los MB y combina mutaciones de los diferentes reguladores de la vía Shh: PTCH1 (como en el síndrome de Gorlin –que predispone al MB-¹⁶⁵) SMO, SUFU, GLI1 y GLI2, afectando a la heterogeneidad en la presentación de la enfermedad, la respuesta a la terapia y el resultado. En el caso de las deleciones del cromosoma 9q parece que se limitan a este grupo molecular, ya que PTCH se halla ubicado en el mismo¹⁵⁸. Su pronóstico es similar al del grupo 4, situándose en un punto intermedio entre el grupo

Wnt -de buen pronóstico- y el grupo 3 -de mala evolución-; pacientes con enfermedad metastásica, MYCN, GLI2 o delección de 14q¹⁶⁶ y especialmente aquellos con mutaciones en TP53¹⁵⁶ tienen un pronóstico muy pobre (<50% de supervivencia) , lo que sumado a la demostración de que pequeñas moléculas inhibidoras de Smo son efectivas contra los MB Shh, hacen necesaria la búsqueda de marcadores eficaces que permitan la aplicación de nuevas terapias¹⁶⁷⁻¹⁶⁹. El fenómeno de cromotripsis (evento catastrófico de reordenamientos cromosómicos) se ha relacionado, en los MB, con la mutación en TP53, y en concreto con este subtipo Shh, aunque también se puede producir en el subtipo Wnt¹⁷⁰.

La edad de presentación es bimodal, con una elevada frecuencia en menores de 3 años y, en contraposición, en adultos mayores de 16 años, siendo baja la frecuencia en el grupo de edad intermedio. Hay que tener en cuenta que todavía no está claro si los MB de niños pequeños son similares genéticamente a los de los adultos.

Los subgrupos histológicos que corresponde al MB de tipo Shh son mayoritariamente los desmoplásicos/nodulares. No obstante, no se trata de una correlación exacta, ya que un pequeño porcentaje de los MB del grupo Shh no son desmoplásicos¹⁷¹.

c. Grupo 3

A este **subtipo 3**, que comprende alrededor del 20% de los casos de MB, se le ha denominado subtipo MYC¹⁷² ya que la amplificación de MYC aparece casi siempre limitada al mismo¹⁷³, mientras que, comparativamente, el grupo Shh presenta altos niveles de MYCN, y el grupo cuatro sobreexpresa ambos, MYC y MYCN^{158, 160, 172}. Así mismo, la ganancia del cromosoma 1q y/o pérdida de los cromosomas 5q y 10q son más frecuentes en este grupo que en el grupo 4. Sin embargo, la amplificación y sobreexpresión del oncogén OTX2 se presenta, al parecer de modo restringido, en ambos grupos^{158, 174, 175}. A pesar de las similitudes existentes, los datos demográficos, clínicos y genéticos llevan a pensar que estos grupos, 3 y 4, son entidades clínicas diferenciadas^{158, 160}. Así como los grupos Wnt y Shh se caracterizan por la activación de sus respectivas vías de señalización, este grupo 3 y el 4 se reconocen por sus respectivos fenotipos de expresión, que en caso del grupo 3 es GABAérgico¹⁷⁶.

EL grupo 3 apenas se da en adultos –mayores de 16 años- siendo el grupo de edad entre 3 y 16 años y los menores de 3 años los más afectados, estos últimos con el peor pronóstico. La afectación por sexos es de 2:1 niños respecto a niñas.

Histológicamente son MB clásicos. La mayor parte de los anaplásicos/de células grandes se sitúan en este grupo. Además, son frecuentemente metastáticos¹⁵⁸, por lo que es el grupo de peor pronóstico, con menos del 50% de supervivencia a los 5 años.

El interesante hallazgo¹⁷³ de que un subgrupo de MB dentro del grupo 3, con amplificación de MYC, se asocia a un mayor riesgo de metástasis y recidiva, mientras que el que carece de ella presenta una evolución clínica similar al grupo 4, podría llevar a definir dos grupos, el **grupo 3a**, con amplificación de MYC, y el **grupo 3b**, sin dicha amplificación. Otro factor pronóstico de alto riesgo es la presencia de isocromosoma 17q (26%)¹⁶⁶.

d. Grupo 4

En este **subtipo 4** se encuentran los MB prototipo -el 40% del total de MB-, es decir, niño de unos 7 años de edad, con histología clásica e isocromosoma 17q, que está presente en el 66 % de los casos¹⁷¹. En él se incluyen a todos aquellos que no se encuadran en los otros grupos debido a que su clasificación molecular no está perfectamente clara (por ejemplo, el isocromosoma 17q, también se encuentra en el 26 % de los MB del grupo 3). Además, el 80 % de las mujeres afectadas muestran pérdida del cromosoma X. A pesar de trabajos relacionados con la sobreexpresión de genes responsables del desarrollo y diferenciación neuronal en este grupo -su fenotipo de expresión es glutamatérgico¹⁷⁶- la relevancia clínica de los mismos no ha sido aún demostrada^{158, 160, 173}.

Los MB del grupo 4 se presentan a lo largo de toda la infancia, niñez y en la edad adulta, predominando en varones. Su pronóstico es intermedio (70%, supervivencia a 5 años), similar al de los MB Shh, siendo los factores pronósticos la pérdida de cromosoma 11 o la ganancia de cromosoma 17, asociados a un pronóstico favorable¹⁶⁶. Un estudio reciente ha identificado el factor de transcripción de homeobox LIM (LMX1A) como un importante factor regulador en este grupo 4, implicando a los progenitores del labio superior rúbico como células de origen de estos MB¹⁷⁷. A pesar de todo ello, el Grupo 4 sigue siendo el subgrupo más grande y menos comprendido del meduloblastoma.

3.3.2 Tumorigénesis del meduloblastoma

Identificar los orígenes celulares del cáncer tiene amplias implicaciones para la comprensión y el tratamiento de la malignidad. En el caso del MB se trata de un tumor

embrionario formado en el cerebelo principalmente en el transcurso del desarrollo cerebeloso, por lo que se trata de poblaciones celulares que tienen una vida efímera, de ahí que la histogénesis de los MB haya generado gran controversia desde la descripción inicial del tumor por Bailey y Cushing en 1925, existiendo en la actualidad dos teorías aceptadas¹⁷⁶:

- La primera sugiere que el MB tiene su origen en la capa granulosa externa del cerebelo. Las células de Purkinje proporcionan la señal a los precursores de las células granulares para iniciar la proliferación mediante la secreción de Shh. Finalizada la expansión los precursores de las células granulares finalizan el ciclo y migran hacia la zona interior de la capa granulosa externa, donde comienzan a diferenciarse¹⁰³. Un desarrollo aberrante de las células granulares, ya sea por un exceso de señales de proliferación o por una ausencia en las señales de parada de la diferenciación y división, induce el desarrollo del MB¹⁵¹. Esta hipótesis se sustenta en: 1) la proliferación de precursores neuronales en la capa granulosa externa está controlada por sonic hedgehog (mitógeno secretado por las células de Purkinje, y que forma parte de una de las vías de señalización intracelular de mayor importancia en MB); 2) la existencia de modelos murinos de MB obtenidos a través de la activación de la vía hedgehog; y 3) las similitudes en el patrón de expresión génica entre las células de MB y las células de la capa granulosa externa del cerebelo en desarrollo.
- La segunda teoría sugiere que los MB derivan de las células de la matriz germinal subependimaria (células madre precursoras, presentes en diversas localizaciones del SNC embrionario, que darán lugar a las células neuronales y gliales durante el desarrollo). Aquí estaría implicada la vía de señalización Wnt/beta-catenina. Según esta teoría, los PNET de localización supratentorial tendrían este mismo origen común con los MB. Sin embargo, esta teoría se ha visto criticada recientemente porque aunque las características histológicas sean muy similares, las alteraciones genéticas de los PNET supratentoriales y de los MB son distintas^{178, 179}.
- Recientemente, se han propuesto nuevas teorías, como que los MB se pueden originar a través de más de un tipo celular, o que existen otras posibles células progenitoras en otras localizaciones (p.ej., células madres presentes en la sustancia blanca del cerebelo postnatal).

3.3.3 Etiología

Si bien la mayoría de los MB tiene un origen esporádico, algunos se relacionan con síndromes neoplásicos familiares como son el carcinoma basocelular nevoide (síndrome de Gorlin)^{45, 180}, síndrome de Turcot, síndrome de Li-Fraumeni (relacionado con la mutación de TP53) y el síndrome de Rubinstein-Taybi²⁶. Así mismo, existen virus con capacidad tumorigénica que ha sido descrita en diversos trabajos como son los poliomavirus¹⁸¹, postulándose que la interacción se da entre el IGF y el antígeno T del poliomavirus humano JC, contribuyendo a la transformación maligna de los MB.

3.3.4 Diagnóstico

El SNC posee unas características histológicas específicas que explican que las neoplasias que en él puedan presentarse sean entidades tumorales especiales. Nos hallamos ante la presencia de la barrera hematoencefálica y la compartimentalización del encéfalo que inciden en la sensibilidad de las células tumorales a la quimioterapia y a la radioterapia, o en la dificultad de acceso a los tumores en caso de intervención quirúrgica, así como en la sintomatología, a menudo provocada por la falta de espacio y, en ocasiones, con síntomas muy característicos según la localización del tumor. Clínicamente, los pacientes presentan a menudo hidrocefalia y síntomas de hipertensión intracraneal, tales como dolor de cabeza de aparición relativamente abrupta, letargia y vómitos matutinos, inestabilidad, cierto grado de nistagmo y papiledema. La invasión celular da lugar a ataxia y dismetría.

En el momento del diagnóstico un 20% aproximadamente no presentarán hidrocefalia sino deficiencias cerebelosas, siendo posteriormente, cuando el tumor crece hacia la línea media y se obstruye el paso del LCR, cuando se hacen evidentes los síntomas clásicos relacionados con la hidrocefalia. En ocasiones los síntomas pueden presentarse de forma explosiva con un inicio agudo del letargo y pérdida de la consciencia a causa de una hemorragia intratumoral.

En los lactantes los síntomas son más inespecíficos, con letargia, retraso psicomotor, pérdida de los hitos del desarrollo y dificultades en la alimentación, con abultamiento de la fontanela anterior a la exploración, por aumento de la presión intracraneal, y movimientos oculares anormales (el llamado signo de *la puesta de sol*) debido a la pérdida de la mirada hacia arriba secundaria a la compresión del tectum del cerebro medio.

3.3.5 Alteraciones en los meduloblastomas

3.3.5.1 Alteraciones citogenéticas y moleculares

Las alteraciones genéticas específicas implicadas en la mayoría de los MB están todavía poco definidas. En la Tabla 4 se detallan las más frecuentes¹⁰³:

Cromosoma / gen	Incidencia
Isocromosoma 17q ¹⁸²	< 70 %
LOH 8p, LOH 16q, LOH 7q, LOH 11p	60-70 %
LOH 10q	40 %
LOH 17p ¹⁰³	30-60 %
TP53*	10 %

*Este gen supresor tumoral se encuentra en el locus cromosómico 17p13 y se halla mutado más frecuentemente en los MB de células grandes y en los anaplásicos¹⁸³.

Tabla 4. Alteraciones genéticas en los meduloblastomas.

3.3.5.2 Alteraciones de la vía Shh

La sobreactividad de la señal Shh en los precursores de las células granulosas de la capa granulosa externa nos remiten a las aberraciones moleculares que están mejor caracterizadas en los MB. Dicha sobreactividad es causada por un exceso de ligando (proteína Shh), o por la activación de mutaciones en el receptor (Ptch1) en el 25 % de tumores esporádicos¹⁸⁴, lo que da lugar a una activación en cascada de la transcripción de factores de la familia de Gli1 y promueve la expresión de los genes diana de la vía (proliferación e inhibición de la apoptosis). Del mismo modo, en los MB se puede dar una regulación desde arriba o amplificación de MYCN, convirtiéndose en otro mecanismo por medio del cual la señal Shh ejerce un efecto proliferativo (activando a las ciclinas y reprimiendo a los inhibidores de las kinasas ciclina-dependientes)^{97, 185, 186}. Incluso, la inhibición de la degradación de MYCN - requerida por los precursores de las células granulares para finalizar el ciclo celular- a través de la vía IGF sinergiza con la señal Shh contribuyendo a la formación del MB^{97,}

187

3.3.6 Pronóstico y tratamiento

El tratamiento de los MB se halla condicionado principalmente por la edad del paciente y por la localización tumoral, además de por las características intrínsecas al tejido cerebral, ya que su importante y elevada funcionalidad -con la incapacidad resultante desde el punto de vista clínico -y su escaso poder de regeneración (compárese con el tejido hepático, por ejemplo), dotan a estos tumores de una “malignidad clínica” independiente de su grado de malignidad histológica.

Tradicionalmente se ha utilizado la clasificación de Chang, reflejada en la Tabla 5, en la que se estipulan diferentes estadios correspondientes a su tamaños/localización (estadios T) y metástasis (estadio M)¹⁸⁸.

<i>Estadios T</i>		<i>Estadios M</i>	
T1	Tumor < 3 cm de diámetro	M0	Sin metástasis subaracnoideas o a la corriente sanguínea
T2	Tumor > 3 cm de diámetro	M1	Células tumorales halladas en LCR
T3a	Tumor > 3 cm y con extensión en el acueducto de Silvio o en el foramen de Luschka	M2	Siembra nodular intensa en cerebelo, espacio cerebral subaracnoideo, o en el tercer /cuarto ventrículo
T3b	Tumor > 3 cm y con inequívoca extensión al tronco cerebral	M3	Siembra nodular intensa en espacio subaracnoideo espinal
T4	Tumor > 3 cm con extensión más allá del acueducto de Silvio o por debajo del foramen magnum	M4	Metástasis extraneuroaxiales

Tabla 5. Clasificación de Chang para los meduloblastomas.

Según ésta hay tres frentes de ataque:

- Resección tumoral, principalmente cuando el tumor está localizado.
- Radiación craneoespinal, que no puede ser administrada a niños menores de tres años debido a la severa morbilidad neurológica resultante de su aplicación.
- Quimioterapia: cisplatino, vincristina, lomustina, ciclofosfamida y etopósido oral son los más usados, ya sea solos o en combinaciones.

Sin embargo, en la actualidad, los criterios de estadificación más empleados son los de Packer (Zeltzer et al.; 1999) (Tabla 6), que se basan en la edad del paciente, la extensión de la resección y la presencia o no de enfermedad diseminada en base a

criterios de neuroimagen y citología de LCR. Según estos criterios se establecen dos categorías de riesgo:

Estratificación de riesgo	Edad	Resección quirúrgica	Diseminación*
Riesgo Estándar	>3 años	Completa	No (M0)
Alto Riesgo	≤3 años	Incompleta (>1.5 cm de tumor residual)	Sí (M1 - M4)

*M0= Sin diseminación, M1=Citología de LCR+, M2=Metástasis supratentoriales, M3=Metástasis espinales, M4=Metástasis extraneurales.

Tabla 6. Clasificación de Packer de los meduloblastomas.

A pesar del tratamiento, quirúrgico, radioterápico y quimioterápico, normalmente sanan sólo el 60 % de los niños afectados y, la mayoría, padecen durante mucho tiempo las secuelas de la agresividad del tratamiento al que son sometidos¹⁰³. La principal limitación del tratamiento actual es su baja especificidad, por lo que se hace necesario descubrir qué vías y señales están implicadas en la patogénesis de los MB de cara a descubrir nuevas posibilidades terapéuticas.

En la actualidad la supervivencia de los MB se ha incrementado del 30 % a los 5 años hasta el 50-70 % gracias a los progresos terapéuticos desde la década de los sesenta. Sin embargo, existen numerosas discrepancias en cuanto a los indicadores pronósticos:

- Algunos autores sugieren que los MB desmoplásicos tienen mejor pronóstico que los MB anaplásicos¹⁵² (Maire et al., 1992) mientras otros sugieren que son los desmoplásicos los que están asociados a mal pronóstico¹⁸⁹. Estas diferencias se podrían deber a la diversa clasificación del MB desmoplásico; aún así, típicamente existe una asociación del desmoplásico/nodular, junto con el clásico, con una mejor supervivencia global.
- En el caso de los MB de nodularidad extensa todos ellos presentan un pronóstico favorable siendo los pacientes catalogados como de bajo riesgo. Por el contrario, la variante de células grandes se presenta como muy maligno y con frecuente diseminación a través del LCR.
- Algunos autores sugieren que la expresión de la GFAP confiere un mal pronóstico al MB¹⁹⁰, mientras que la expresión del antígeno-S y la rodopsina estarían asociados a buen pronóstico¹⁹¹.

- La proliferación tumoral celular tiene un valor pronóstico limitado, aunque los tumores con un índice de incorporación de BrdU mayor del 20 % parecen tener mal pronóstico¹⁹². La respuesta a radioterapia parece ser un factor de pronóstico más certero que el índice de incorporación de BrdU.
- Los tumores aneuploides están asociados a un buen pronóstico¹⁹³.
- Los que tienen un alto índice apoptótico tienen mejor evolución que otros pacientes independientemente del grupo de riesgo al diagnóstico¹⁹⁴.
- La LOH en 17p es un factor pronóstico que despierta algunas controversias. Mientras hay autores que sugieren que está asociado a mal pronóstico y reduce la supervivencia¹⁹⁵ otros han fracasado en el intento de demostrar dicha correlación¹⁹⁶. La presencia del isocromosoma 17q, i(17q), se ha indicado como desfavorable. El isocromosoma 17q se forma de una mitosis anormal, en la que la división del centrómero se produce según el plano horizontal en vez del vertical, dando lugar a una monosomía parcial de 17q debido al brazo perdido (LOH de 17q), y a una trisomía parcial de 17q, debido al brazo duplicado (isocromosoma 17q).
- Tumores con amplificación MYC son resistentes al tratamiento¹⁹⁷, lo que les confiere mal pronóstico. De hecho, los anaplásicos/de células grandes deben su malignidad más a su pertenencia al grupo 3, y específicamente al grupo 3a que presenta amplificación de MYC, o al grupo 4 –ambos de mal pronóstico- que a su histología¹⁵⁸.

A causa de las variables histológicas y de los diferentes estadios de los pacientes con MB se han realizado esfuerzos de cara a establecer marcadores moleculares que se puedan correlacionar con el pronóstico de estos tumores (Tabla 7)²⁶.

Marcadores favorables	Marcadores desfavorables
β -catenina nuclear ¹⁹⁸	CDK6 ¹⁹⁹
γ- catenina ²⁰⁰	Notch 2 ²⁰¹
TrkC ²⁰²	c-Myc ²⁰³
	ErbB2 (HER2/Neu) ²⁰⁴

Tabla 7. Marcadores moleculares de pronóstico en los meduloblastomas.

OBJETIVOS

Considerando todos los datos anteriores, expuestos en la introducción de este trabajo, sobre el desarrollo del sistema nervioso, la regulación genética ejercida por la vía sonic hedgehog, así como las alteraciones moleculares que se presentan frecuentemente en meduloblastomas y neuroblastomas, el objetivo principal de este trabajo es determinar la posible inhibición de la vía sonic hedgehog en líneas celulares de estos dos tipos tumorales, mediante ciclopamina, un inhibidor de Smo, y mediante siRNA contra Gli1. Hipotetizamos que tanto la ciclopamina como el siRNA contra Gli1 deberían ser capaces de inhibir la vía sonic hedgehog, disminuyendo la capacidad tumorigénica, *in vitro* e *in vivo*, de las células de meduloblastoma y de neuroblastoma. Dentro de este gran objetivo se engloban los siguientes objetivos específicos:

- 1. Caracterización de las líneas celulares de neuroblastomas y meduloblastomas**, mediante análisis de expresión de RNA y proteínas de varios de los componentes de la vía SHH.
- 2. Análisis epigenético de los promotores de varios genes supresores de tumores ligados a la vía sonic hedgehog**, así como ensayos de desmetilación de tales promotores si estuvieran metilados, con el objeto de confirmar si la metilación es causa de la inhibición de la expresión de esos genes.
- 3. Tratamiento inhibitorio de la vía sonic hedgehog**, *in vitro*, en las líneas celulares, mediante ciclopamina -inhibidor de SMO- y mediante siRNA contra GLI1.
- 4. Estudio de proliferación celular y de tumorigénesis *in vitro*** mediante crecimiento de colonias en agar blando, después de los tratamientos inhibitorios aplicados a las líneas celulares.
- 5. Estudio de tumorigénesis *in vivo*, mediante líneas celulares de meduloblastoma y neuroblastoma**, tratadas con los agentes inhibitorios de la vía Shh (y las no tratadas como control), xenotrasplantadas a ratones inmunodeprimidos.

MATERIAL Y MÉTODOS

CONCLUSIONES

- 1. La vía sonic hedgehog está activada en líneas celulares de meduloblastoma y neuroblastoma**, a juzgar por el estado de expresión de los principales reguladores de la misma.
- 2. Los tratamientos con ciclopamina y con siRNA contra Gli1** redujeron la expresión de Gli1, la viabilidad celular, y la clonogenicidad en agar blando (tumorigenicidad in vitro) en las líneas de meduloblastoma y neuroblastoma.
- 3. El estudio in vivo**, que finalmente solo pudo realizarse en dos líneas de meduloblastoma (DAOY y D283Med) mostró una disminución del tamaño tumoral tras los tratamientos con ciclopamina y con siRNA contra Gli1.
- En su conjunto se puede concluir que en las líneas celulares de meduloblastoma y neuroblastoma los **tratamientos como la ciclopamina y el siRNA contra Gli1 son útiles**, al menos a nivel experimental.
- 5. Smo y Gli1 son**, por tanto, **dianas terapéuticas** que pueden ayudar a la búsqueda de nuevas terapias contra el cáncer, mediante ensayos de inhibición in vitro e in vivo, realizados en células tumorales que tengan activada la vía sonic hedgehog.

BIBLIOGRAFÍA

1. Langman STW: Langman's medical embryology. Edited by Panamericana,, Langman's medical embryology.1988, p.pp. p.335-344 y 350-351.
2. Selleck MA, Garcia-Castro MI, Artinger KB, Bronner-Fraser M: Effects of Shh and Noggin on neural crest formation demonstrate that BMP is required in the neural tube but not ectoderm, *Development* 1998, 125:4919-4930
3. siegel A SH, N. : Essential neuroscience. Edited by United States of America, Lippincott Williams & Wilkins, 2006,
4. Elisabeth Dupin a, Lukas Sommer b: Neural crest progenitors and stem cells: From early development to adulthood, *Dev Biol* 2012 Jun 1;doi: 10.1016/j.ydbio.2012.02.035. Epub 2012 Mar 8., 366(361):383-395.
5. R. P: Citología e Histología Vegetal y Animal. Edited by Madrid (Spain). Interamericana-Mc Graw-Hill, , 2002,
6. Gilbert SF: Biología del Desarrollo. Edited by Sunderland MSA, Inc. 2010, p.
7. Larsen WJ: Essentials of human embryology. Edited by Gary C. Schoenwolf, et als., 2014,
8. Preston SL, Alison MR, Forbes SJ, Direkze NC, Poulson R, Wright NA: The new stem cell biology: something for everyone, *Molecular pathology* : MP 2003, 56:86-96
9. Temple S: The development of neural stem cells, *Nature* 2001, 414:112-117
10. Nicolis SK: Cancer stem cells and "stemness" genes in neuro-oncology, *Neurobiol Dis* 2007, 25:217-229
11. Reynolds BA, Weiss S: Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system, *Science* 1992, 255:1707-1710
12. Kukekov VG, Laywell ED, Suslov O, Davies K, Scheffler B, Thomas LB, O'Brien TF, Kusakabe M, Steindler DA: Multipotent stem/progenitor cells with similar properties arise from two neurogenic regions of adult human brain, *Exp Neurol* 1999, 156:333-344
13. Lie DC, Song H, Colamarino SA, Ming GL, Gage FH: Neurogenesis in the adult brain: new strategies for central nervous system diseases, *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2004, 44:399-421
14. Teng L, Labosky PA: Neural crest stem cells, *Adv Exp Med Biol* 2006, 589:206-212
15. Crane JF, Trainor PA: Neural crest stem and progenitor cells, *Annu Rev Cell Dev Biol* 2006, 22:267-286
16. Sieber-Blum M, Grim M, Hu YF, Szeder V: Pluripotent neural crest stem cells in the adult hair follicle, *Dev Dyn* 2004, 231:258-269
17. Yoshida S, Shimmura S, Nagoshi N, Fukuda K, Matsuzaki Y, Okano H, Tsubota K: Isolation of multipotent neural crest-derived stem cells from the adult mouse cornea, *Stem Cells* 2006, 24:2714-2722
18. Dupin E, Calloni G, Real C, Goncalves-Trentin A, Le Douarin NM: Neural crest progenitors and stem cells, *C R Biol* 2007, 330:521-529
19. Dupin E, Sommer L: Neural crest progenitors and stem cells: from early development to adulthood, *Dev Biol* 2012, 366:83-95
20. Le Douarin NM, Creuzet S, Couly G, Dupin E: Neural crest cell plasticity and its limits, *Development* 2004, 131:4637-4650
21. Wang VY, Zoghbi HY: Genetic regulation of cerebellar development, *Nat Rev Neurosci* 2001, 2:484-491

22. Wechsler-Reya RJ: Analysis of gene expression in the normal and malignant cerebellum, *Recent Prog Horm Res* 2003, 58:227-248
23. Carletti B, Rossi F: Neurogenesis in the cerebellum, *Neuroscientist* 2008, 14:91-100
24. Wechsler-Reya RJ, Scott MP: Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog, *Neuron* 1999, 22:103-114
25. Taipale J, Beachy PA: The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer, *Nature* 2001, 411:349-354
26. Jozwiak J, Grajkowska W, Wlodarski P: Pathogenesis of medulloblastoma and current treatment outlook, *Med Res Rev* 2007, 27:869-890
27. Lee JJ, Ekker SC, von Kessler DP, Porter JA, Sun BI, Beachy PA: Autoproteolysis in hedgehog protein biogenesis, *Science* 1994, 266:1528-1537
28. Porter JA, von Kessler DP, Ekker SC, Young KE, Lee JJ, Moses K, Beachy PA: The product of hedgehog autoproteolytic cleavage active in local and long-range signalling, *Nature* 1995, 374:363-366
29. Bumcrot DA, McMahon AP: Somite differentiation. Sonic signals somites, *Curr Biol* 1995, 5:612-614
30. Gao B, Hu J, Stricker S, Cheung M, Ma G, Law KF, Witte F, Briscoe J, Mundlos S, He L, Cheah KS, Chan D: A mutation in *Ihh* that causes digit abnormalities alters its signalling capacity and range, *Nature* 2009, 458:1196-1200
31. Hellemans J, Coucke PJ, Giedion A, De Paepe A, Kramer P, Beemer F, Mortier GR: Homozygous mutations in *IHH* cause acrocapitofemoral dysplasia, an autosomal recessive disorder with cone-shaped epiphyses in hands and hips, *American journal of human genetics* 2003, 72:1040-1046
32. Werner R, Merz H, Birnbaum W, Marshall L, Schroder T, Reiz B, Kavran JM, Baumer T, Capetian P, Hiort O: 46,XY Gonadal Dysgenesis due to a Homozygous Mutation in Desert Hedgehog (DHH) Identified by Exome Sequencing, *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 2015, 100:E1022-1029
33. Ingham PW, McMahon AP: Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles, *Genes Dev* 2001, 15:3059-3087
34. Xavier GM, Seppala M, Barrell W, Birjandi AA, Geoghegan F, Cobourne MT: Hedgehog receptor function during craniofacial development, *Dev Biol* 2016, 415:198-215
35. Beachy PA, Karhadkar SS, Berman DM: Tissue repair and stem cell renewal in carcinogenesis, *Nature* 2004, 432:324-331
36. Nieuwenhuis E, Hui CC: Hedgehog signaling and congenital malformations, *Clin Genet* 2005, 67:193-208
37. Kouprina N, Pavlicek A, Mochida GH, Solomon G, Gersch W, Yoon YH, Collura R, Ruvolo M, Barrett JC, Woods CG, Walsh CA, Jurka J, Larionov V: Accelerated evolution of the *ASPM* gene controlling brain size begins prior to human brain expansion, *PLoS biology* 2004, 2:E126
38. Odent S, Atti-Bitach T, Blayau M, Mathieu M, Aug J, Delezo de AL, Gall JY, Le Marec B, Munnich A, David V, Vekemans M: Expression of the Sonic hedgehog (SHH) gene during early human development and phenotypic expression of new mutations causing holoprosencephaly, *Human molecular genetics* 1999, 8:1683-1689
39. Ruiz i Altaba A, Sanchez P, Dahmane N: Gli and hedgehog in cancer: tumours, embryos and stem cells, *Nat Rev Cancer* 2002, 2:361-372
40. Bijlsma MF, Spek CA, Zivkovic D, van de Water S, Rezaee F, Peppelenbosch MP: Repression of smoothed by patched-dependent (pro-)vitamin D3 secretion, *PLoS biology* 2006, 4:e232

41. Wilson CW, Chen MH, Chuang PT: Smoothed adopts multiple active and inactive conformations capable of trafficking to the primary cilium, *PLoS One* 2009, 4:e5182
42. DeBerardinis AM, Banerjee U, Hadden MK: Identification of vitamin d3-based hedgehog pathway inhibitors that incorporate an aromatic a-ring isostere, *ACS medicinal chemistry letters* 2013, 4:590-595
43. Zedan W, Robinson PA, Markham AF, High AS: Expression of the Sonic Hedgehog receptor "PATCHED" in basal cell carcinomas and odontogenic keratocysts, *J Pathol* 2001, 194:473-477
44. Tukachinsky H, Petrov K, Watanabe M, Salic A: Mechanism of inhibition of the tumor suppressor Patched by Sonic Hedgehog, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016, 113:E5866-E5875
45. Gorlin RJ: Nevoid basal cell carcinoma (Gorlin) syndrome, *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 2004, 6:530-539
46. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF: Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium, *Nature* 2005, 437:1018-1021
47. 10.1016/j.cub.2008.12.010. Fd, Philipp M1 CM: Hedgehog signaling: is Smo a G protein-coupled receptor?, *Curr Biol* 2009 19(3):R125-7:
48. Xie J, Murone M, Luoh SM, Ryan A, Gu Q, Zhang C, Bonifas JM, Lam CW, Hynes M, Goddard A, Rosenthal A, Epstein EH, Jr., de Sauvage FJ: Activating Smoothed mutations in sporadic basal-cell carcinoma, *Nature* 1998, 391:90-92
49. Chen JK, Taipale J, Cooper MK, Beachy PA: Inhibition of Hedgehog signaling by direct binding of cyclopamine to Smoothed, *Genes Dev* 2002, 16:2743-2748
50. Chuang PT, McMahon AP: Vertebrate Hedgehog signalling modulated by induction of a Hedgehog-binding protein, *Nature* 1999, 397:617-621
51. Shahi MH ZI, Afzal M, Sinha S, Rebhun RB, Meléndez B, Rey JA, Castresana JS.: Epigenetic regulation of human hedgehog interacting protein in glioma cell lines and primary tumor samples., *Tumour Biol* 2015, 36(34):2383-2391.
52. Bak M, Hansen C, Friis Henriksen K, Tommerup N: The human hedgehog-interacting protein gene: structure and chromosome mapping to 4q31.21-->q31.3, *Cytogenetics and cell genetics* 2001, 92:300-303
53. Shahi MH RJ, Castresana JS.: The sonic hedgehog-GLI1 signaling pathway in brain tumor development., *Expert Opin Ther Targets* 2012., 16(12):1227-1238.
54. Kwong L BM, Roelink H.: Shh-mediated degradation of Hhip allows cell autonomous and non-cell autonomous Shh signalling. , *Nat Commun* 2014,
55. Latini JM, Rieger-Christ KM, Wang DS, Silverman ML, Libertino JA, Summerhayes IC: Loss of heterozygosity and microsatellite instability at chromosomal sites 1Q and 10Q in morphologically distinct regions of late stage prostate lesions, *The Journal of urology* 2001, 166:1931-1936
56. Leube B, Drechsler M, Muhlmann K, Schafer R, Schulz WA, Santourlidis S, Anastasiadis A, Ackermann R, Visakorpi T, Muller W, Royer-Pokora B: Refined mapping of allele loss at chromosome 10q23-26 in prostate cancer, *The Prostate* 2002, 50:135-144
57. Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D: Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma, *Nat Genet* 2002, 31:306-310
58. Stone DM, Murone M, Luoh S, Ye W, Armanini MP, Gurney A, Phillips H, Brush J, Goddard A, de Sauvage FJ, Rosenthal A: Characterization of the human suppressor of

fused, a negative regulator of the zinc-finger transcription factor Gli, *Journal of cell science* 1999, 112 (Pt 23):4437-4448

59. Grimm T, Teglund S, Tackels D, Sangiorgi E, Gurrieri F, Schwartz C, Toftgard R: Genomic organization and embryonic expression of Suppressor of Fused, a candidate gene for the split-hand/split-foot malformation type 3, *FEBS letters* 2001, 505:13-17

60. Dunaeva M, Michelson P, Kogerman P, Toftgard R: Characterization of the physical interaction of Gli proteins with SUFU proteins, *J Biol Chem* 2003, 278:5116-5122

61. Han Y1 SQ, Jiang J2.: Multisite interaction with Sufu regulates Ci/Gli activity through distinct mechanisms in Hh signal transduction., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015 112(120):6383-6388

62. Kogerman P, Grimm T, Kogerman L, Krause D, Uden AB, Sandstedt B, Toftgard R, Zaphiropoulos PG: Mammalian suppressor-of-fused modulates nuclear-cytoplasmic shuttling of Gli-1, *Nature cell biology* 1999, 1:312-319

63. Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C: Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1, *Curr Biol* 1999, 9:1119-1122

64. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, Kenney AM, Brat DJ, Perry A, Yong WH, Taylor RE, Bailey S, Clifford SC, Gilbertson RJ: Medulloblastoma: clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups, *Acta Neuropathol* 2011, 121:381-396

65. Meng X, Poon R, Zhang X, Cheah A, Ding Q, Hui CC, Alman B: Suppressor of fused negatively regulates beta-catenin signaling, *J Biol Chem* 2001, 276:40113-40119

66. Taylor MD, Zhang X, Liu L, Hui CC, Mainprize TG, Scherer SW, Wainwright B, Hogg D, Rutka JT: Failure of a medulloblastoma-derived mutant of SUFU to suppress WNT signaling, *Oncogene* 2004, 23:4577-4583

67. Lee Y, Kawagoe R, Sasai K, Li Y, Russell HR, Curran T, McKinnon PJ: Loss of suppressor-of-fused function promotes tumorigenesis, *Oncogene* 2007, 26:6442-6447

68. Kinzler KW, Bigner SH, Bigner DD, Trent JM, Law ML, O'Brien SJ, Wong AJ, Vogelstein B: Identification of an amplified, highly expressed gene in a human glioma, *Science* 1987, 236:70-73

69. Liu CZ, Yang JT, Yoon JW, Villavicencio E, Pfendler K, Walterhouse D, Iannaccone P: Characterization of the promoter region and genomic organization of GLI, a member of the Sonic hedgehog-Patched signaling pathway, *Gene* 1998, 209:1-11

70. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H: A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro, *Development* 1997, 124:1313-1322

71. Kinzler KW, Vogelstein B: EcoRI polymorphism within the GLI gene (chromosome 12q13.3-14.1), *Nucleic Acids Res* 1990, 18:2834

72. Ruiz i Altaba A: Catching a Gli-mpse of Hedgehog, *Cell* 1997, 90:193-196

73. Cheng SY, Bishop JM: Suppressor of Fused represses Gli-mediated transcription by recruiting the SAP18-mSin3 corepressor complex, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:5442-5447

74. Tojo M, Kiyosawa H, Iwatsuki K, Nakamura K, Kaneko F: Expression of the GLI2 oncogene and its isoforms in human basal cell carcinoma, *The British journal of dermatology* 2003, 148:892-897

75. Jacob J, Briscoe J: Gli proteins and the control of spinal-cord patterning, *EMBO reports* 2003, 4:761-765

76. Motoyama J, Liu J, Mo R, Ding Q, Post M, Hui CC: Essential function of Gli2 and Gli3 in the formation of lung, trachea and oesophagus, *Nat Genet* 1998, 20:54-57

77. Matisse MP, Joyner AL: Gli genes in development and cancer, *Oncogene* 1999, 18:7852-7859
78. Bose J, Grotewold L, Ruther U: Pallister-Hall syndrome phenotype in mice mutant for Gli3, *Human molecular genetics* 2002, 11:1129-1135
79. Rash BG, Grove EA: Patterning the dorsal telencephalon: a role for sonic hedgehog?, *J Neurosci* 2007, 27:11595-11603
80. Ruiz i Altaba A: Gli proteins encode context-dependent positive and negative functions: implications for development and disease, *Development* 1999, 126:3205-3216
81. Sasaki H, Nishizaki Y, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H: Regulation of Gli2 and Gli3 activities by an amino-terminal repression domain: implication of Gli2 and Gli3 as primary mediators of Shh signaling, *Development* 1999, 126:3915-3924
82. Bigelow RL, Chari NS, Uden AB, Spurgers KB, Lee S, Roop DR, Toftgard R, McDonnell TJ: Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1, *J Biol Chem* 2004, 279:1197-1205
83. Wang B, Fallon JF, Beachy PA: Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb, *Cell* 2000, 100:423-434
84. Preat T, Therond P, Lamour-Isnard C, Limbourg-Bouchon B, Tricoire H, Erk I, Mariol MC, Busson D: A putative serine/threonine protein kinase encoded by the segment-polarity fused gene of *Drosophila*, *Nature* 1990, 347:87-89
85. Sisson JC, Ho KS, Suyama K, Scott MP: Costal2, a novel kinesin-related protein in the Hedgehog signaling pathway, *Cell* 1997, 90:235-245
86. Qing Shi SL, Shuangxi Li, Alice Jiang, Yongbin Chen, Jin Jianga.: Hedgehog-induced phosphorylation by CK1 sustains the activity of Ci/Gli activator, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014., 111(152): E5651-E5660.
87. Oro AE: The primary cilia, a 'Rab-id' transit system for hedgehog signaling, *Current opinion in cell biology* 2007, 19:691-696
88. Pedersen LB, Mogensen JB, Christensen ST: Endocytic Control of Cellular Signaling at the Primary Cilium, *Trends in biochemical sciences* 2016, 41:784-797
89. Corcoran RB, Scott MP: A mouse model for medulloblastoma and basal cell nevus syndrome, *J Neurooncol* 2001, 53:307-318
90. Wechsler-Reya R, Scott MP: The developmental biology of brain tumors, *Annu Rev Neurosci* 2001, 24:385-428
91. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB: Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer, *Nature* 2003, 422:313-317
92. Berman DM, Karhadkar SS, Maitra A, Montes De Oca R, Gerstenblith MR, Briggs K, Parker AR, Shimada Y, Eshleman JR, Watkins DN, Beachy PA: Widespread requirement for Hedgehog ligand stimulation in growth of digestive tract tumours, *Nature* 2003, 425:846-851
93. Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, Dhara S, Gardner D, Maitra A, Isaacs JT, Berman DM, Beachy PA: Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis, *Nature* 2004, 431:707-712
94. Chen X, Horiuchi A, Kikuchi N, Osada R, Yoshida J, Shiozawa T, Konishi I: Hedgehog signal pathway is activated in ovarian carcinomas, correlating with cell proliferation: it's inhibition leads to growth suppression and apoptosis, *Cancer Sci* 2007, 98:68-76
95. Yanai K, Nagai S, Wada J, Yamanaka N, Nakamura M, Torata N, Noshiro H, Tsuneyoshi M, Tanaka M, Katano M: Hedgehog signaling pathway is a possible therapeutic target for gastric cancer, *Journal of surgical oncology* 2007, 95:55-62

96. Stecca B, Mas C, Clement V, Zbinden M, Correa R, Piguet V, Beermann F, Ruiz IAA: Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:5895-5900
97. Rao G, Pedone CA, Del Valle L, Reiss K, Holland EC, Fults DW: Sonic hedgehog and insulin-like growth factor signaling synergize to induce medulloblastoma formation from nestin-expressing neural progenitors in mice, *Oncogene* 2004, 23:6156-6162
98. Palma V, Lim DA, Dahmane N, Sanchez P, Brionne TC, Herzberg CD, Gitton Y, Carleton A, Alvarez-Buylla A, Ruiz i Altaba A: Sonic hedgehog controls stem cell behavior in the postnatal and adult brain, *Development* 2005, 132:335-344
99. Romer JT, Kimura H, Magdaleno S, Sasai K, Fuller C, Baines H, Connelly M, Stewart CF, Gould S, Rubin LL, Curran T: Suppression of the Shh pathway using a small molecule inhibitor eliminates medulloblastoma in *Ptc1(+/-)p53(-/-)* mice, *Cancer Cell* 2004, 6:229-240
100. Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritti-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G: Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches, *Neuron* 2003, 39:937-950
101. Lai K, Kaspar BK, Gage FH, Schaffer DV: Sonic hedgehog regulates adult neural progenitor proliferation in vitro and in vivo. Edited by 2003, p.pp. 21-27
102. Ahn S, Joyner AL: In vivo analysis of quiescent adult neural stem cells responding to Sonic hedgehog, *Nature* 2005, 437:894-897
103. Marino S: Medulloblastoma: developmental mechanisms out of control, *Trends Mol Med* 2005, 11:17-22
104. Uziel T, Zindy F, Xie S, Lee Y, Forget A, Magdaleno S, Rehg JE, Calabrese C, Solecki D, Eberhart CG, Sherr SE, Plimner S, Clifford SC, Hatten ME, McKinnon PJ, Gilbertson RJ, Curran T, Sherr CJ, Roussel MF: The tumor suppressors *Ink4c* and *p53* collaborate independently with *Patched* to suppress medulloblastoma formation, *Genes Dev* 2005, 19:2656-2667
105. Goodrich LV, Milenkovic L, Higgins KM, Scott MP: Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse *patched* mutants, *Science* 1997, 277:1109-1113
106. Park HL, Bai C, Platt KA, Matisse MP, Beeghly A, Hui CC, Nakashima M, Joyner AL: Mouse *Gli1* mutants are viable but have defects in SHH signaling in combination with a *Gli2* mutation, *Development* 2000, 127:1593-1605
107. Kimura H, Stephen D, Joyner A, Curran T: *Gli1* is important for medulloblastoma formation in *Ptc1+/-* mice, *Oncogene* 2005, 24:4026-4036
108. Corrales JD, Rocco GL, Blaess S, Guo Q, Joyner AL: Spatial pattern of sonic hedgehog signaling through *Gli* genes during cerebellum development, *Development* 2004, 131:5581-5590
109. Svard J, Heby-Henricson K, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergstrom A, Ericson J, Toftgard R, Teglund S: Genetic elimination of *Suppressor of fused* reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway, *Dev Cell* 2006, 10:187-197
110. Rubin LL, de Sauvage FJ: Targeting the Hedgehog pathway in cancer, *Nature reviews Drug discovery* 2006, 5:1026-1033
111. Scales SJ, de Sauvage FJ: Mechanisms of Hedgehog pathway activation in cancer and implications for therapy, *Trends in pharmacological sciences* 2009, 30:303-312
112. Teglund S, Toftgard R: Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma, *Biochimica et biophysica acta* 2010, 1805:181-208
113. Mar BG AD, Aifantis I, Buonamici S.: The controversial role of the Hedgehog pathway in normal and malignant hematopoiesis., *Leukemia* 2011, , 25(11):1665-1673.

114. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, Scheithauer BW, Kleihues P: The 2007 WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System, *Acta Neuropathol* 2007, 114:97-109
115. Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee, *Cancer* 1999, 86:349-363
116. Maris JM: Recent advances in neuroblastoma, *N Engl J Med* 2010, 362:2202-2211
117. London WB, Castleberry RP, Matthay KK, Look AT, Seeger RC, Shimada H, Thorner P, Brodeur G, Maris JM, Reynolds CP, Cohn SL: Evidence for an age cutoff greater than 365 days for neuroblastoma risk group stratification in the Children's Oncology Group, *J Clin Oncol* 2005, 23:6459-6465
118. Brodeur GM: Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma, *Nat Rev Cancer* 2003, 3:203-216
119. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL, Castel V, Castelberry RP, De Bernardi B, Evans AE, Favrot M, Hedborg F, et al.: Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging, and response to treatment, *J Clin Oncol* 1993, 11:1466-1477
120. Monclair T, Brodeur GM, Ambros PF, Brisse HJ, Cecchetto G, Holmes K, Kaneko M, London WB, Matthay KK, Nuchtern JG, von Schweinitz D, Simon T, Cohn SL, Pearson AD: The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) staging system: an INRG Task Force report, *J Clin Oncol* 2009, 27:298-303
121. D'Angio GJ, Evans AE, Koop CE: Special pattern of widespread neuroblastoma with a favourable prognosis, *Lancet* 1971, 1:1046-1049
122. Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Olsen L, Pahlman S: A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage, *Lab Invest* 1996, 75:659-675
123. Mosse YP, Laudenslager M, Longo L, Cole KA, Wood A, Attiyeh EF, Laquaglia MJ, Sennett R, Lynch JE, Perri P, Laureys G, Speleman F, Kim C, Hou C, Hakonarson H, Torkamani A, Schork NJ, Brodeur GM, Tonini GP, Rappaport E, Devoto M, Maris JM: Identification of ALK as a major familial neuroblastoma predisposition gene, *Nature* 2008, 455:930-935
124. Caren H, Abel F, Kogner P, Martinsson T: High incidence of DNA mutations and gene amplifications of the ALK gene in advanced sporadic neuroblastoma tumours, *Biochem J* 2008, 416:153-159
125. Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL: Neuroblastoma, *Lancet* 2007, 369:2106-2120
126. Westermann F, Schwab M: Genetic parameters of neuroblastomas, *Cancer Lett* 2002, 184:127-147
127. Sait Tumer OA, Ozkan Bagci, H. Nur Olgun The Detection of Genetic Parameters for Prognostic Stratification of Neuroblastoma Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique Genetic Testing and Molecular Biomarkers 2016,, 20:1-7
128. Ambros PF AI, Strehl S, et al. : Regression and progression in neuroblastoma: does genetics predict tumour behaviour?, *Eur J Cancer* 1995,, 31:510-515.
129. Mora J CN, Gerald WL.: Genetic heterogeneity and clonal evolution in neuroblastoma., *Br J Cancer*, 2001, 85(82):182-189.
130. K. S: p73: a Positive or Negative Regulator of Angiogenesis, or Both?, *Mol Cell Biol* 2015,, 36(36):848-854

131. Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM: Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas, *Oncogene* 1999, 18:4948-4957
132. Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Shiseki M, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J: Allelotype of neuroblastoma, *Oncogene* 1995, 11:1829-1834
133. Guo C, White PS, Hogarty MD, Brodeur GM, Gerbing R, Stram DO, Maris JM: Deletion of 11q23 is a frequent event in the evolution of MYCN single-copy high-risk neuroblastomas, *Medical and pediatric oncology* 2000, 35:544-546
134. Thorner PS, Squire JA: Molecular genetics in the diagnosis and prognosis of solid pediatric tumors, *Pediatr Dev Pathol* 1998, 1:337-365
135. Hiyama E, Hiyama K, Ohtsu K, Yamaoka H, Ichikawa T, Shay JW, Yokoyama T: Telomerase activity in neuroblastoma: is it a prognostic indicator of clinical behaviour?, *Eur J Cancer* 1997, 33:1932-1936
136. Streutker CJ, Thorner P, Fabricius N, Weitzman S, Zielenska M: Telomerase activity as a prognostic factor in neuroblastomas, *Pediatr Dev Pathol* 2001, 4:62-67
137. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW: Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes, *Nat Med* 1995, 1:249-255
138. Nakagawara A: Trk receptor tyrosine kinases: a bridge between cancer and neural development, *Cancer Lett* 2001, 169:107-114
139. Gry M, Rimini R, Stromberg S, Asplund A, Ponten F, Uhlen M, Nilsson P: Correlations between RNA and protein expression profiles in 23 human cell lines, *BMC genomics* 2009, 10:365
140. Pritchard JI, Olson JM: Methylation of PTCH1, the Patched-1 gene, in a panel of primary medulloblastomas, *Cancer Genet Cytogenet* 2008, 180:47-50
141. Bleeker G TG, Adam JA, Caron HN, Kremer LC, Hoof L, van Dalen EC.: 123I-MIBG scintigraphy and 18F-FDG-PET imaging for diagnosing neuroblastoma., 2015., 29;(29):CD009263.
142. Cushing PBAH: Microchemical Color Reactions as an Aid to the Identification and Classification of Brain Tumors., *Proc Natl Acad Sci U S A* 1925., 11(11): 82-84.
143. Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW: The new WHO classification of brain tumours, *Brain Pathol* 1993, 3:255-268
144. Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M, Sturla LM, Angelo M, McLaughlin ME, Kim JY, Goumnerova LC, Black PM, Lau C, Allen JC, Zagzag D, Olson JM, Curran T, Wetmore C, Biegel JA, Poggio T, Mukherjee S, Rifkin R, Califano A, Stolovitzky G, Louis DN, Mesirov JP, Lander ES, Golub TR: Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression, *Nature* 2002, 415:436-442
145. Provias JP, Becker LE: Cellular and molecular pathology of medulloblastoma, *J Neurooncol* 1996, 29:35-43
146. Giordana MT, Cavalla P, Dutto A, Borsotti L, Chio A, Schiffer D: Is medulloblastoma the same tumor in children and adults?, *J Neurooncol* 1997, 35:169-176
147. Lafuente-Sanchez JV: [A bleak outlook for brain tumours. The challenge of cooperative working], *Rev Neurol* 2006, 42:733-734
148. Hill JR, Kuriyama N, Kuriyama H, Israel MA: Molecular genetics of brain tumors, *Arch Neurol* 1999, 56:439-441
149. McManamy CS, Pears J, Weston CL, Hanzely Z, Ironside JW, Taylor RE, Grundy RG, Clifford SC, Ellison DW: Nodule formation and desmoplasia in medulloblastomas-defining the nodular/desmoplastic variant and its biological behavior, *Brain Pathol* 2007, 17:151-164

150. Eberhart CG, Burger PC: Anaplasia and grading in medulloblastomas, *Brain Pathol* 2003, 13:376-385
151. Polkinghorn WR, Tarbell NJ: Medulloblastoma: tumorigenesis, current clinical paradigm, and efforts to improve risk stratification, *Nat Clin Pract Oncol* 2007, 4:295-304
152. Maire JP, Guerin J, Rivel J, San Galli F, Bernard C, Dautheribes M, Caudry M: [Medulloblastoma in children. Prognostic incidence of vascular hyperplasia, coagulation necrosis and postoperative clinical state on survival], *Neurochirurgie* 1992, 38:80-88
153. Brown HG, Kepner JL, Perlman EJ, Friedman HS, Strother DR, Duffner PK, Kun LE, Goldthwaite PT, Burger PC: "Large cell/anaplastic" medulloblastomas: a Pediatric Oncology Group Study, *J Neuropathol Exp Neurol* 2000, 59:857-865
154. Giangaspero F, Rigobello L, Badiali M, Loda M, Andreini L, Basso G, Zorzi F, Montaldi A: Large-cell medulloblastomas. A distinct variant with highly aggressive behavior, *Am J Surg Pathol* 1992, 16:687-693
155. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, Eberhart CG, Parsons DW, Rutkowski S, Gajjar A, Ellison DW, Lichter P, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Kool M, Pfister SM: Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus, *Acta Neuropathol* 2012, 123:465-472
156. Ramaswamy V RM, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, Kool M, Dufour C, Vassal G, Milde T, Witt O, von Hoff K, Pietsch T, Northcott PA, Gajjar A, Robinson GW, Padovani L, André N, Massimino M, Pizer B, Packer R, Rutkowski S, Pfister SM, Taylor MD, Pomeroy SL.: Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus., *Acta Neuropathol* 2016 131(136):821-131.
157. Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, Ellison DW: Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis, *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 2006, 5:2666-2670
158. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, Bouffet E, Clifford SC, Hawkins CE, French P, Rutka JT, Pfister S, Taylor MD: Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants, *J Clin Oncol* 2011, 29:1408-1414
159. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, Chintagumpala M, Adesina A, Ashley DM, Kellie SJ, Taylor MD, Curran T, Gajjar A, Gilbertson RJ: Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations, *J Clin Oncol* 2006, 24:1924-1931
160. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrcic A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R: Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features, *PLoS One* 2008, 3:e3088
161. 31. AdjEM, Phoenix TN PD, Boop S, Boulos N, Jacus MO, Patel YT, Roussel MF, Finkelstein D, Goumnerova L, Perreault S, Wadhwa E, Cho YJ, Stewart CF, Gilbertson RJ.: Medulloblastoma Genotype Dictates Blood Brain Barrier Phenotype., *Cancer Cell* 2016,, 29(24):508-522.
162. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, Krush AJ, Berk T, Cohen Z, Tetu B, et al.: The molecular basis of Turcot's syndrome, *N Engl J Med* 1995, 332:839-847
163. Zurawel RH, Chiappa SA, Allen C, Raffel C: Sporadic medulloblastomas contain oncogenic beta-catenin mutations, *Cancer Res* 1998, 58:896-899
164. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Curre DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA,

- Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ: Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins, *Nature* 2010, 468:1095-1099
165. Bale SJ, Falk RT, Rogers GR: Patching together the genetics of Gorlin syndrome, *Journal of cutaneous medicine and surgery* 1998, 3:31-34
166. D.J.H. Shih PaN, M. Remke, A. Korshunov, V. Ramaswamy, M. Kool, B. Luu, Y. Yao, X. Wang, A.M. Dubuc, L. Garzia, J. Peacock, S.C. Mack, X. Wu, A. Rolider, a.S. Morrissy, F.M.G. Cavalli, D.T.W. Jones, K. Zitterbart, C.C. Faria, U. Schüller, L. Kren, T. Kumabe, T. Tominaga, Y. Shin Ra, M. Garami, P. Hauser, J.a. Chan, S. Robinson, L. Bognár, A. Klekner, A.G. Saad, L.M. Liau, S. Albrecht, A. Fontebasso, G. Cinalli, P. De Antonellis, M. Zollo, M.K. Cooper, R.C. Thompson, S. Bailey, J.C. Lindsey, C. Di Rocco, L. Massimi, E.M.C. Michiels, S.W. Scherer, J.J. Phillips, N. Gupta, X. Fan, K.M. Muraszko, R. Vibhakar, C.G. Eberhart, M. Fouladi, B. Lach, S. Jung, R.J. Wechsler-Reya, M. Fèvre-Montange, A. Jouvet, N. Jabado, I.F. Pollack, W.a. Weiss, J.-Y. Lee, B.-K. Cho, S.-K. Kim, K.-C. Wang, J.R. Leonard, J.B. Rubin, C. de Torres, C. Lavarino, J. Mora, Y.-J. Cho, U. Tabori, J.M. Olson, A. Gajjar, R.J. Packer, S. Rutkowski, S.L. Pomeroy, P.J. French, N.K. Kloosterhof, J.M. Kros, E.G. Van Meir, S.C. Clifford, F. Bourdeaut, O. Delattre, F.F. Doz, C.E. Hawkins, D. Malkin, W.a. Grajkowska, M. Perek-Polnik, E. Bouffet, J.T. Rutka, S.M. Pfister, M.D. Taylor.: Cytogenetic prognostication within medulloblastoma subgroups., *J Clin Oncol* 2014., 32: 886-896.
167. Buonamici S, Williams J, Morrissey M, Wang A, Guo R, Vattay A, Hsiao K, Yuan J, Green J, Ospina B, Yu Q, Ostrom L, Fordjour P, Anderson DL, Monahan JE, Kelleher JF, Peukert S, Pan S, Wu X, Maira SM, Garcia-Echeverria C, Briggs KJ, Watkins DN, Yao YM, Lengauer C, Warmuth M, Sellers WR, Dorsch M: Interfering with resistance to smoothed antagonists by inhibition of the PI3K pathway in medulloblastoma, *Science translational medicine* 2010, 2:51ra70
168. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, Holcomb T, Stinson J, Gould SE, Coleman B, LoRusso PM, Von Hoff DD, de Sauvage FJ, Low JA: Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449, *N Engl J Med* 2009, 361:1173-1178
169. Yauch RL, Dijkgraaf GJ, Alicke B, Januario T, Ahn CP, Holcomb T, Pujara K, Stinson J, Callahan CA, Tang T, Bazan JF, Kan Z, Seshagiri S, Hann CL, Gould SE, Low JA, Rudin CM, de Sauvage FJ: Smoothed mutation confers resistance to a Hedgehog pathway inhibitor in medulloblastoma, *Science* 2009, 326:572-574
170. al. RTe: Genome sequencing of pediatric medulloblastoma links catastrophic DNA rearrangements with TP53 mutations, *Cell* 2012., 148: 159-171.
171. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DT, Schlanstein M, Northcott PA, Cho YJ, Koster J, Schouten-van Meeteren A, van Vuurden D, Clifford SC, Pietsch T, von Bueren AO, Rutkowski S, McCabe M, Collins VP, Backlund ML, Haberler C, Bourdeaut F, Delattre O, Doz F, Ellison DW, Gilbertson RJ, Pomeroy SL, Taylor MD, Lichter P, Pfister SM: Molecular subgroups of medulloblastoma: an international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas, *Acta Neuropathol* 2012, 123:473-484
172. Hatten ME, Roussel MF: Development and cancer of the cerebellum, *Trends in neurosciences* 2011, 34:134-142
173. Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL: Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome, *J Clin Oncol* 2011, 29:1424-1430

174. de Haas T, Oussoren E, Grajkowska W, Perek-Polnik M, Popovic M, Zdravec-Zaletel L, Perera M, Corte G, Wirths O, van Sluis P, Pietsch T, Troost D, Baas F, Versteeg R, Kool M: OTX1 and OTX2 expression correlates with the clinicopathologic classification of medulloblastomas, *J Neuropathol Exp Neurol* 2006, 65:176-186
175. Adamson DC, Shi Q, Wortham M, Northcott PA, Di C, Duncan CG, Li J, McLendon RE, Bigner DD, Taylor MD, Yan H: OTX2 is critical for the maintenance and progression of Shh-independent medulloblastomas, *Cancer Res* 2010, 70:181-191
176. Lin CY ES, Tong Y, Yin L, Federation AJ, Zapatka M, Haldipur P, Kawauchi D, Risch T, Warnatz HJ, Worst BC, Ju B, Orr BA, Zeid R, Polaski DR, Segura-Wang M, Waszak SM, Jones DT, Kool M, Hovestadt V, Buchhalter I, Sieber L, Johann P, Chavez L, Gröschel S, Ryzhova M, Korshunov A, Chen W, Chizhikov VV, Millen KJ, Amstislavskiy V, Lehrach H, Yaspo ML, Eils R, Lichter P, Korbel JO, Pfister SM, Bradner JE, Northcott PA.: Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins., *Nature* 2016,, 530(7588):7557-7562
177. C.Y. Lin SE, Y. Tong, L. Yin, A.J. Federation, M. Zapatka, P. Haldipur, D. Kawauchi, T. Risch, H.-J. Warnatz, B.C. Worst, B. Ju, B.A. Orr, R. Zeid, D.R. Polaski, M. Segura-Wang, S.M. Waszak, D.T.W. Jones, M. Kool, V. Hovestadt, I. Buchhalter, L. Sieber, P. Johann, L. Chavez, S. Gröschel, M. Ryzhova, A. Korshunov, W. Chen, V.V. Chizhikov, K.J. Millen, V. Amstislavskiy, H. Lehrach, M.-L. Yaspo, R. Eils, P. Lichter, J.O. Korbel, S.M. Pfister, J.E. Bradner, P.A. Northcott: Active medulloblastoma enhancers reveal subgroup-specific cellular origins., *Nature*, 2016,, 530: 557-562
178. Inda MM1 MJ, Coullin P, Fauvet D, Danglot G, Tuñón T, Bernheim A, Castresana JS.: High promoter hypermethylation frequency of p14/ARF in supratentorial PNET but not in medulloblastoma., *Histopathology* 2006 48(45):579-587.
179. Inda MM1 MJ, Muñoz J, Coullin P, Danglot G, Tuñón T, Martínez-Peñuela JM, Rivera JM, Burgos JJ, Bernheim A, Castresana JS.: PTEN and DMBT1 homozygous deletion and expression in medulloblastomas and supratentorial primitive neuroectodermal tumors., *Oncol Rep.* 2004, 12(16):1341-1347.
180. Cowan R, Hoban P, Kelsey A, Birch JM, Gattamaneni R, Evans DG: The gene for the naevoid basal cell carcinoma syndrome acts as a tumour-suppressor gene in medulloblastoma, *Br J Cancer* 1997, 76:141-145
181. Khalili K, Del Valle L, Wang JY, Darbinian N, Lassak A, Safak M, Reiss K: T-antigen of human polyomavirus JC cooperates with IGF-IR signaling system in cerebellar tumors of the childhood-medulloblastomas, *Anticancer Res* 2003, 23:2035-2041
182. Michiels EM, Weiss MM, Hoovers JM, Baak JP, Voute PA, Baas F, Hermsen MA: Genetic alterations in childhood medulloblastoma analyzed by comparative genomic hybridization, *J Pediatr Hematol Oncol* 2002, 24:205-210
183. Frank AJ, Hernan R, Hollander A, Lindsey JC, Lusher ME, Fuller CE, Clifford SC, Gilbertson RJ: The TP53-ARF tumor suppressor pathway is frequently disrupted in large/cell anaplastic medulloblastoma, *Brain Res Mol Brain Res* 2004, 121:137-140
184. Zurawel RH, Allen C, Chiappa S, Cato W, Biegel J, Cogen P, de Sauvage F, Raffel C: Analysis of PTCH/SMO/SHH pathway genes in medulloblastoma, *Genes Chromosomes Cancer* 2000, 27:44-51
185. Oliver TG, Gräsfeder LL, Carroll AL, Kaiser C, Gillingham CL, Lin SM, Wickramasinghe R, Scott MP, Wechsler-Reya RJ: Transcriptional profiling of the Sonic hedgehog response: a critical role for N-myc in proliferation of neuronal precursors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:7331-7336
186. Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH: Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors, *Development* 2003, 130:15-28

187. Browd SR, Kenney AM, Gottfried ON, Yoon JW, Walterhouse D, Pedone CA, Fults DW: N-myc can substitute for insulin-like growth factor signaling in a mouse model of sonic hedgehog-induced medulloblastoma, *Cancer Res* 2006, 66:2666-2672
188. Chang CH, Housepian EM, Herbert C, Jr.: An operative staging system and a megavoltage radiotherapeutic technic for cerebellar medulloblastomas, *Radiology* 1969, 93:1351-1359
189. Giordana MT, Cavalla P, Chio A, Marino S, Soffietti R, Vigliani MC, Schiffer D: Prognostic factors in adult medulloblastoma. A clinico-pathologic study, *Tumori* 1995, 81:338-346
190. Janss AJ, Yachnis AT, Silber JH, Trojanowski JQ, Lee VM, Sutton LN, Perilongo G, Rorke LB, Phillips PC: Glial differentiation predicts poor clinical outcome in primitive neuroectodermal brain tumors, *Ann Neurol* 1996, 39:481-489
191. Maraziotis T, Perentes E, Karamitopoulou E, Nakagawa Y, Gessaga EC, Probst A, Frankfurter A: Neuron-associated class III beta-tubulin isotype, retinal S-antigen, synaptophysin, and glial fibrillary acidic protein in human medulloblastomas: a clinicopathological analysis of 36 cases, *Acta Neuropathol* 1992, 84:355-363
192. Ito S, Hoshino T, Prados MD, Edwards MS: Cell kinetics of medulloblastomas, *Cancer* 1992, 70:671-678
193. Yasue M, Tomita T, Engelhard H, Gonzalez-Crussi F, McLone DG, Bauer KD: Prognostic importance of DNA ploidy in medulloblastoma of childhood, *J Neurosurg* 1989, 70:385-391
194. Haslam RH, Lamborn KR, Becker LE, Israel MA: Tumor cell apoptosis present at diagnosis may predict treatment outcome for patients with medulloblastoma, *J Pediatr Hematol Oncol* 1998, 20:520-527
195. Cogen PH, McDonald JD: Tumor suppressor genes and medulloblastoma, *J Neurooncol* 1996, 29:103-112
196. Batra SK, McLendon RE, Koo JS, Castelino-Prabhu S, Fuchs HE, Krischer JP, Friedman HS, Bigner DD, Bigner SH: Prognostic implications of chromosome 17p deletions in human medulloblastomas, *J Neurooncol* 1995, 24:39-45
197. Scheurlen WG, Schwabe GC, Joos S, Mollenhauer J, Sorensen N, Kuhl J: Molecular analysis of childhood primitive neuroectodermal tumors defines markers associated with poor outcome, *J Clin Oncol* 1998, 16:2478-2485
198. Ellison DW, Onilude OE, Lindsey JC, Lusher ME, Weston CL, Taylor RE, Pearson AD, Clifford SC: beta-Catenin status predicts a favorable outcome in childhood medulloblastoma: the United Kingdom Children's Cancer Study Group Brain Tumour Committee, *J Clin Oncol* 2005, 23:7951-7957
199. Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, Kokocinski F, Benner A, Stange DE, Neben K, Fiegler H, Carter NP, Reifenberger G, Korshunov A, Lichter P: Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma, *J Clin Oncol* 2005, 23:8853-8862
200. Masaki K, Marukawa K, Hayashi Y, Fukusato T, Minamoto T, Hasegawa M, Yamashita J, Fujisawa H: Correlation of gamma-catenin expression with good prognosis in medulloblastomas, *J Neurosurg* 2005, 102:197-206
201. Fan X, Mikolaenko I, Elhassan I, Ni X, Wang Y, Ball D, Brat DJ, Perry A, Eberhart CG: Notch1 and notch2 have opposite effects on embryonal brain tumor growth, *Cancer Res* 2004, 64:7787-7793
202. Segal RA, Goumnerova LC, Kwon YK, Stiles CD, Pomeroy SL: Expression of the neurotrophin receptor TrkC is linked to a favorable outcome in medulloblastoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994, 91:12867-12871

203. Eberhart CG, Kratz J, Wang Y, Summers K, Stearns D, Cohen K, Dang CV, Burger PC: Histopathological and molecular prognostic markers in medulloblastoma: c-myc, N-myc, TrkC, and anaplasia, *J Neuropathol Exp Neurol* 2004, 63:441-449
204. Bodey B, Kaiser HE, Siegel SE: Epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in childhood brain tumors, *In Vivo* 2005, 19:931-941
205. Shahi MH, Afzal M, Sinha S, Eberhart CG, Rey JA, Fan X, Castresana JS: Human hedgehog interacting protein expression and promoter methylation in medulloblastoma cell lines and primary tumor samples, *J Neurooncol* 2011, 103:287-296
206. Pfaffl MW: A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res* 2001, 29:
207. Boensch M, Oberthuer A, Fischer M, Skowron M, Oestreich J, Berthold F, Spitz R: Quantitative real-time PCR for quick simultaneous determination of therapy-stratifying markers MYCN amplification, deletion 1p and 11q, *Diagn Mol Pathol* 2005, 14:177-182
208. Das PM, Singal R: DNA methylation and cancer, *J Clin Oncol* 2004, 22:4632-4642
209. Clark SJ, Harrison J, Paul CL, Frommer M: High sensitivity mapping of methylated cytosines, *Nucleic Acids Res* 1994, 22:2990-2997
210. Eads CA, Danenberg KD, Kawakami K, Saltz LB, Blake C, Shibata D, Danenberg PV, Laird PW: MethyLight: a high-throughput assay to measure DNA methylation, *Nucleic Acids Res* 2000, 28:
211. Li LC, Dahiya R: MethPrimer: designing primers for methylation PCRs, *Bioinformatics* 2002, 18:1427-1431
212. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB: Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma, *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95:6870-6875
213. Brueckner B, Garcia Boy R, Siedlecki P, Musch T, Kliem HC, Zielenkiewicz P, Suhai S, Wiessler M, Lyko F: Epigenetic reactivation of tumor suppressor genes by a novel small-molecule inhibitor of human DNA methyltransferases, *Cancer Res* 2005, 65:6305-6311
214. Soengas MS, Capodiceci P, Polsky D, Mora J, Esteller M, Opitz-Araya X, McCombie R, Herman JG, Gerald WL, Lazebnik YA, Cordon-Cardo C, Lowe SW: Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma, *Nature* 2001, 409:207-211
215. Clement V, Sanchez P, de Tribolet N, Radovanovic I, Ruiz i Altaba A: HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal, and tumorigenicity, *Curr Biol* 2007, 17:165-172
216. Sanchez P, Hernandez AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A: Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004, 101:12561-12566
217. Lauth M, Bergstrom A, Shimokawa T, Toftgard R: Inhibition of GLI-mediated transcription and tumor cell growth by small-molecule antagonists, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, 104:8455-8460
218. Qualtrough D, Buda A, Gaffield W, Williams AC, Paraskeva C: Hedgehog signalling in colorectal tumour cells: induction of apoptosis with cyclopamine treatment, *Int J Cancer* 2004, 110:831-837
219. Koch A, Waha A, Hartmann W, Milde U, Goodyer CG, Sorensen N, Berthold F, Dignon-Sontgerath B, Kratzschmar J, Wiestler OD, Pietsch T: No evidence for mutations or altered expression of the Suppressor of Fused gene (SUFU) in primitive neuroectodermal tumours, *Neuropathol Appl Neurobiol* 2004, 30:532-539

220. Aldosari N, Bigner SH, Burger PC, Becker L, Kepner JL, Friedman HS, McLendon RE: MYCC and MYCN oncogene amplification in medulloblastoma. A fluorescence in situ hybridization study on paraffin sections from the Children's Oncology Group, *Arch Pathol Lab Med* 2002, 126:540-544
221. Tomlinson FH, Jenkins RB, Scheithauer BW, Keelan PA, Ritland S, Parisi JE, Cunningham J, Olsen KD: Aggressive medulloblastoma with high-level N-myc amplification, *Mayo Clin Proc* 1994, 69:359-365
222. Tonini GP, Boni L, Pession A, Rogers D, Iolascon A, Basso G, Cordero di Montezemolo L, Casale F, Perri P, Mazzocco K, Scaruffi P, Lo Cunsolo C, Marchese N, Milanaccio C, Conte M, Bruzzi P, De Bernardi B: MYCN oncogene amplification in neuroblastoma is associated with worse prognosis, except in stage 4s: the Italian experience with 295 children, *J Clin Oncol* 1997, 15:85-93
223. Mathew P, Valentine MB, Bowman LC, Rowe ST, Nash MB, Valentine VA, Cohn SL, Castleberry RP, Brodeur GM, Look AT: Detection of MYCN gene amplification in neuroblastoma by fluorescence in situ hybridization: a pediatric oncology group study, *Neoplasia* 2001, 3:105-109
224. Tada M, Kanai F, Tanaka Y, Tateishi K, Ohta M, Asaoka Y, Seto M, Muroyama R, Fukai K, Imazeki F, Kawabe T, Yokosuka O, Omata M: Down-regulation of hedgehog-interacting protein through genetic and epigenetic alterations in human hepatocellular carcinoma, *Clin Cancer Res* 2008, 14:3768-3776
225. Taniguchi H, Yamamoto H, Akutsu N, Nosho K, Adachi Y, Imai K, Shinomura Y: Transcriptional silencing of hedgehog-interacting protein by CpG hypermethylation and chromatin structure in human gastrointestinal cancer, *J Pathol* 2007, 213:131-139
226. Martin ST, Sato N, Dhara S, Chang R, Hustinx SR, Abe T, Maitra A, Goggins M: Aberrant methylation of the Human Hedgehog interacting protein (HHIP) gene in pancreatic neoplasms, *Cancer Biol Ther* 2005, 4:728-733
227. Barnfield PC, Zhang X, Thanabalasingham V, Yoshida M, Hui CC: Negative regulation of Gli1 and Gli2 activator function by Suppressor of fused through multiple mechanisms, *Differentiation* 2005, 73:397-405
228. Mas C, Ruiz i Altaba A: Small molecule modulation of HH-GLI signaling: current leads, trials and tribulations, *Biochem Pharmacol* 2010, 80:712-723
229. Wang Y, Zhou Z, Walsh CT, McMahon AP: Selective translocation of intracellular Smoothed to the primary cilium in response to Hedgehog pathway modulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, 106:2623-2628
230. Bar EE, Stearns D: New developments in medulloblastoma treatment: the potential of a cycloamine-lovastatin combination, *Expert Opin Investig Drugs* 2008, 17:185-195
231. Dahmane N, Sanchez P, Gitton Y, Palma V, Sun T, Beyna M, Weiner H, Ruiz i Altaba A: The Sonic Hedgehog-Gli pathway regulates dorsal brain growth and tumorigenesis, *Development* 2001, 128:5201-5212
232. Berman DM, Karhadkar SS, Hallahan AR, Pritchard JI, Eberhart CG, Watkins DN, Chen JK, Cooper MK, Taipale J, Olson JM, Beachy PA: Medulloblastoma growth inhibition by hedgehog pathway blockade, *Science* 2002, 297:1559-1561
233. Jain S SR, Xie J.: Sonidegib: mechanism of action, pharmacology, and clinical utility for advanced basal cell carcinomas. , *Onco Targets* 2017,, 10:1645-1653.
234. Infante P AR, Ingallina C, Quaglio D, Ghirga F, Acquarica I, Bernardi F, Di Magno L, Canettieri G, Screpanti I, Gulino A, Botta B, Mori M, Di Marcotullio L: Inhibition of Hedgehog-dependent tumors and cancer stem cells by a newly identified naturally occurring chemotype. , *Cell Death Dis* 2016,, 7:e2376.

235. Ruat M HL, Faure H, Rognan D. : Targeting of Smoothed for therapeutic gain. , Trends Pharmacol Sci 2014,, 35: 237-246.
236. Svard J H-HK, Persson-Lek M, Rozell B, Lauth M, Bergstrom A et al.: Genetic elimination of Suppressor of fused reveals an essential repressor function in the mammalian Hedgehog signaling pathway. , Dev Cell 2006,, 10: 187-197.
237. Kim J LJ, Kim J, Gardner D, Beachy PA.: Arsenic antagonizes the Hedgehog pathway by preventing ciliary accumulation and reducing stability of the Gli2 transcriptional effector. , Proc Natl Acad Sci U S A 2010,, 107(130):13432-13437
238. . Peukert S M-MK: Small-molecule inhibitors of the hedgehog signaling pathway as cancer therapeutics. , ChemMedChem 2010, 5:500-512.
239. Tchounwou PB PA, Centeno JA Carcinogenic and systemic health effects associated with arsenic exposure-a critical review., Toxicol Pathol 2003,, 31:575-588.
240. Fei DL ea: Activation of Hedgehog signaling by the environmental toxicant arsenic may contribute to the etiology of arsenic-induced tumors. , Cancer Res 2010,, 70:1981-1988.
241. Kim J AB, Tang JY, Kim D, Lee AH, Rezaee M, Kim J, Chen B, King EM, Borodovsky A, Riggins GJ, Epstein EH Jr, Beachy PA, Rudin CM: Itraconazole and arsenic trioxide inhibit Hedgehog pathway activation and tumor growth associated with acquired resistance to smoothed antagonists., Cancer Cell 2013,, 23(21):23-34.
242. Kim DJ KJ, Spaunhurst K, Montoya J, Khodosh R, Chandra K, Fu T, Gilliam A, Molgo M, Beachy PA, Tang JY.: Open-label, exploratory phase II trial of oral itraconazole for the treatment of basal cell carcinoma., J Clin Oncol 2014,, 32(38):745-751.
243. Ally MS RK, Sarin K, Atwood SX, Rezaee M, Bailey-Healy I, Kim J, Beachy PA, Chang AL, Oro A, Tang JY, Colevas AD.: Effects of Combined Treatment With Arsenic Trioxide and Itraconazole in Patients With Refractory Metastatic Basal Cell Carcinoma., JAMA Dermatol 2016, 152(154):452-156
244. Ally MS RK, Sarin K, Atwood SX, Rezaee M, Bailey-Healy I, Kim J, Beachy PA, Chang AL, Oro A, Tang JY, Colevas AD.: Effects of Combined Treatment With Arsenic Trioxide and Itraconazole in Patients With Refractory Metastatic Basal Cell Carcinoma. , JAMA Dermatol 2016,, 152(154):452-156
245. Bar EE CA, Farah MH, Eberhart CG Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II. , Am J Pathol 2007,, 170:347-355.
246. Arnold DE GC, Niknejad N, McBurney MW, Dimitroulakos J.: Lovastatin induces neuronal differentiation and apoptosis of embryonal carcinoma and neuroblastoma cells: enhanced differentiation and apoptosis in combination with dbcAMP. , Mol Cell Biochem 2010,, 345(341-342):341-311
247. Park WH LY, Kim ES, Seol JG, Jung CW, Lee CC, Kim BK.: Lovastatin-induced inhibition of HL-60 cell proliferation via cell cycle arrest and apoptosis., Anticancer Res 1999 19(14B):3133-3140.
248. Apr;Choi JW JS: Lovastatin-induced proliferation inhibition and apoptosis in C6 glial cells., J Pharmacol Exp Ther 1999 289(281):572-289.
249. Jones KD CW, Hinton DR, Su Y, He S, Anker L, Law RE.: Lovastatin induces growth inhibition and apoptosis in human malignant glioma cells., Biochem Biophys Res Commun 1994 ,, 205(203):1681-1687
250. Meyers-Needham M LJ, Gencer S, Sentelle RD, Saddoughi SA, Clarke CJ, Hannun YA, Norell H, da Palma TM, Nishimura M, Kraveka JM, Khavandgar Z, Murshed M, Cevik MO, Ogretmen B.: Off-target function of the Sonic hedgehog inhibitor cyclopamine

- in mediating apoptosis via nitric oxide-dependent neutral sphingomyelinase 2/ceramide induction., *Mol Cancer Ther* 2012,, 11(15):1092-1102
251. Mullen TD OL: Ceramide and apoptosis: exploring the enigmatic connections between sphingolipid metabolism and programmed cell death., *Anticancer Agents Med Chem* 2012,, 12(14):340-363
252. Wolff F LA, Gruber W, Esterbauer H, Aberger F, Frischauf AM.: Imiquimod directly inhibits Hedgehog signalling by stimulating adenosine receptor/protein kinase A-mediated GLI phosphorylation. , *Oncogene* 2013,, 32(50):5574-5581.
253. Y. A: Phosphorylation of Gli by cAMP-dependent protein kinase, *Vitam Horm* 2012,, 88:293-307.
254. Chen Y JJ: Decoding the phosphorylation code in Hedgehog signal transduction, *Cell Res* 2013,, 23(22):186-200.
255. Niewiadomski P KJ, Ahrends R, Ma Y, Humke EW, Khan S, Teruel MN, Novitch BG, Rohatgi R. : Gli protein activity is controlled by multisite phosphorylation in vertebrate Hedgehog signaling. , *Cell Rep* 2014,, 6(1):168-181.
256. Shi Q LS, Li S, Jiang A, Chen Y, Jiang J.: Hedgehog-induced phosphorylation by CK1 sustains the activity of Ci/Gli activator., *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014,, 111(152):E5651-5660.
257. Gruber W HM, Elmer DP, Parigger T, Sternberg C, Cegielski L, Zaja M, Leban J, Michel S, Hamm S, Vitt D, Aberger F.: DYRK1B as therapeutic target in Hedgehog/GLI-dependent cancer cells with Smoothed inhibitor resistance., *Oncotarget* 2016,, 7(6):7134-7148.
258. W. B: Emerging role of DYRK family protein kinases as regulators of protein stability in cell cycle control., *Cell Cycle* 2012,, 11:3389-3394.
259. Lauth M BA, Shimokawa T, Tostar U, Jin Q, Fendrich V, Guerra C, Barbacid M and Toftgard R.: DYRK1B-dependent autocrine-to-paracrine shift of Hedgehog signaling by mutant RAS *Nature structural & molecular biology* 2010,, 17:718-725.

ANEXOS

ANEXO I: ABREVIATURAS

- 5'AZA / 5-aza-dC:** 5-aza-2'- desoxicitidina
- ABCG2:** ATP-binding cassette protein, sub-family G, member 2
- DNA:** Deoxiribonucleic Acid
- BHE:** Barrera HematoEncefálica
- BrdU:** 5-Bromo-2-Deoxiuridina
- cDNA:** DNA complementario
- CGE:** Capa Granulosa Externa (del cerebelo)
- CMN / NSC:** Células Madre Neurales
- PNET:** Tumores del neuroectodermo primitivo
- Ct:** Threshold Cycle (ciclo umbral)
- DMEN:** Dulbecco's Modified Eagle Medium
- DMSO:** Dimetil Sulfoxido
- dNTP:** Deoxinucleotido Trifosfato
- dsRNA:** RNA de doble cadena
- DTT:** Ditioneitol
- EDTA:** Ácido Etilendiamina Tetraacético
- ELISA:** Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay
- FBS:** Suero Bovino Fetal
- GCP:** Precursores de Células Granulares
- Gli1,2,3:** GLI family zinc finger 1,2,3
- HPR:** Peroxidasa del Rábano Picante
- HPRT1:** Hipoxantina fosforibosiltransferasa 1
- HHIP:** Proteína interactuante con Hedgehog
- IDRF:** Factores de Riesgo Definidos por Imagen
- IGF:** Factor de Crecimiento tipo Insulina
- IMD:** DNA Metilado In Vitro
- INRG:** Comité Internacional de Patología del Neuroblastoma
- Kb:** Kilobase/s
- KDa:** Kilodalton/s
- LCR:** Líquido Céfalorraquídeo
- LOH:** Pérdida de Heterocigosidad

LR: Labios Rómbicos (del cerebelo)
MB: Meduloblastoma
Mb: Milimolar
Min: Minuto
mM: Nanomolar
MSP: Metilación-Específica PCR
MYC: v-myc Myelocytomatosis Viral Oncogene Homolog
MYCN: Oncogén relacionado con la mielocitomatosis
NB: Neuroblastoma
NFP: Proteína Neurofilamentosa
ng: nanogramo
Nm: Nanómetros
OMS/WHO: Organización Mundial de la Salud
Pb: Pares de Bases
PBS: Tampón Salino de Fosfato
PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa
PIP3: Fosfatidil Inositol Trifosfato
Pmol: Picomol
PTCH1: Patched 1
PTPs: Proteínas Tirocin fosfatasas
qRT-PCR: PCR Transcriptasa Reversa a tiempo real
RMN: Resonancia Magnética Nuclear
RT-PCR: PCR Transcriptasa Reversa
RPMI: Medio del Instituto Roswell Park Memorial
SHH o Shh: Sonic Hedgehog Homolog
SiRNA: Short interfering RNA
s: segundo
SMO: Smoothened
SNC: Sistema Nervioso Central
SNP: Sistema Nervioso Periférico
SNS: Sistema Nervioso Simpático
SNPS: Sistema Nervioso Parasimpático
SUFU: Supresor de fused
TC: Tomografía Computerizada

TCR: Receptor de transferrina

TGN46: Trans-golgi Network Protein

Tm: Temperatura de fusión

ZSV: Zona Subventricular

ZV: Zona Ventricular

µg: microgramo

µl: microlitro

µmol: micromolar

ANEXO II: REFERENCIAS DE PRODUCTOS FUNGIBLES

5'AZA (Ref. A3656, Sigma)
Agarosa (Ref. 8016, Pronadisa)
Aminoácidos no esenciales (Ref. 11140-035, Gibco)
AmpliAq Gold™ polimerasa (Roche)
Anfotericina B (Ref.15290-018, Gibco)
BLOCK-iT Technology (Invitrogen, Carlsbad, CA)
B27 (Ref. 17504-044, Invitrogen)
bFGF (Ref. 100-18b, Binova)
Bromuro de etidio (EtBr) (Ref. E1510, Sigma)
Cell Death Detection ELISA PLUS (Ref. 11920685001, Roche)
Ciclopamina (CP) (Ref. C4116, Sigma)
CpGenome™ DNA Modification Kit (Ref. S7820, Chemicon® Internacional).
DEPEC (Ref. 40718, Sigma Aldrich)
DMSO (Ref. D-2650, Sigma)
DMEN/F12 + Glutamato (Ref. 31331-028, Invitrogen)
DNAsa I (Ref. 18068-015, Invitrogen)
dNTPs (Ref. 27-2035-01, Pharmacia)
EDTA (Ref. E8008, Sigma)
EGF (Ref. 100-15, Binova)
FBS (Ref. 10082-147, Invitrogen)
PBS (Ref. 10010-015, Invitrogen)
Penicilina/estreptomicina (Ref. 15140, Gibco)
Oligómeros al azar (Ref. 48190-011,Invitrogen)
QuickPrep Total RNA Extraction Kit (Ref. 27-9271-01, Amersham Biosciences)
RPMI 1640 + GlutaMAX™ I (Ref. 61870-010, Invitrogen)
Superscript™ II Transcriptasa RNasa H Reversa (Ref. 18064-022, Invitrogen)
SYBR Green I Master Mix buffer (170-8882 Bio-Rad)
Tripsina – EDTA 0.05 % (Ref. 25300-054, Invitrogen)
Wizard® Genomic DNA Purification kit (Ref. A1120, Promega)

ANEXO III : RELACIÓN DE TABLAS

- Tabla 1.** Genes de la vía de señalización Shh y sus repercusiones clínicas. (p. 50)
- Tabla 2.** Genes importantes en la función de las CMN y su implicación en los tumores del sistema nervioso. (p. 54)
- Tabla 3.** Equivalencia de gradación de los neuroblastomas de la INSS/ INRG. (p. 59)
- Tabla 4.** Alteraciones genéticas en los meduloblastomas. (p. 78)
- Tabla 5.** Clasificación de Chang para los meduloblastomas. (p. 79)
- Tabla 6.** Clasificación de Packer de los MB. (p. 80)
- Tabla 7.** Marcadores moleculares de pronóstico en los meduloblastomas. (p. 81)
- Tabla 8.** Información sobre los genes estudiados. (p. 105)
- Tabla 9.** Secuencias de oligonucleótidos para la RT-PCR. (p. 106)
- Tabla 10.** Condiciones de las reacciones de la RT-PCR. (p. 106)
- Tabla 11.** Programas de PCR utilizados para la RT-PCR. (p. 107)
- Tabla 12.** Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de hibridación para la qRT-PCR. (p. 107)
- Tabla 13.** Oligonucleótidos utilizados en el análisis MCA-Met. (p. 108)
- Tabla 14.** Programas de PCR utilizados para el ensayo MCA-Met. (p. 108)
- Tabla 15.** Secuencias de oligonucleótidos de siRNA contra Gli1. (p. 109)
- Tabla 16.** Amplificación de MYCN en líneas celulares de NB. (p. 116)
- Tabla 17.** Análisis de metilación en líneas celulares de MB mediante MCA-Met. (p. 116)

ANEXO IV: RELACIÓN DE FIGURAS

- Figura 1.** Formación del tubo neural y de la cresta neural. (p. 34)
- Figura 2.** Formación de las vesículas encefálicas a partir del tubo neural rostral. (p. 35)
- Figura 3.** Migración y diferenciación de las CCN a lo largo de la vía ventral desde el tubo neural dorsal. (p. 37)
- Figura 4.** Zonas de actividad neurogénica en el cerebro adulto. (p. 40)
- Figura 5.** Estructura tridimensional del dominio de señalización de Shh. (p. 43)
- Figura 6.** Genes diana de GLI. (p. 50)
- Figura 7.** Modificaciones para el transporte del ligando Shh desde las células de origen a las células diana. (p. 51)
- Figura 8.** Regulación de la vía de señalización Shh en el cilio primario. (p. 52)
- Figura 9.** Modelos de la activación de la vía Shh que contribuyen al cáncer. (p. 55)
- Figura 10.** Clasificación histológica de los neuroblastomas. (p. 60)
- Figura 11.** Tumores neuroblásticos. (p. 68)
- Figura 12.** Subgrupos histológicos de meduloblastomas. (p. 72)
- Figura 13.** Modificación del DNA mediante reacción con bisulfito. (p. 93)
- Figura 14.** Ensayo de metilación mediante análisis de la curva de fusión (MCA-Met). (p.95)
- Figura 15.** Fórmula estructural de la ciclopamina. (p. 98)
- Figura 16.** Análisis de expresión de la vía de señalización Shh en líneas celulares de NB mediante RT-PCR. (p. 113)
- Figura 17.** Expresión de SMO, PTCH1 y GLI1 mediante qRT-PCR en líneas celulares de NB. (p. 114)
- Figura 18.** Análisis de expresión de la vía de señalización Shh en líneas celulares de MB mediante RT-PCR. (p. 115)
- Figura 19.** Algunos de los resultados obtenidos en los análisis de metilación de los genes inhibidores de la vía de señalización Shh: HHIP y SUFU. (p. 117)

- Figura 20.** Promotor no metilado de HHIP en la línea celular TE671 tras el tratamiento con 5-Aza 2'-desoxicitidina . (p. 117)
- Figura 21.** Caída en la expresión relativa de GLI1 en líneas celulares de NB tras el tratamiento con ciclopamina. (p. 118)
- Figura 22.** Porcentaje de expresión de los genes PTCH1 y GLI1 en líneas celulares MB tras el tratamiento con 16 μ M de ciclopamina (p. 119)
- Figura 23.** Porcentaje de supervivencia tras el tratamiento con ciclopamina en líneas celulares de NB. (p. 120)
- Figura 24.** Porcentaje de supervivencia tras el tratamiento con ciclopamina en líneas celulares de MB. (p. 120)
- Figura 25.** Disminución en la formación de colonias tras el tratamiento con ciclopamina en las líneas celulares de NB. (p. 121)
- Figura 26.** Inhibición de la capacidad tumorigénica tras el tratamiento con ciclopamina. (p.122)
- Figura 27.** Detección de la expresión de Gli1 mediante qRT-PCR tras la aplicación de tratamientos inhibitorios a células DAOY. (p. 123)
- Figura 28.** Crecimiento de colonias en agar blando. (p. 124)
- Figura 29.** Crecimiento de los xenotrasplantes *in vivo*. (p. 125 y 126)

ANEXO V: CLASIFICACIÓN DE LA OMS

Grados histológicos de malignidad de tumores seleccionados del SNC según la clasificación de la OMS de 2016.

(Louis DN y cols. Acta Neuropathol. 2016 Jun;131(6):803-20)

WHO grades of select CNS tumours			
Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours			
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	II	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	I
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	III	Papillary glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-wildtype	IV	Rosette-forming glioneuronal tumour	I
Glioblastoma, IDH-mutant	IV	Central neurocytoma	II
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	IV	Extraventricular neurocytoma	II
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	II	Cerebellar liponeurocytoma	II
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	III		
Other astrocytic tumours		Tumours of the pineal region	
Pilocytic astrocytoma	I	Pineocytoma	I
Subependymal giant cell astrocytoma	I	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	II or III
Pleomorphic xanthoastrocytoma	II	Pineoblastoma	IV
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	III	Papillary tumour of the pineal region	II or III
Ependymal tumours		Embryonal tumours	
Subependymoma	I	Medulloblastoma (all subtypes)	IV
Myxopapillary ependymoma	I	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	IV
Ependymoma	II	Medulloepithelioma	IV
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	II or III	CNS embryonal tumour, NOS	IV
Anaplastic ependymoma	III	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	IV
Other gliomas		CNS embryonal tumour with rhabdoid features	IV
Angiocentric glioma	I		
Chordoid glioma of third ventricle	II	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Choroid plexus tumours		Schwannoma	I
Choroid plexus papilloma	I	Neurofibroma	I
Atypical choroid plexus papilloma	II	Perineurioma	I
Choroid plexus carcinoma	III	Malignant peripheral nerve sheath tumour (MPNST)	II, III or IV
Neuronal and mixed neuronal-glia tumours		Meningiomas	
Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	I	Meningioma	I
Gangliocytoma	I	Atypical meningioma	II
Ganglioglioma	I	Anaplastic (malignant) meningioma	III
Anaplastic ganglioglioma	III		
Dysplastic gangliocytoma of cerebellum (Lhermitte-Duclos)	I	Mesenchymal, non-meningothelial tumours	
		Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma	I, II or III
		Haemangioblastoma	I
		Tumours of the sellar region	
		Craniopharyngioma	I
		Granular cell tumour	I
		Pituicytoma	I
		Spindle cell oncocytoma	I

