

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

PERFIL DE EXPRESIÓN DE MICRORNAs EN
MEDULOBLASTOMAS PEDIÁTRICOS. ESTUDIO
PILOTO EN HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO
FEDERICO GÓMEZ

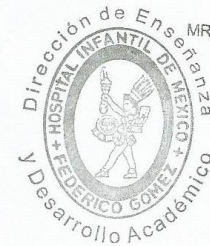
T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PEDIATRÍA

P R E S E N T A:

DRA. VANESSA VITERI TERÁN



DIRECTOR DE TESIS :

DR. MARIO PEREZPEÑA DIAZCONTI



MÉXICO, D. F

Febrero 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

HOJA DE FIRMAS

DRA REBECA GOMEZ CHICO

DIRECTORA DE ENSEÑANZA Y DESARROLLO ACADEMICO

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. MARIO PEREZPEÑA DIAZCONTI

MEDICO ADSCRITO JEFE DEL SERVICIO DE PATOLOGIA

HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

DEDICATORIA

Dedicado a quienes llevan un niño dentro, saben ver con los ojos del corazón, son felices con las cosas sencillas de la vida y todos los días disfrutan de servir a los niños del mundo.

Dedicado a todos los que aman ser Pediatras.

Vanessa Viteri T.

INDICE

INTRODUCCION.....	5
MARCO TEORICO.....	6
ANTECEDENTES.....	15
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	17
PREGUNTA DE INVESTIGACION.....	18
JUSTIFICACION.....	18
OBJETIVOS.....	19
HIPOTESIS.....	19
DISEÑO METODOLÓGICO.....	20
PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO.....	22
DESCRIPCIÓN DE VARIABLES.....	23
RESULTADOS.....	26
DISCUSIÓN.....	27
CONCLUSIONES.....	28
CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES.....	29
LIMITACIONES DEL ESTUDIO.....	30
REFERENCIAS.....	31

INTRODUCCIÓN

El Meduloblastoma es un tumor neuroectodérmico primitivo del cerebelo, constituye alrededor del 20% de los tumores cerebrales en niños y 40% de los que se presentan en la fosa posterior. La mayoría de las veces ocurre dentro de la primera década de la vida y la mitad se presentan en niños menores de 5 a 6 años de edad, su pico de incidencia es a los 5 años y ocurre con mayor frecuencia en el sexo masculino: 2:1.

Pertenece al grupo de tumores embrionarios de la clasificación de la OMS. Es una neoplasia infratentorial de alto grado con tendencia a diseminarse a través del neuroeje, por fuera del SNC con incidencia de 0.5 /100 000 niños. La supervivencia es de 50% a 85% a cinco años. Se han descrito factores de mal pronóstico como edad, localización, tipo histológico, y cambios moleculares que afectan al cromosoma 17, cromosoma 16, cromosoma 10, además de genes y proteínas como P 53, PTEN, MYC.

Además es una neoplasia altamente celular con abundantes mitosis de células intensamente basófilas con núcleos de tamaño y forma variables de citoplasma escaso, pueden estar presentes las rosetas o pseudorrosetas de homerwright. Se desconoce cuál es la célula exacta de origen. El Meduloblastoma crece principalmente en el vermis cerebeloso, aunque hay tumores con las mismas características histológicas que pueden crecer en otros sitios del cerebro y son referidos como Tumores Neuroectodérmicos Primitivos (TNEP).

Al ocupar completamente la fosa posterior invade por contigüidad los tejidos vecinos, se puede diseminar por siembras en el espacio subaracnoideo, siendo el tumor cerebral con mayor frecuencia de diseminación extraneural (hueso, médula ósea, ganglios linfáticos, hígado y pulmón).

Se presenta característicamente con síntomas de hipertensión intracraneana por obstrucción del cuarto ventrículo (70-90%) signos cerebelosos, puede haber afección de pares craneales por hipertensión intracraneana e invasión al tallo cerebral y signos motores aparentes cuando hay invasión medular. A medida que progresa el crecimiento tumoral y aumenta la hidrocefalia se incrementa la presión intracraneana y puede haber herniación de las amígdalas cerebelosas. (1,2,3,4)

MARCO TEORICO

Los tumores del sistema nervioso central representan la segunda causa de cáncer pediátrico diagnosticado cada año en Estados Unidos.

La incidencia se ha incrementado a 3.3 casos por 100 mil, entre 1990 y 1994. En México, en el año 1996 se reportó que los tumores del sistema nervioso central ocupaban el tercer lugar de todas las neoplasias malignas, con una incidencia de 2.5 casos por 100 mil niños menores de 15 años/año. (4,5)

ETIOLOGIA

Algunas alteraciones cromosómicas han sido encontradas en pacientes pediátricos con diagnóstico de meduloblastoma mediante análisis citogenético e hidridación genómica comparativa. El isocromosoma 17q es la alteración más frecuentemente observada en cerca de 40% de casos de meduloblastoma. Es el resultado de pérdida de 17p y ganancia de 17q. La pregunta realizada a través de varias observaciones es si la pérdida de 17p o la ganancia de 17q o ambas son eventos críticos o la ruptura cromosómica en si es importante en la disrupción de genes cruciales para el desarrollo de meduloblastoma. (6)

A pesar de que la patogénesis molecular del meduloblastoma ha avanzado en las últimas dos décadas, el asesoramiento sobre el riesgo de la enfermedad continua basado en parámetros clínicos. Algunos estudios avalan en concepto de que el asesoramiento pronóstico de meduloblastoma debe incluir de manera rutinaria la investigación de marcadores moleculares. El diagnóstico convencional junto con la información molecular debería ayudar a identificar los pacientes con tumores agresivos para quienes el máximo tratamiento sería apropiado de otros quienes pueden sobrevivir con terapia adyuvante menos toxica y en menor intensidad.

Las regiones observadas más comúnmente afectadas son: 17q24-3, ganancia, 8p23-p23.3 pérdida, 17p13.3 pérdida, 7q34-q36.3 ganancia y 10q26.1q26.3 pérdida. (8)

HISTOPATOLOGIA

Este tumor se origina generalmente en el cerebelo. Se puede diseminar contiguamente al pedúnculo cerebeloso, el piso del cuarto ventrículo, a la espina cervical o encima de la tienda del cerebelo. Además, se puede diseminar a través del líquido cefalorraquídeo intracranalmente, a la médula espinal o ambos.

El meduloblastoma clásico es un tumor altamente celular, friable, compuesto de células con núcleo intensamente basofílico, de tamaños y formas variables, con citoplasma relativamente escaso y con abundantes mitosis. Pueden estar presentes rosetas de Homer Wright y pseudorosetas. También se reportan grados variables de diferenciación glial y neuronal. Estos hallazgos son sugestivos de una neoplasia primitiva. Otra variante lo constituye una neoplasia con abundante estroma y apariencia nodular, descrita como desmoplásica.

Una tercera variante es la descrita como de "células grandes" o como de "células grandes anaplásica", caracterizada por células grandes con núcleos grandes redondos, nucléolo prominente, mitosis y apoptosis abundantes y con pleomorfismo nuclear. Estos tumores son positivos para sinaptofisina y cromogranina. Además, pueden presentar amplificación del myc o n-myc. (8,9)

ESTUDIOS COMPLEMENTARIOS

Los estudios de extensión se caracterizan por un examen de imágenes de todo el neuroeje, un análisis del líquido cefalorraquídeo para detectar células tumorales libres en el espacio subaracnoideo.

Dentro de los estudios de imagen, la tomografía computarizada simple y con contraste ha sido superada por el estudio de imagen de resonancia magnética simple y con gadolinio, siendo este último superior a la tomografía con emisión de positrones.

La resonancia magnética permite la localización anatómica de la lesión, las características tisulares del tumor y la vascularidad. Otras ventajas consisten en que presenta las imágenes en tres planos sin necesidad de mover al paciente, éstas se pueden observar sin emitir radiaciones y contrastadas con los tejidos blandos. Este método con gadolinio es también sensible para evaluar la metástasis subaracnoidea de la médula espinal.

Debido a que en algunas ocasiones el meduloblastoma se disemina fuera del sistema nervioso central, especialmente al hueso, puede que sea útil una exploración ósea con gammagrafía ósea, así como una biopsia de médula ósea en los pacientes sintomáticos.

Otro estudio necesario es un gammagrama o ultrasonido hepático por la posibilidad de metástasis a este sitio.

ESTADIFICACIÓN

Hasta hace poco, el sistema de estadificación más comúnmente utilizado era el propuesto por Chang. Este sistema estadifica al tumor mediante una evaluación clínico-quirúrgica.

Sin embargo, algunos expertos están empleando sistemas de clasificación postoperatorios alternativos que se basan en impresiones quirúrgicas y estudios posoperatorios por imágenes. Los pacientes con enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico tienen claramente un riesgo mayor de recaída. (3)

SISTEMA DE ESTADIFICACIÓN DE CHANG

TUMOR

- T1 Techo de 4o ventrículo < 3 cm no rebasa línea media
- T2 >3cm, invade estructuras adyacentes, llena parcialmente 4o ventrículo
- T3a Invade 2 estructuras adyacentes, el 4o ventrículo con extensión al acueducto de Silvio, foramen de LuschkaMagendie, hidrocefalia
- T3b Nace del piso 4o ventrículo o tallo cerebral, invade 4o ventrículo
- T4 Se extiende al acueducto de Silvio, involucra 3er ventrículo, cerebro medio

METASTASIS

M0: Sin evidencia macroscópica de metástasis subaracnoidea o hematógona

M1: células tumorales microscópicas en el líquido cefalorraquídeo.

M2: Siembras nodulares presentes en el espacio subaracnoideo cerebral o en los ventrículos tercero o laterales.

M3: Siembras nodulares en el espacio subaracnoideo espinal

M4: Metástasis fuera del neuro-eje.

FACTORES PRONÓSTICOS

Entre los factores de mal pronósticos se encuentran la edad menor de tres años al momento del diagnóstico, la complicación del tronco encefálico, la resección subtotal y el tumor fuera de la fosa posterior. El tamaño del tumor residual es un factor pronóstico muy importante.

Los tumores neuroectodérmicos primitivos supratentoriales también son neoplasias con pronóstico más desfavorable que los infratentoriales.

La variedad de células grandes anaplásicas también es de mal pronóstico.

Los marcadores biológicos tales como TrkC, expresión C-MYC y HER2, pueden ser predictivos e independientes. (5,6,10)

RIESGO PROMEDIO	RIESGO ALTO
<ul style="list-style-type: none"> - Niños mayores de 3 años de edad. - Tumor de fosa posterior. - Tumor resecado totalmente o con residual menor de 1.5 cm³ sin diseminación. 	<ul style="list-style-type: none"> - Niños menores de 3 años. - Tumor localizado fuera de la fosa posterior. - Tumor resecado en forma incompleta con residual mayor de 1.5 cm³. - Enfermedad metastásica. - Variedad histológica de anaplasia.

SUPERVIVENCIA AUMENTADA	SUPERVIVENCIA DISMINUIDA
Sexo femenino Resección quirúrgica completa sin metástasis Histología Desmoplásico Aumento del índice de apoptosis Hiperdiploidia <ul style="list-style-type: none"> - Expresión elevada del TRKC - Genes característicos de diferenciación cerebelosa: b-NAP, NSCL-1, canales de sodio. - Genes que codifican la matriz extracelular de las proteínas: PLOD, hidroxilasalil, colagena tipo V a1, elastina. 	Edad menor a 3 años al diagnóstico Resección quirúrgica subtotal con metástasis mayor M1 Células grandes anaplásico Índice proliferativo elevado Aneuploidia <ul style="list-style-type: none"> - Expresión elevada de ERBB 2 - Pérdida aislada de la heterocidad del 17 p - Expresión y ampliación de c-MYC - Regulación del PDGFR - Sobreexpresión de calbindin - Genes relacionados a la proliferación y metabolismo MYBL2, Enolasa 1, HMG1 (Y).

TRATAMIENTO

Para la planificación del tratamiento se debe evaluar los siguientes aspectos:

- Evaluar la viabilidad de reducir la dosis de radiación cráneo espinal y de fosa posterior con una intensificación modesta de la quimioterapia en los pacientes con riesgo estándar.
- Determinar si la intensificación de la quimioterapia o la radioterapia puede incrementar la supervivencia en pacientes de alto riesgo.
- Definir los marcadores moleculares y biológicos que pueden incrementar la predicción favorable en pacientes con meduloblastoma y los cuales pueden ser incorporados en nuevos grupos de riesgo.

CIRUGIA

La cirugía desempeña un papel primordial que definitivamente interviene directamente en el pronóstico. Consiste en intentar producir la máxima reducción del tumor, sin causar efectos deletéreos para la función o la vida.

Los niños sin enfermedad diseminada en el momento del diagnóstico tienen una supervivencia libre de progresión mejor que cuando existe enfermedad residual.

Después de la operación se deberán llevar a cabo estudios para determinar si el paciente tiene un riesgo alto de recaer. Los pacientes con tumor extenso deben ser considerados con alto riesgo de

recidiva, y deben ser tratados con protocolos diseñados específicamente para ellos.

La colocación de una derivación ventrículo-peritoneal en hipertensión endocraneana está indicada previa valoración del neurocirujano. En esta última instancia siempre se debe tener en mente la posibilidad de diseminación eventual de las células neoplásicas al peritoneo, lo cual condicionará un pronóstico desfavorable.

Las complicaciones postquirúrgicas pueden ser infecciosas como meningitis séptica o aséptica, pseudo-mielomeningocele, y lesiones neurológicas directas por la manipulación quirúrgica. Hasta el 50% de los pacientes pueden tener apraxia del lenguaje, además pueden presentar déficits cerebelares como disimetría, hipotonía, paresia y depresión durante varios meses. Probablemente sea secundario a la disrupción de las vías de la sustancia reticular. (11)

RADIOTERAPIA PARA PACIENTES RIESGO ESTANDAR

La radioterapia es el tratamiento adyuvante más importante dado que el meduloblastoma es un tumor altamente radiosensible, Las dosis convencionales de radioterapia son 36 Gy para cráneo, 18-20 Gy para neuro-eje completo y fosa posterior 54 a 56 Gy. Usando dichas dosis varios estudios han demostrado que entre el 55% y el 70% de los pacientes sobreviven y están libres de progresión de la enfermedad hasta 5 años posterior al diagnóstico. Una gran proporción de los sobrevivientes de meduloblastoma tienen significantes secuelas a largo plazo relacionadas al tumor, hidrocefalo y complicaciones de la cirugía. Es probable que el factor patológico más importante sea la dosis de radiación cráneo-espinal aplicada como tratamiento. Además la mayoría de los sobrevivientes sufren disfunciones endocrinas y del crecimiento relacionadas con la irradiación a la hipófisis y el hipotálamo.

El concepto actual es administrar radioterapia con acelerador lineal para tratar de disminuir los efectos deletéreos en el paciente con talla baja, alteraciones intelectuales y morbilidad

endocrina, pero también para delimitar exactamente la radiación a los campos tumorales. Sin embargo, a pesar de estas técnicas y equipos modernos, las secuelas a mediano

y largo plazo pueden estar presentes. Las técnicas más recientes con radioterapia conformacional permiten administrar la dosis completa al tumor primario, reduciendo la dosis de radiación a la cóclea y al eje hipotálamo-hipofisario.

Cuando se utilizan técnicas por debajo del estándar óptimo, generalmente terminan con el fracaso entre la unión de los campos cerebroespinales o en la región de la placa cribiforme.

Se ha demostrado que la quimioterapia es activa en pacientes con meduloblastoma recurrente o metastásico.

Conceptos especiales en riesgo promedio

El tratamiento tradicional postquirúrgico para estos pacientes ha consistido en radioterapia a cráneo, fosa posterior y a todo el neuro-eje. El refuerzo estándar en el meduloblastoma

es a la fosa posterior completa; los patrones de fracaso indican que el uso a este sitio es indispensable y eficaz para evitar una recurrencia regional, a la vez que se relaciona con una toxicidad reducida.

Conceptos especiales en riesgo alto

En pacientes que presentan riesgo alto, la adición de quimioterapia ha aumentado la duración de la supervivencia libre de enfermedad.

Éstos son pacientes que en el momento del diagnóstico tienen tumores extensos localmente y con frecuencia no resecables en la fosa posterior, extensión hacia el tronco del encéfalo al diagnóstico, enfermedad metastásica no contigua dentro o fuera del sistema nervioso central o una combinación de los tres. La quimioterapia adyuvante ha mejorado la supervivencia libre de progresión para pacientes con estos parámetros de "riesgo pobre". Estos pacientes deben ser considerados para tratamientos de quimioterapia muy intensos seguidos de terapia ablativa con sostén de células progenitoras, alcanzándose a rescatar menos de la mitad de estos niños. También en estos pacientes parecería que otra alternativa viable son los esquemas de fase II. Otras opciones consisten en la aplicación de nuevos agentes sistémicos o agregar quimioterapia intratecal.

Tratamiento combinado en pacientes de alto riesgo

Para este grupo de pacientes la quimioterapia es parte del tratamiento adyuvante, con nivel I de evidencia, sin embargo no ha sido establecido un esquema específico.

Un único estudio que considero uso de radioterapia seguido de quimioterapia con vincristina, cisplatino y lomustina en pacientes de alto riesgo reporto una supervivencia de alrededor de 85%.

En un estudio realizado por la Sociedad Internacional de Oncología Pediátrica, en el cual se hizo seguimiento durante 76 meses de 27 pacientes con enfermedad metastásica tratados con dosis estándar de radioterapia y lomustina y vincristina obtuvo una supervivencia de 43% a los cinco años.

Estos resultados fueron comparables con los obtenidos por la sociedad Francesa de Oncología Pediátrica en el cual se aplicó el esquema de quimioterapia de "ocho drogas en un día" seguido de dos ciclos de metrotexate y radioterapia, los

resultados reportaron supervivencia de 58.8% en pacientes con metástasis M1 y 43.1% en pacientes con metástasis M2/M3.

Ninguno de estos estudios ha provisto más de tipo 3 de evidencia.

Niños menores de tres años de edad

Algunos pacientes menores de tres años de edad con meduloblastoma recientemente diagnosticado responderán, al menos temporalmente, a la quimioterapia. Algunos pacientes, especialmente aquellos con enfermedad posoperatoria residual mínima, pueden tener una respuesta duradera.

Los niños tratados con quimioterapia solamente podrían tener mejores resultados neurocognitivos que aquellos tratados con radioterapia, con o sin quimioterapia. La modalidad de radioterapia en este grupo debe ser preferentemente con la variedad conformacional y dirigida exclusivamente al lecho tumoral. Sin embargo, con esta última modalidad puede haber deficiencia neurológica previa a la iniciación de la terapia; en algunos casos se ha notado daño neurológico progresivo. Por esta razón se deberá hacer un esfuerzo especial para que los pacientes menores de tres años de edad ingresen a estudios que usan quimioterapia para postergar, modificar o evitar la necesidad de usar radioterapia. Con algo de éxito se ha usado quimioterapia en dosis elevadas con rescate decélulas progenitoras autólogas.

La enfermedad puede recurrir en el sitio del tumor primario o en sitios no contiguos del sistema nervioso central. La recaída sistémica es poco común, pero ocurre. En el momento de la recurrencia, lo indicado para todos los tumores malignos y a veces para lesiones benignas (diferenciado), es una evaluación completa de la extensión de la recurrencia. Puede ser necesaria una biopsia o una resección para confirmar la recaída, ya que entidades tales como un tumor secundario o la necrosis del cerebro relacionada con el tratamiento pueden no distinguirse clínicamente de una recurrencia del tumor. La necesidad de intervención quirúrgica deberá individualizarse con base en el tipo del tumor inicial, la duración entre el tratamiento inicial y la reaparición de la lesión y el cuadro clínico. Los pacientes con meduloblastoma que recurren después de recibir radioterapia sola deben ser considerados para el tratamiento con agentes activos conocidos, los cuales incluyen vincristina, ciclofosfamida, cisplatino, carboplatino, lomustina y etopósido; aunque se ve una respuesta en más de 50% de los pacientes, el control de la

enfermedad a largo plazo es poco común. Debido a la alta morbilidad ocasionada por la radioterapia en menores de tres años; la cirugía continúa siendo la base para mejorar el pronóstico seguida de la quimioterapia.

QUIMIOTERAPIA

Varios medicamentos han sido usados en el tratamiento de meduloblastoma, actualmente son utilizados en el tratamiento estándar de pacientes de alto riesgo. El objetivo de la quimioterapia es retrasar o incluso evitar el tratamiento con radioterapia sin embargo por si sola no puede ser curativa en los pacientes con meduloblastoma no metastásico posterior a la resección total del tumor. Cisplatino, vincristina, lomustina, ciclofosfamida, y etoposido oral son los comúnmente usados en el tratamiento, solos o combinados. En pacientes con diagnóstico de meduloblastoma de alto riesgo tratados con cirugía y radioterapia, la supervivencia libre de enfermedad se ha reportado de 24-40%. Agregando tratamiento con quimioterapia, la supervivencia ha alcanzado 50%, siendo todavía desalentadora.

SEGUIMIENTO

Las recaídas de meduloblastoma ocurren en más de la mitad de los pacientes. Estas recaídas tienen componente de enfermedad diseminada, ocurren en el 75% de casos dentro de los 2 primeros años.

Se recomienda seguimiento con resonancia magnética de cráneo y medula espinal cada 3 meses durante los 2 primeros años, posteriormente de cráneo cada 4 meses durante el 3 año, cada 6 meses hasta los 5 años y finalmente cada año. La evaluación de medula espinal posterior a los dos años se requiere solo si existe sospecha clínica. (7)

ANTECEDENTES

En México, los tumores del sistema nervioso central representan el tercer lugar de todas las neoplasias malignas. El meduloblastoma constituye 20% de los tumores primarios del sistema nervioso central y 40% de los que se originan en el cerebelo; es el tumor maligno más frecuente en la niñez.

Su origen se sitúa en la capa granular externa, normalmente migra del vermis hacia la superficie de los hemisferios cerebelosos y de ahí hacia las porciones profundas para poblar la capa granular interna de las folias. Estos tumores infiltran difusamente a través de las capas moleculares de la corteza cerebelosa por debajo de la pía, similar a lo que ocurre normalmente en las etapas embrionarias. Se diseminan por la circulación del líquido cefalorraquídeo con siembras a lo largo del espacio subaracnoideo y alrededor de la médula espinal para eventualmente salirse del sistema nervioso central y diseminarse a hueso, hígado, médula ósea y otros sitios menos frecuentes. Existen en la actualidad factores pronósticos bien definidos, así como el concepto de tratamiento multidisciplinario que ha condicionado mejores expectativas de supervivencia.

En el HIMFG, de 612 tumores intracraneanos, 263 se localizaron en la región infratentorial. De estos, los meduloblastomas representan 19% del total (154) solo por detrás de los astrocitomas (32 % con 263 tumores).

En cuanto a la etiología genética relacionada con la supervivencia los datos más importantes son los obtenidos en un estudio realizado en Genua, Italia, con el título "Pérdida de 10q26.1-q26.3 en asociación con ganancia 7q34-q36.3 o 17q24.3-q25.3 como predictores de mala supervivencia en meduloblastoma pediátrico". Se realizó con 64 muestras de pacientes sin tratamiento al momento del diagnóstico en tres centros de investigación: Hospital infantil Gaslini Genua: 31 muestras, Biotecnologías avanzadas, Universidad de Nápoles: 14 muestras, y Hospital Infantil Universitario de Turín Regina Margherita: 19 muestras. El único criterio de inclusión utilizado fue el acceso al expediente clínico completo. Cada muestra tenía al menos 85% de células malignas encontradas mediante análisis histológico. La histología de los tumores se analizaron según la clasificación de la organización mundial de la salud. La enfermedad recurrente fue diagnosticada por la presencia de metástasis.

Los tumores fueron extraídos y congelados en el momento de la cirugía y tratados de acuerdo a las recomendaciones de la Sociedad Europea de Genética Humana.

El ADN constitucional fue extraído de los leucocitos de 51 de los 64 pacientes mediante métodos estándar. La cantidad y calidad del ADN fue determinada por espectrofotometría y electroforesis con gel de agarosa. Se obtuvo los siguientes resultados: pérdida de 10q26.1, detectada en 30% de meduloblastomas, ganancia de 7q34-q36.3, detectado en 30% de los tumores y ganancia de 17q24.3-q25.3 detectada en 27.5% de los tumores, fueron las alteraciones más comunes encontradas en el grupo de pacientes con mala evolución clínica. También la presencia simultánea de pérdida de 10q26.1-q26.3 y la ganancia de 17q24.3-q25.3 se asoció con supervivencia significativamente reducida ($p=0.023$). La presencia de MYC, MYCN o amplificación 3p21.2-p21.3 se asoció también con la disminución de la supervivencia del paciente ($p=0.0077$). (12, 13)

El desarrollo intenso de las técnicas de biología molecular ha hecho que estas se encuentren disponibles en laboratorios de investigación logrando avances notables en relación al conocimiento de las neoplasias, particularmente en niños, convirtiéndose en herramientas indispensables en el diagnóstico, pronóstico y blanco terapéutico. En los últimos años la investigación sobre marcadores moleculares en tumores se ha enfocado en estudiar la expresión de los microRNAs (miRNAs). Los miRNAs son moléculas pequeñas de RNA que inhiben la traducción de RNAs mensajeros. Los miRNAs son moléculas que se transcriben de forma activa y regulan la expresión de genes post-transcripcionalmente, participan en la mayoría de los procesos celulares. En el cáncer sus niveles de expresión se encuentran alterados promoviendo la proliferación, metástasis, pérdida de diferenciación y disminución de la apoptosis por tal motivo se clasifican como supresores de tumor y con potencial oncogénico. El número de microRNAs reportado en los últimos años aumentó de forma acelerada, sin embargo el número de blancos validados, así como las vías celulares en las cuales participan es poco conocido. Recientemente se ha comprobado que la alteración en la expresión de los miRNAs participa de manera importante en la oncogénesis. La escasa información de los miRNAs relacionados al meduloblastoma muestran información según la cual, estas neoplasias tienen un perfil de expresión de miRNAs diferente al tejido cerebeloso fetal o adulto. Pocos miRNAs están sobre regulados, mientras que la mayoría de ellos se encuentran sub regulados. Particularmente, el miR-9 y miR-125 a tienen una función inhibitoria del tumor promoviendo la detención del ciclo celular y la apoptosis. (14, 15)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El meduloblastoma presenta una variabilidad histológica y molecular tan importante que hace que aunque todos los tipos de meduloblastoma se clasifiquen como grado IV, el riesgo y el pronóstico de los mismos sean muy amplios.

La clínica depende de la edad del paciente y la extensión de la enfermedad local o diseminada. Suele deberse al aumento de la presión intracraneal por la hidrocefalia secundaria a la obstrucción del tumor, dando lugar a cefalea, vómitos, papiledema, irritabilidad, diplopía, nistagmos y aumento del perímetro cefálico en niños de menor edad. La clínica además tiene relación con la localización del tumor en el vermis provocando ataxia de miembros y disdiadococinesia. La cefalea suele ser el primer síntoma en niños de mayor edad, empeora con el decúbito supino, comienza por la mañana y suele mejorar con el vómito.

Las alteraciones cromosómicas descritas en la literatura en los casos de meduloblastoma incluyen pérdida de la heterocigocidad, deleciones y mutaciones en 17p, 16q, 8p, 10q y 11q. Estudios de hibridación genómica comparativa han identificado grandes regiones de pérdida y en forma más precisa se han localizado pequeñas deleciones en 17p11 hasta en 54% de los casos; pérdida que incluye en el daño 17p13.3, sitio en donde se localiza p53, cuyas mutaciones se han demostrado en otros tumores.

Por otra parte, el perfil de expresión de los miRNAs puede generar información sobre el comportamiento biológico del tumor. Con métodos de biología molecular y celular, es posible establecer evidencias que lo confirmen. En los últimos años, los miRNAs están emergiendo como reguladores de diferenciación celular y proliferación, y han sido implicados en la etiología de los RMS. Pueden ser marcadores tumorales de alta especificidad que permitirá seguir el progreso de la enfermedad. El análisis de la expresión de los miRNAs se ha revelado como una poderosa herramienta para identificar moléculas que tienen un papel importante en el desarrollo de múltiples neoplasias. Sin embargo, particularmente en los meduloblastomas hay muy escasa información. Es necesario identificar perfiles de expresión de miRNAs involucrados en la carcinogénesis de los meduloblastomas y asociarlos a las variantes histológicas, clásico, anaplásico o desmoplásico, y sus características moleculares ligadas a los genes ErbB2 o c-Myc además de correlacionar con los estadios clínicos.

PREGUNTA DE INVESTIGACION:

Analizar el perfil de expresión de los miRNAs en meduloblastoma permitirá encontrar moléculas involucradas en su carcinogénesis?

JUSTIFICACION

En México los tumores del sistema nervioso central ocupan el tercer lugar en frecuencia de todas las neoplasias en edad pediátrica, solo por debajo de las leucemias y linfomas. Son los tumores sólidos más frecuentes en menores de 15 años.

El cuadro clínico inicial de los tumores del sistema nervioso central en niños es inespecífico por lo que el diagnóstico suele ser tardío. En Canadá el tiempo transcurrido desde el inicio de los síntomas hasta recibir la atención por el servicio especializado, después del diagnóstico es de 34 días con intervalo de 16 a 76 días. En México se encontró un promedio de 7 meses desde la primera consulta hasta llegar al diagnóstico.

Los pacientes con meduloblastoma de riesgo estándar, tienen una supervivencia a 5 años de 50% a 80% después de resección, radioterapia y quimioterapia.

La terapia integral en la que se incluye cirugía, radioterapia y quimioterapia, cura aproximadamente 80-85% de los casos de meduloblastoma de riesgo intermedio y hasta un 70% de los de clasificados de alto riesgo. Estudiar el perfil de expresión de los miRNAs en pacientes con meduloblastoma permitirá, posiblemente, tener más armas terapéuticas dirigidas para el tratamiento de estas neoplasias

OBJETIVOS

OBJETIVO PRINCIPAL

- Describir el perfil de expresión de miRNAs en presente en niños con meduloblastoma, diagnosticados en el HIM.

OBJETIVOS SECUNDARIOS

- Describir los miRNAs involucrados
- Describir los valores de los miRNAs encontrados.

HIPÓTESIS

Los grupos de miRNAs pueden contribuir al desarrollo o permanencia de las células tumorales en los casos de meduloblastoma.

DISEÑO METODOLOGICO

Se revisarán los archivos de estudios quirúrgicos del Departamento de Patología del HIMFG para recolectar los casos con diagnóstico de meduloblastoma de 1990 a 2012. Se revisarán las laminillas y se confirmó el diagnóstico; en el mismo paso se escogieron los bloques de parafina que fueron utilizados para la extracción de material genético. **RT-PCR** (Reverse transcription polymerase chain reaction) : Para preparar la muestra se llevó a cabo la desparafinización mediante xileno al 100% se incubó durante 3 minutos a 50°C, posteriormente se centrifugó durante 2 minutos, se decantó el xileno y una vez formada una plaqueta se aplicó etanol al 100% dejando secar al aire libre. Posteriormente se hizo la digestión con proteasa incubándolo a 50°C durante 16 hrs.

Para aislar el ácido nucleico, se preparó una solución de aislamiento con aditivo de aislamiento y etanol, pasando la mezcla a través de un filtro. Se lavará con solución wash1 y con wash 2/3, centrifugando posteriormente para eliminar residuos líquidos. Finalmente se realizará la digestión con nucleasa y la purificación final agregando a cada filtro DNase e incubando durante 30 minutos, se lavará con solución wash1, wash 2/3, y se centrifugará para eliminar residuos líquidos; se diluirá con agua libre de nucleasas a 95°C.

Se incluyeron tres meduloblastomas obtenidos del banco de tumores congelados del Departamento de Patología, del Hospital Infantil de México Federico Gómez. Se extrajo el RNA total a partir de 50 µg de tejido tumoral. La extracción se realizó con el reactivo comercial trizol siguiendo las especificaciones del mismo. Para la reacción de RT se colocó 1 µg de RNA y se utilizó el kit Megaplex Pools, que incluyó oligonucleótidos específicos para sintetizar simultáneamente el cDNA de 768 microRNAs diferentes, divididas en dos reacciones con 384 microRNAs cada una. Para la PCR Se utilizaron arreglos de baja densidad TaqMan (TLDA) divididos en dos arreglos cada uno con 384 iniciadores y sondas TaqMan unidos al fondo de la placa para evaluar un total de 768 microRNAs en cada tumor. Se utilizaron dos tejidos de cerebro normal para comparar con la expresión de los tumores. Se realizó una cuantificación relativa utilizando la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Se utilizó como control endógeno RNU48 y como calibrador cerebro normal proveniente de autopsias.

Para la preparación del gel de poliacrilamida, se usará gel de acrilamida al 13%, posteriormente se llevará a cabo la reacción de electroforesis a 110 voltios durante 70 minutos, finalmente se agregarán las siguientes soluciones; fijadora durante 10 minutos, solución de plata durante 5 minutos, solución reveladora durante 5 minutos y solución de paro 5 minutos.

Se recabaron los resultados y se cuantificara la sobre-expresión y la sub-expresión de micro-RNAs encontrados.

PLAN DE ANALISIS ESTADÍSTICO

Se recabaran los resultados de los expedientes registrados como casos de meduloblastoma desde 1990 a 2012 y se adjuntaron en una base de datos según el siguiente formato. Con la información obtenida se escogieron tres casos de meduloblastoma, según viabilidad de las muestras del tumor y número de miRNA detectados. Se describieron los valores analizándose la expresión incrementada y disminuida de los mismos.

EDAD
SEXO
TIEMPO DE EVOLUCION
LOCALIZACIÓN DEL TUMOR
ESTADIO CLÍNICO
VARIANTE HISTOLOGICA
TRATAMIENTO
PORCENTAJE DE TUMOR RESECADO
TIEMPO DE SUPERVIVENCIA DESPUES DEL DIAGNÓSTICO

DESCRIPCION DE VARIABLES

Edad: Definida como el tiempo que ha vivido una persona desde su nacimiento, cuantificado en años y meses.

Variable cuantitativa discreta.

Sexo: en su definición estricta es una variable biológica y genética que divide a los seres humanos en dos posibilidades solamente: mujer u hombre. La diferencia entre ambos es fácilmente reconocible y se encuentra en los genitales, el aparato reproductor y otras diferencias corporales.

Variable cualitativa dicotómica. Sus valores serán:

- Femenino: Definido biológicamente por la presencia de órganos genitales femeninos y genéticamente por cromosomas XX.
- Masculino: Definido biológicamente por la presencia de órganos genitales masculinos y genéticamente por cromosomas XY.

Tiempo de evolución: Definida como el tiempo transcurrido entre la presencia de signos clínicos y el diagnóstico de la enfermedad. Expresada en meses o años.

Variable cuantitativa discreta.

Localización del tumor: Se refiere a la localización del tumor a nivel cerebral.

Variable cualitativa dicotómica.

- Supratentorial: Se refiere a los tumores que están situados en la cavidad intracraneana por encima del tentorio o tienda del cerebelo.
- Infratentorial: Se refiere a los tumores que están situados en la cavidad intracraneana por debajo del tentorio o tienda del cerebelo.

Estadio clínico: Definido por el sistema de estadificación de Chang.

Variable cualitativa politómica.

SISTEMA DE ESTADIFICACION DE CHANG

TUMOR

- T1 Techo de 4o ventrículo < 3 cm no rebasa línea media
- T2 >3cm, invade estructuras adyacentes, llena parcialmente 4o ventrículo

- T3a Invade 2 estructuras adyacentes, el 4o ventrículo con extensión al acueducto de Silvio, foramen de LuschkaMagendie, hidrocefalia
- T3b Nace del piso 4o ventrículo o tallo cerebral, invade 4o ventrículo
- T4 Se extiende al acueducto de Silvio, involucra 3er ventrículo, cerebro medio

METASTASIS

MO: Sin evidencia macroscópica de metástasis subaracnoidea o hematógica

M1: células tumorales microscópicas en el líquido cefalorraquídeo.

M2: Siembras nodulares presentes en el espacio subaracnoideo cerebral o en los ventrículos tercero o laterales.

M3: Siembras nodulares en el espacio subaracnoideo espinal

M4: Metástasis fuera del neuroeje.

Variante histológica: Definida según la clasificación de la OMS.

Variable cualitativa politómica.

- **Clásico:** Está compuesto por células densamente empaquetadas con nucleohiperromático de forma circular u ovalado similar a una zanahoria, rodeado de escaso citoplasma.
- **Anaplásico:** Se caracteriza por células largas mezcladas con células de diferente morfología caracterizadas por pleomorfismo nuclear y moldeamiento nuclear.
- **Células grandes:** Está compuesto por células monomórficas con núcleo grande, redondo y vesicular, nucléolo prominente y abundante citoplasma eosinofílico.
- **Nodular desmoplásico:** Esta variante contiene zonas nodulares o libres de reticulina que contienen regiones de maduración neuronal que exhiben una relación núcleo citoplasma reducida y una matriz fibrilar y células uniformes con apariencia de neurocitos. Estos nódulos están rodeados de células empaquetadas mitóticamente activas las cuales producen una red densa intercelular de fibras reticulina sensibles.
- **Nodularidad extensa (MBEN):** Se diferencia del nodular desmoplásico por tener una morfología lobular extendida asociada a que las zonas libres de reticulina se vuelven elongadas y ricas en tejido parecido a tejido neuronal.

Dichas zonas contienen una población de pequeñas células con núcleo circular. El componente internodular es marcadamente reducido en ciertas áreas.

Tratamiento: Se refiere al conjunto de medios cuya finalidad es la curación o el alivio de la enfermedad o de la sintomatología

Variable cualitativa politómica cuyos valores pueden ser:

- **Cirugía:** Parte de la medicina que se ocupa de curar las enfermedades, malformaciones, traumatismos, mediante operaciones manuales o instrumentales, en este estudio se refiere a la resección total o parcial de la lesión tumoral.
- **Quimioterapia:** Es el tratamiento del cáncer a través de productos químicos. La función de la quimioterapia es impedir, en las enfermedades neoplásicas, la reproducción de las células cancerosas. Para esto provoca una alteración celular a través de la síntesis de proteínas o de ácidos nucleicos, o mediante la propia división celular.
- **Radioterapia:** Es un método de tratamiento que se aplica en el caso de determinadas enfermedades y que consiste en el empleo de radiaciones ionizantes, especialmente rayos X o radioactividad.

Porcentaje de tumor resecado: Se refiere a la proporción del tumor resecado en relación al tamaño y lesión residual.

Variable cuantitativa discreta.

Tiempo de supervivencia después del diagnóstico: Se refiere al tiempo transcurrido de vida posterior al diagnóstico de meduloblastoma, expresado en años y meses.

Variable cuantitativa discreta.

RESULTADOS

Se estudió el perfil de expresión en tres casos de meduloblastoma de pacientes diagnosticados en el HIMFG.

microRNA	Meduloblastoma 1	Meduloblastoma 2	Meduloblastoma 3
sobre-expresados			
miR-20a	2.6	2.3	0.67
miR-93	2.15	.9	2.66
miR-100	0.52	7.83	2.37
miR-195	1.44	0.78	1.68
miR-199a-3p	2.68	6.24	.274
miR-494	0.12	7.92	2.02
miR-592	0.76	2.07	6.44
sub-expresados			
miR-26a	0.013	0.026	0.098
miR-99b	0.018	0.006	.0063
miR-128	0.1	.02	0.025
miR-193b	0.049	0.033	0.15
miR-330	0.02	0.01	0.05
miR-365	0.10	0.03	0.024
miR-425	0.028	0.032	0.0739
miR-433	0.011	0.091	0.039
miR-574-3p	0.38	0.046	0.096
miR-770-5p	0.00091	0.0057	0.0087

Tabla 1. Valores de expresión de microRNAs en los que se observó mayor alteración en tres meduloblastomas.

DISCUSIÓN

Hemos revisado el perfil de expresión en tres meduloblastomas y cerebelo normal como testigo. Hubo sobre-expresión de 7 miRNAs, y sub-expresión en 10. (ver tabla 1). Algunos de los miRNAs estudiados que presentan sub-expresión pueden estar involucrados en la tumorigénesis, como el miR 128. Tomando en conjunto estos hallazgos, hemos encontrado un grupo de miRNAs que pueden contribuir al desarrollo o permanencia de las células tumorales en los casos de meduloblastoma. Los miRNAs descritos se han informado como participantes en otro tipo de neoplasias, y se conocen como OncomiRs. Entre estos, el miR 26 se ha descrito como participante en cáncer de mama y ovario. Esto nos lleva a reflexionar acerca del papel de familias de miRNAs que actúan sobre diferentes genes actuando en algunos casos como OncomiRs, y en otros casos como supresores tumorales, de acuerdo a los genes blanco. Estos hallazgos abren múltiples opciones a desarrollar tratamientos específicos en genes blanco, evitando terapias agresivas como la quimioterapia o la radioterapia.

Se ha sugerido que los oncomiRNAs tienen un papel crítico en el control y comportamiento tumoral, haciendo blanco en genes específicos y sus productos involucrados en la génesis de los meduloblastomas. Se ha informado que el miRNA let-7 inhibe la expresión del oncogen Ras que está asociado a meduloblastomas de conducta agresiva favoreciendo metástasis tempranas. En este estudio, encontramos al miR 20^a sobre-expresado, que participa en la modulación de E2F1 y coopera con c-Myc para favorecer la tumorigénesis. El oncogenMyc se encuentra frecuentemente sobre-expresado y amplificado en el meduloblastoma y tiene un papel esencial en la tumorigénesis de este tumor. La correlación del perfil de expresión de los miRNAs con factores pronósticos biológicos servirá de pauta para la terapéutica próxima. Se podrán planear tratamientos personalizados de acuerdo al paciente, el tipo de tumor e incluso su tipo histológico.

CONCLUSIONES

Los hallazgos nos permiten fijar nuestra atención en los siguientes miRNAs:

miR-100: Existen una relación funcional entre la célula progenitora/troncal neural(NSPCs) y la célula endotelial (EC). Las NSPCs inducen cambios en la expresión de un grupo de miRs, entre ellos miR-100 los que a su vez modulan la angiogénesis. La sobre-expresión de miR-100 inhibe la angiogénesis en la EC y su sobre-expresión ejerce el efecto contrario. Se ha relacionado con cáncer rectal, pancreático y en neuroblastoma (14).

miR-195: en el GBM se ha reportado como un supresor de tumor. En líneas celulares de GBM su sobre-expresión causa arresto del ciclo celular y disminuye la invasión celular debido a que tiene como blancos a E2F3 y CCND3.

miR-770-5p. Se ha reportado en cáncer cervical de mama y rectal. En meduloblastomas no hay informes hasta este momento.

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

MES	ACTIVIDADES
MAYO 2013	RECOLECCION DE DATOS, REVISION DE EXPEDIENTES
JUNIO 2013	REVISION DE LAMINILLAS
JULIO- MAYO 2014	DETECCION DE MICRO-RNAs.
JUNIO 2014	ANALISIS DE SOBRE-EXPRESION Y SUB-EXPRESION DE MICRO-RNAs ENCONTRADOS
JUNIO 2014	ANALISIS ESTADISTICO DE RESULTADOS
JUNIO 2014	DESCRIPCION DE RESULTADOS
JUNIO 2014	ELABORACION DE CONCLUSIONES

LIMITACIONES DEL ESTUDIO

Para la realización de este estudio piloto únicamente fue posible el análisis de tres casos de meduloblastoma debido a la viabilidad de las muestras y los reactivos necesarios para su aislamiento.

Sin embargo de acuerdo a los resultados, es posible realizar un estudio que incluya mayor número de casos y relacionarlos con la supervivencia y el estadio del tumor para planteamiento de terapia genética.

REFERENCIAS

1. Ries LA, Percy CI, Bunin GR. Introduction-SEER Pediatric Monograph En: Riesl, Smith M, Gurney JG, eds. Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER Program 1975-1995. Bethesda MD: National Cancer Institute. SEER Program, NIH (Pub No. 99-4649); 1999. pp. 1-15.
2. Rivera-Luna R. Conceptos generales del cáncer infantil en México. La investigación en oncología pediátrica En: Rivera-Luna R, ed. Oncología pediátrica. Conceptos básicos y clínicos. México: Intersistemas; 2002; pp. 1-13.
3. Bunin GR. Riskfactorsforchildhoodbraintumors. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 1993;2:277-288.
4. Greenberg RS, Shuster JL Jr. Epidemiology of cancer in children. EpidemiolRev 1985;7:22-48.
5. Grovas A, Fremgen A, Rauck A, Ruyman FB, Hutchinson CL, Winchester DP, et al. The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. Cancer 1997;80:2321-2332.
6. Rivera-Luna R. Tumores del sistema nervioso central En: Rivera-Luna R, ed).Hemato/Oncología pediátrica. Principios generales. México: Editores de Textos Mexicanos; 2006. pp. 335-366.
7. Cohen ME, Duffman PK. Braintumors in children: principles of diagnosis and treatment. 2nd ed. New York: Raven Press; 1994.
8. Russo C, Pellarin M, Tingby O, BollenAW, Lamborn KR, Mohapatra G, et al. Comparative genomic hybridization in patients with supratentorial and infratentorial primitive neuroectodermal tumors. Cancer 1999;86:331-339.
9. Nicholson JC, Ross FM, Kohler JA, Ellison DW. Comparative genomic hybridization and histological variation in primitive neuroectodermaltumours. Br J Cancer 1999;80:1322-1331.
10. Ellison D. Classifying the medulloblastomas insights from morphology and molecular genetics. NeuropatholApplNeurobiol 2002;28:257-282.

11. The Childhood Brain Tumor Consortium. A study of childhood brain tumors based on surgical biopsies from ten North American institutions: sample description. *J Neurooncol* 1988;6:9-23.
12. Kernohan JW. Tumors of congenital origin. In: Minkler J, ed. *Pathology of the nervous system*. New York: McGraw-Hill; 1971. pp. 1927-1937.
13. Annalisa Pezzolo, Simona Coco, Alessandro Rasso, Federica Parodi, Loss of 10q26.1-q26.3 in association with 7q34-q36.3 gain or 17q24.3-q25.3 gain predict poor outcome in pediatric medulloblastoma. *Cancer letters*, (2011), doi:10.1016/j.canlet.2011.05.006
- 14.-[Slaby O](#). MiR-190 leads to aggressive phenotype of neuroblastoma through indirect activation of TrkB pathway. [MedHypotheses](#) 2013, 80: 325-326.
- 15.- Qian-Qian Z, Hui X, Mian-Bo H, et al. MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion. 2012. *Neuro-Oncology* 14(3):278-287.