



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRÍA
CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

TÍTULO

“Asociación de supervivencia con la expresión de Histona 3.3 en pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso en un hospital de tercer nivel”

TESIS PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA EN

Oncología Pediátrica

Tesista: **Dra. Carmen Eurídice Ulloa Salaices**

Médico Residente de Oncología Pediátrica

UMAE Hospital de pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

eu_salaices@hotmail.com

Tutor:

Dr. Javier Enrique López Aguilar

Director médico

UMAE Hospital de pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

javier.glopez@imss.gob.mx

Cotutor:

Dr. Mario Enrique Rendón Macías

Unidad de Investigación en Epidemiología Clínica

UMAE Hospital de pediatría Centro Médico Nacional Siglo XXI

drmariorendon@hotmail.com

Ciudad de México, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

RESUMEN

Introducción: El glioma Pontino intrínseco difuso (DIPG), es un glioma de alto grado originado en el puente. De acuerdo con las OMS se clasifica como glioma de la línea media difuso con H3 K27M mutado Grado IV. El diagnóstico se basa en signos y síntomas, más los hallazgos radiológicos. La biopsia del tumor permite realizar el estudio de la biología molecular, como la búsqueda de la mutación H3.3 encontrada en el 70-80% de los casos, la cual se relaciona con mal pronóstico. A pesar del tratamiento tiene un mal pronóstico, con una supervivencia libre de enfermedad a 2 años menor del 10%.

Objetivo: Determinar si la expresión de Histona 3.3 mutada en pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso se asocia con la supervivencia, en un hospital de tercer nivel.

Metodología: Estudio longitudinal, analítico, observacional, ambispectivo de la expresión de la Histona H 3.3 mutada en pacientes con diagnóstico de DIGP, del período comprendido entre el 1 de junio del 2010 al 30 de junio 2017.

Análisis estadístico: Se realizó el análisis descriptivo de los pacientes con diagnóstico de DIGP. Para el cálculo de la supervivencia se realizaron curvas de Kaplan Meyer y para ver diferencia estadística se realizó la prueba de logaritmo de rango.

Resultados: Se estudiaron 29 pacientes con diagnóstico de DIPG, se realizó biopsia a once pacientes (37%), solo cinco pacientes (17.2%) contaron con muestra para realizar inmunohistoquímica para H3.3 mutado. La histología más frecuente fue Astrocitoma grado II (45%). La mediana de supervivencia general fue de 5 meses. De los pacientes que se realizó H3.3 mutado dos fueron positivos en 90% del tejido con intensidad +++, dos positivos en el 20% del tejido y uno negativo a la expresión, con una mediana de supervivencia de cuatro meses. La principal causa de muerte fue la progresión tumoral.

Conclusiones: a pesar del esfuerzo para realizar toma de biopsia y analizar la biología molecular de los DIPG, la supervivencia de los pacientes sigue siendo baja, deberán realizarse más estudios para introducir una nueva terapia y así mejorar la supervivencia en estos pacientes.

Palabras clave: DIPG, Histona H3.3 mutada, mutación K27M

ÍNDICE

No. de página

Marco Teórico	4
Planteamiento del problema	9
Hipótesis	10
Objetivos del estudio	11
Objetivo general	11
Objetivos específicos	11
Material y métodos	12
Lugar donde se realiza el estudio	12
Población de estudio	12
Criterios de selección	12
Criterios de inclusión	12
Criterios de exclusión	12
Criterios de eliminación	12
Periodo del estudio	12
Tipo de estudio	13
Tamaño de la muestra	13
Metodología	13
Definición de variables	14
Análisis estadístico	16
Aspectos éticos	17
Resultados	19
Discusión	26
Cronograma de actividades	29
Anexos	30
Referencias	33

MARCO TEÓRICO

Los tumores del sistema nervioso central constituyen la segunda causa de muerte en la edad pediátrica. Los tumores que emergen del mesencéfalo, tallo y medula oblonga corresponden al 20% de las neoplasias de SNC ⁽¹⁾.

El glioma pontino intrínseco difuso (DIPG), es un glioma de alto grado originado en el puente, de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud se clasifica como glioma de la línea media difuso con H3 K27M mutado Grado IV. La edad media al diagnóstico es de los 6 a 7 años edad; la relación hombre mujer es 1:1. a pesar del tratamiento, tiene un mal pronóstico, lo que lo convierte en una de las principales causas de muerte en niños ^(2,3).

La presentación clínica habitual son síntomas neurológicos, con duración menor a tres a meses, los cuales varían según la localización de la lesión. El 50% de los pacientes presenta déficit nervioso (diplopía y asimetría facial), signos del tracto largo (Hiperreflexia, Babinski y disminución de la fuerza), y signos cerebelosos (ataxia, disimetría y disartria) ^(1, 2).

La parálisis del VI par craneal es de los primeros signos clínicos. La hipertensión intracraneal se presenta en menos del 10% de los casos y es secundaria a hidrocefalia obstructiva. Otros signos no específicos son anomalías sensoriales, cambios de comportamiento, disminución del rendimiento escolar, apnea del sueño ^(2,4).

El diagnóstico se basa en signos y síntomas, combinado con hallazgos radiológicos. En la resonancia magnética, los tumores DIPG son hipointensos en T1 e hiperintensos T2. Históricamente estos hallazgos eran suficientes para el diagnóstico, como lo refirió Albright en 1993 en los resultados del estudio DIGP 9882 del Children's Cancer Group, donde concluye que resonancia magnética de cráneo es adecuada para realizar el diagnóstico, y que la toma de biopsia no modifica el tratamiento, ni tiene un impacto en el pronóstico ^(1-2, 5).

La confirmación diagnóstica por biopsia se consideraba un riesgo innecesario, sin embargo, en los últimos 30 años no ha mejorado el pronóstico de los pacientes con DIPG, se reporta una supervivencia libre de enfermedad a dos años menor del 10%. Esto probablemente debido a que no se cuenta con muestra de tejido del tumor para realizar investigación preclínica y analizar la biología molecular del tumor. En la actualidad además del diagnóstico por estudio de imagen, se realiza la toma de biopsia por estereotaxia para confirmar el diagnóstico histológico. Se han reportado pocas complicaciones durante la realización de este procedimiento, por lo que se considera un procedimiento seguro, que no impacta de forma adversa en el pronóstico ^(4- 6).

La muestra de tejido del tumor obtenido de la biopsia ha permitido el estudio de la biología molecular del DIPG, se ha encontrado que el gen TP53 esta mutado en el 77% de los casos. Otros genes alterados son PDGFRA; PARP1, PVT-1/MYC, RB1 y PTEN ^(5, 6).

La mutación encontrada exclusiva del DIPG es la mutación K27M en los genes de la Histona H3.1 y H3.3, esta es una mutación heterocigota, se presenta en el 70-80% de los casos ^(7, 11).

La mutación resulta en reemplazar una lisina 27 por metionina (K27M). El K27M es un residuo que puede ser acetilado, metilado o ribosilado en todas las variantes de histonas H3 ^(7, 8). Estas mutaciones inhiben bioquímicamente la PRC2, lo que resulta en una pérdida de la trimetilación de la lisina 27 en todas las histonas H3 salvajes o mutadas, esta es la base de la oncogénesis de DIPG ⁽⁸⁾.

Las mutaciones K27M que codifican Histona H3.3 (H3F3A) y H3.1 (HIST1H3B e HIST1H3C) se encuentran en la mayoría de los DIPG ⁽⁸⁾.

La mutación H3.1 se asocia con las siguientes características edad más temprana de presentación, mejor respuesta al tratamiento con radioterapia y mayor supervivencia 15 meses comparado con H3.3 9 meses, asociándose a un curso menos agresivo de la enfermedad ^(7, 8).

La mutación H3.3, además de encontrarse en los DIPG, se ha identificado en gliomas de alto grado de la línea media. Esta histona se expresa a lo largo de todo el ciclo celular y en las células quiescentes, se deposita en la síntesis del DNA mediante un conjunto de proteínas chaperonas, esta síntesis se expresa a partir de dos genes H3F3A cromosoma 1 y H3F3B en el cromosoma 17. Estos genes

producen proteínas idénticas a pesar de que tiene secuencias reguladoras distintas ⁽⁹⁾.

Los pacientes que expresan H 3.3 mutado, tienen peor pronóstico que los que expresan H 3.3 nativo, independientemente de la edad de presentación y diagnóstico histopatológico. La única característica atribuible al H 3.3 mutado es la diferenciación glial, tienen ganancias y amplificaciones de los genes PVT-1/MYC ⁽⁹⁻¹¹⁾. Los pacientes que expresan H 3.3 nativo muestran ganancia y amplificación de 2p25.1 y 2p24.3, que corresponden a los genes ASAP2 y MYCN. No tienen el curso clínico esperado de los DIGP, lo que sugiere una entidad clínica y molecular atípica ^(10, 11).

La detección de la mutación H 3 puede realizarse mediante inmunohistoquímica o mediante anticuerpos, antiH3K27, el anticuerpo reconoce las variedades H 3.1 y H 3.3 ⁽¹²⁾. Además, se ha realizado la detección en líquido cefalorraquídeo de la Histona 3, en pacientes con diagnóstico de glioma de alto grado, mediante PCR anidado, esto para facilitar el diagnóstico ⁽¹³⁾.

En el 2012 Khuong-Quang y colaboradores realizaron un estudio mediante PCR en 42 pacientes pediátricos con diagnóstico de DIGP, dividiéndolo en dos subgrupos moleculares de acuerdo con la expresión de la Histona 3.3 mutada o nativa. El 71% de los pacientes expresaron H3.3 mutada, la supervivencia fue de 0.73 años, comparada con los que no lo expresaron la forma mutada de 4.59 años ⁽¹⁰⁾.

Buczkwicz y colaboradores (2014) realizaron la determinación de la Histona 3.3 mediante inmunohistoquímica en 72 pacientes pediátricos, encontraron que los que expresaron Histona 3.3 nativa tienen una supervivencia mayor de 1.99 años, comparándolo con la Histona 3.3 mutada de 0.96 años. Además, realizaron una correlación entre el subtipo histológico y la expresión de la Histona H 3.3 mutada reportando que los Astrocitomas de bajo grado expresaron la mutación en un 71%, Glioblastoma multiforme en un 77.5% y el Astrocitoma anaplásico en un 33.3%, los Tumores neuroectodérmicos no expresaron la mutación ⁽⁶⁾.

Castel y colaboradores (2015) realizaron un estudio en el que definieron dos subgrupos de DIGP de acuerdo a la mutación en las Histonas mediante técnica de FISH, se analizaron las muestras de tejido de 91 pacientes pediátricos, los que expresaron H3.1 (n=23) tuvieron una mediana de supervivencia de 15 meses, comparado con los que expresaron H3.3 mutado (n=56) de 9.2 meses ⁽⁸⁾.

En México no se han realizado estudios para determinar la expresión de Histona 3.3 mutada en pacientes pediátricos con Diagnóstico de DIPG.

A pesar de la detección de estas mutaciones no se ha logrado introducir una nueva terapia que mejore la supervivencia de los pacientes con diagnóstico de DIPG.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Glioma Pontino intrínseco difuso, representa el 20% de los tumores del sistema nervioso central, pocos avances se han logrado en el tratamiento de estos tumores, su supervivencia continúa siendo baja, menor al 10%. En estudios recientes se ha encontrado que la mutación de la Histona 3.3 se ha asociado a una presentación más agresiva de la enfermedad y a un peor pronóstico. Nuestro hospital es centro de referencia de tumores de SNC y se atienden pacientes con diagnóstico de DIPG, a los que no se les ha realizado la detección de la Histona H 3.3 mutada.

Por ello, nos planteamos las siguientes preguntas de investigación:

¿Los pacientes con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso expresan Histona 3.3 mutada?

¿Existe asociación de la supervivencia con la expresión de la Histona 3.3 mutada en pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso?

HIPÓTESIS

Los pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso expresan Histona H 3.3 mutada.

Los pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco difuso que expresan Histona 3.3 mutada tendrán una supervivencia 20% menor comparado con los que no lo expresan.

OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar si los pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso expresan Histona 3.3 mutada.

Determinar si la expresión de Histona 3.3 mutada en pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso se asocia con la supervivencia, en un hospital de tercer nivel.

Objetivos específicos

- Describir las características clínicas de los pacientes (edad, sexo, síntomas, localización del tumor) con diagnóstico de DIPG.

MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar en que se realizará el estudio: Servicio de Oncología, Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Población de estudio: pacientes mexicanos con menos de 17 años de edad con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco difuso.

Criterios de selección:

Inclusión

- Menores de 17 años
- De cualquier sexo
- Con diagnóstico por imagen y / o histopatológico de DIPG
- Pacientes con diagnóstico de DIPG que cuenten con bloques de parafina para realizar inmunohistoquímica
- Diagnosticados durante el periodo del 1 de junio 2010 al 31 de junio 2017.

Exclusión

- Pacientes enviados con tratamientos previos

Eliminación

- Pacientes con expediente incompleto

Periodo de estudio: 1 de junio 2010 al 30 de junio 2017.

Tipo de estudio:

Por maniobra: observacional

Por número de grupos: analítico

Por número de mediciones: longitudinal

Por causalidad: ambispectivo

Por obtención de la muestra: prolectivo

Diseño: Longitudinal analítico

Tamaño de la muestra: Muestreo por conveniencia. Se incluirán a todos los disponibles en el período señalado que cumplan los criterios de selección.

Metodología

De la carpeta de registro de todos los pacientes atendidos en el hospital con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco difuso, se obtuvo nombre y cédula del paciente.

Una vez confirmados los datos se buscó el expediente electrónico y físico para confirmar el diagnóstico, se obtuvo información sobre las características de los pacientes como edad, sexo, localización de la tumoración, fecha de última consulta y/o fecha de defunción.

De cada paciente se buscó si se realizó biopsia y reporte de patología, para corroborar el diagnóstico histopatológico.

En el Servicio de Patología del Hospital se solicitaron bloques de parafina y se realizó inmunohistoquímica para H 3.3 mutado.

Definición de variables

Nombre	Tipo	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Escala de medición
Edad	Universal	Tiempo transcurrido desde el nacimiento hasta la actualidad	Edad reportada en el expediente al momento del diagnóstico	Meses	Cuantitativa continua
Sexo	Universal	Se refiere al género de una persona	Género reportado en el expediente al momento del diagnóstico	Femenino Masculino	Cualitativa nominal
Expresión de la mutación Histona 3.3	Independiente	Se refiere a la expresión de la mutación H 3.3.	Positividad en inmunohistoquímica para del H3.3	Si No	Cualitativa nominal dicotómica
Supervivencia	Dependiente	Conservación de la vida desde el diagnóstico hasta la muerte.	Tiempo transcurrido desde el diagnóstico hasta la muerte o última consulta.	Meses	Cuantitativa continua
Localización	Universal	Sitio donde se localiza la tumoración.	Presencia de tumor en mesencéfalo, puente o bulbo.	Mesencéfalo Puente Bulbo	Cualitativa Nominal
Histología del tumor	Universal	Diferenciación y tipo predominante celular de un tejido en su evaluación microscópica	Tipo histológico descrito en el reporte de patología.	Astrocitoma grado I Astrocitoma grado II Astrocitoma grado III Glioblastoma Tumor neuroectodermico primitivo	Cualitativa nominal
Quimioterapia	Universal	Tratamiento con	Esquema recibido como	Si	Cualitativa nominal

		medicamentos para interrumpir la formación de células cancerosas.	quimioterapia.	No	dicotómica
Radioterapia	Universal	Uso de radiación de alta energía proveniente de rayos X y otras fuentes para destruir células cancerosas y disminuir el tamaño tumoral.	El haber recibido tratamiento con radiación.	Si No	Cualitativa nomina dicotómica

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para el análisis descriptivo: se resumieron las características de los pacientes con diagnóstico de Glioma pontino intrínseco difuso. Para las variables cualitativas se obtuvieron frecuencias simples y relativas en porcentajes. La contrastación entre los grupos de variables cualitativas se usó la prueba de Chi cuadrada. En las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central, se calcularon sus medianas.

Se construyeron curvas de Kaplan Meier para determinar la supervivencia y para valorar diferencias entre dos curvas se utilizó la prueba de logaritmo de rango.

Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS versión 20 y se consideró un nivel de significancia estadístico con un valor de p menor a 0.05.

ASPECTOS ÉTICOS

De acuerdo al artículo 17 en el numeral 1 de la Ley General de Salud en materia de investigación este protocolo es considerado una investigación sin riesgo, debido a que no se realizará ninguna intervención o modificación intencionada de ninguna variable fisiológica, psicológica ni social de los pacientes que participen para el registro y solo se llevará a cabo la revisión de expedientes clínicos y bloques de parafina.

El registro de los pacientes se apega al reglamento de la Ley General de Salud en materia de investigación y de la Declaración de Helsinki, esta investigación se justifica para que la población pediátrica de estudio se beneficie con los resultados del análisis de los datos que se obtengan.

BENEFICIO DEL ESTUDIO PARA LOS PARTICIPANTES Y LA SOCIEDAD: En esta investigación no existe beneficio individual o directo para los participantes, el beneficio como resultado de la investigación y análisis de los datos será para la sociedad ya que permitirá la comprensión biológica y características clínicas de DIPG, generará nuevos enfoques para el diagnóstico, así como desarrollar en un futuro terapias más efectivas que mejoren la sobrevida de los pacientes con gliomas difusos.

BALANCE RIESGO/BENEFICIO: Al ser un estudio sin riesgo, el beneficio para la población a través de la generación de conocimiento se considera favorable.

PROCEDIMIENTO PARA GARANTIZAR LA CONFIDENCIALIDAD: Para asegurar la confidencialidad de cada individuo no se publicarán en los resultados nombre o número de afiliación.

La información de los participantes se garantizará mediante el resguardo de la información de los pacientes con DIPG, la cuál será únicamente del conocimiento del investigador principal. Los datos de los pacientes durante y posterior a la investigación serán confidenciales, de manera que no se podrán identificar en ningún momento.

El proyecto fue sometido al comité de investigación y ética de nuestro hospital con número de aprobación **R-2017-3603-83**.

RESULTADOS

Durante el período de estudio se atendieron 29 pacientes con el diagnóstico de glioma pontino intrínseco difuso, de ellos 19 (65%) fueron mujeres y 10 (34%) hombres. Se realizó biopsia de la tumoración a solo once pacientes (37%), aunque de ellos en cinco (17.2%) la muestra fue suficiente para la realización de la inmunohistoquímica.

Características de los pacientes

En el cuadro I, se resume la información de los pacientes agrupados por edades pediátricas. Como se muestra, el grupo con mayor número de casos fue el de 5 a 9 años (55%; N=16), seguido del de 1 a 4 años (24%, N=7) y por último los de 10 a 14 años (20%; N=6).

El grupo etario con mayor proporción de biopsias fue el de 1 a 4 años (4/7; 57.1%), seguido por los de 5 a 9 años 37.5% (6/16) y los de 10 a 14 (1/6; 16.6%).

De los pacientes con biopsia, el tumor más frecuente fue el Astrocitoma grado II 45% (5/11), seguido de Astrocitoma grado III 36% (4/11) y por último el Astrocitoma grado I 18% (2/11).

Las modalidades de tratamiento fueron Radioterapia y Quimioterapia.

El 79% de los pacientes (N=23) recibieron radioterapia, principalmente los pacientes mayores de 3 años. Por otro lado, el 96% recibió quimioterapia; el esquema más utilizado fue ICE + Temozolamida, seguido de otros esquemas como: Carboplatino + VCR, o Carboplatino + VCR + Temozolamida. A cuatro

pacientes con manejo inicial con Carboplatino + Vincristina, posteriormente requirieron una modificación a ICE + Temozolamida (Cuadro I).

Supervivencia de pacientes con glioma pontino intrínseco difuso

De los pacientes que contaban con tejido para realizar inmunohistoquímica H3.3 mutado (cinco pacientes), dos fueron positivos con intensidad +++ y con 90% del tejido (Figura 4); sus histologías fueron Astrocitoma anaplásico y Astrocitoma difuso, su supervivencia fue de 3 y 4 meses respectivamente. Otros dos pacientes resultaron con positividad, pero solo en el 20% del tejido, uno con intensidad del marcado de +++, histología Astrocitoma pilocítico; y el otro de ++, histología Astrocitoma anaplásico. El primer paciente vivió cinco meses y el segundo cuatro meses. El último paciente con estudio de H3.3 mutado fue negativo al marcador, con histología Astrocitoma anaplásico. Este paciente vivió solo un mes post-diagnóstico por un problema infeccioso pulmonar. La figura 1 muestra una mediana de supervivencia de 4 meses.

La supervivencia general de los pacientes fue evaluada independientemente de si se realizó o no biopsia y si fueron positivos o no para H 3.3 mutado. La figura 2 muestra una mediana de supervivencia de 5 meses.

En cuanto a la supervivencia según grupos de edad (Figura 3), la medida del grupo de 1 a 4 años fue 3 meses; de 5 a 9 años fue de 4 meses y 10 a 15 años fue de 8 meses. En todos los pacientes hubo progresión del tumor como causa de la muerte. Cinco pacientes fallecieron en nuestro hospital y el resto en su domicilio.

Cuadro I. Características de los pacientes con glioma pontino intrínseco difuso según grupos de edad.

		1 a 4 años N=7	5 a 9 años N=16	10 a 14* N=6	Todos N=29
Sexo					
	Femenino	6	9	4	19
	Masculino	1	7	2	10
Biopsia					
	Si	4	6	1	11
Histopatología (biopsia)					
	Astrocitoma grado I	0	2	0	2
	Astrocitoma grado II	2	3	0	5
	Astrocitoma grado III	2	1	1	4
H3.3 mutado					
	Sin muestra	2	4	0	6
	Negativo	1	0	0	1
	Positivo 20% ++	0	1	0	1
	Positivo 20% +++	0	1	0	1
	Positivo 90% +++	1	0	1	2
Radioterapia [§]					
	Si	3	14	6	23
	No	4	2	0	6
Quimioterapia					
	Ninguna	1	0	0	1
	ICE	0	3	1	4
	ICE+TMZ	4	7	4	15
	CBDCA+VCR	0	4	0	4
	CBSCA+VCR+TMZ	1	0	0	1
	CBDCA+VCR/ICE+TMZ	1	2	1	4

*un paciente masculino de 15 años. [§] Prueba Chi cuadrada $p=0.019$.

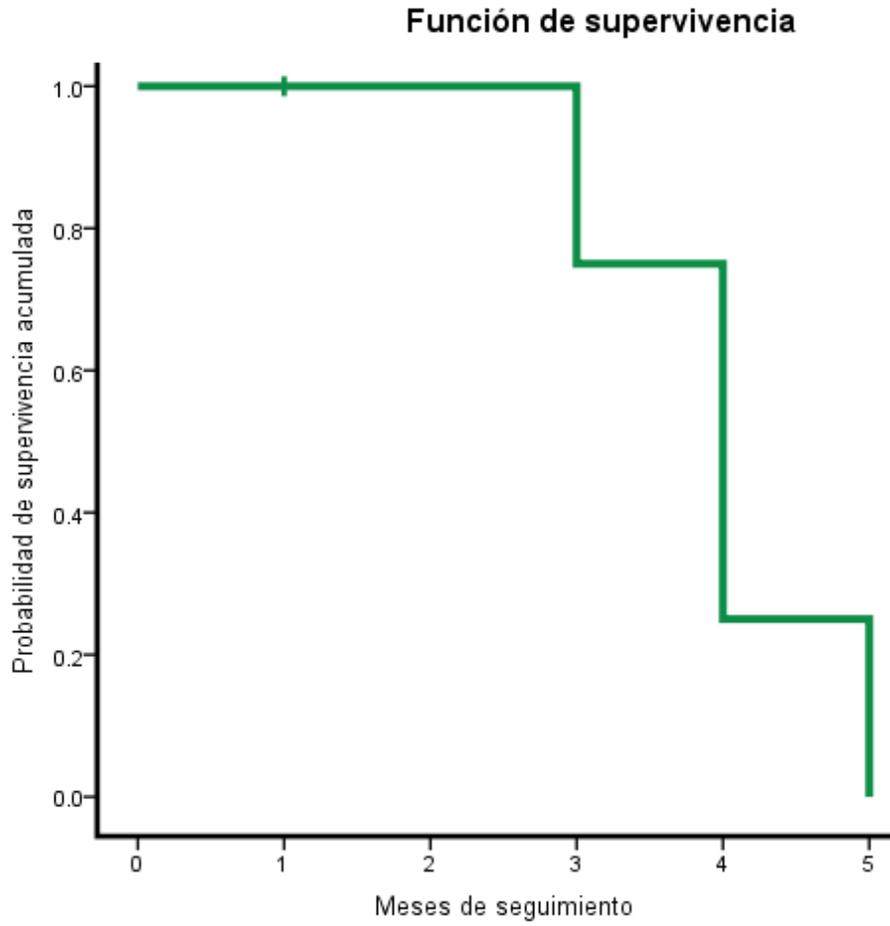


Figura 1. Supervivencia de los pacientes con glioma pontino intrínseco difuso que expresaron de H 3.3 mutado (N=4). Mediana de supervivencia 4 meses.

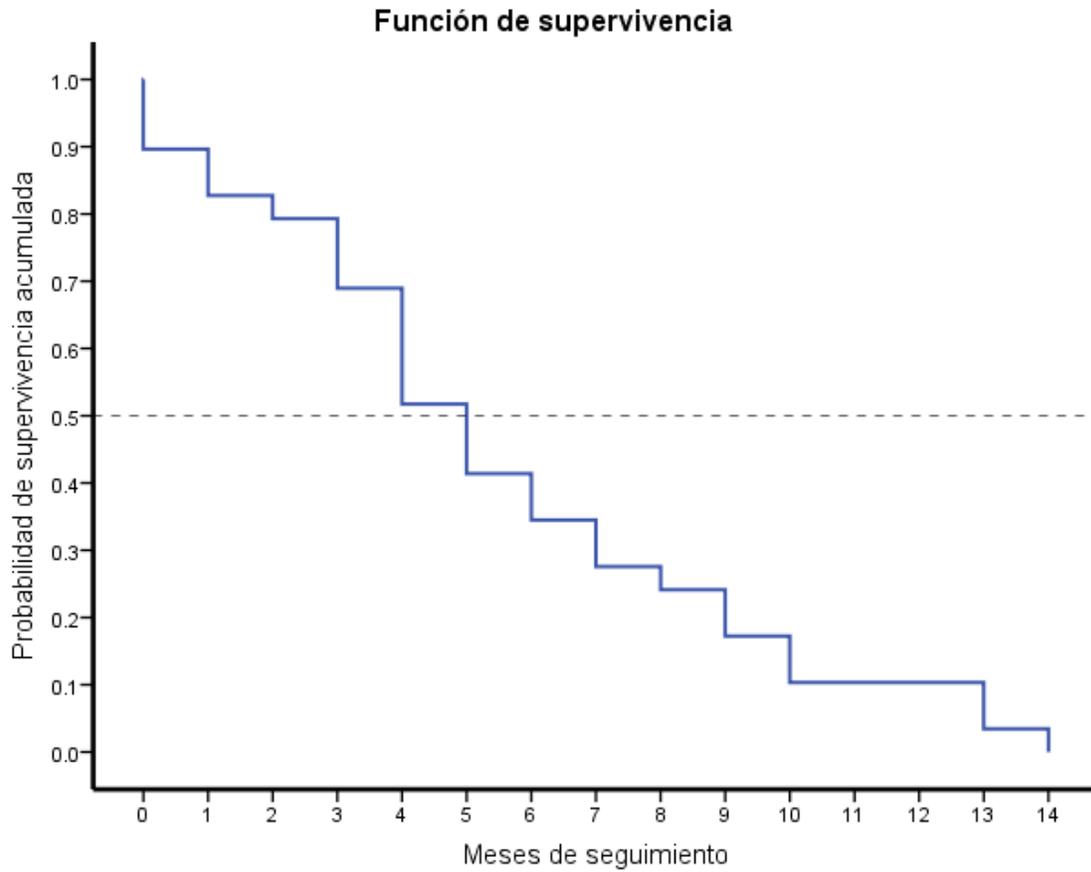


Figura 2. Supervivencia general de los pacientes con glioma pontino intrínseco difuso (N=29). Mediana de supervivencia de 5 meses.

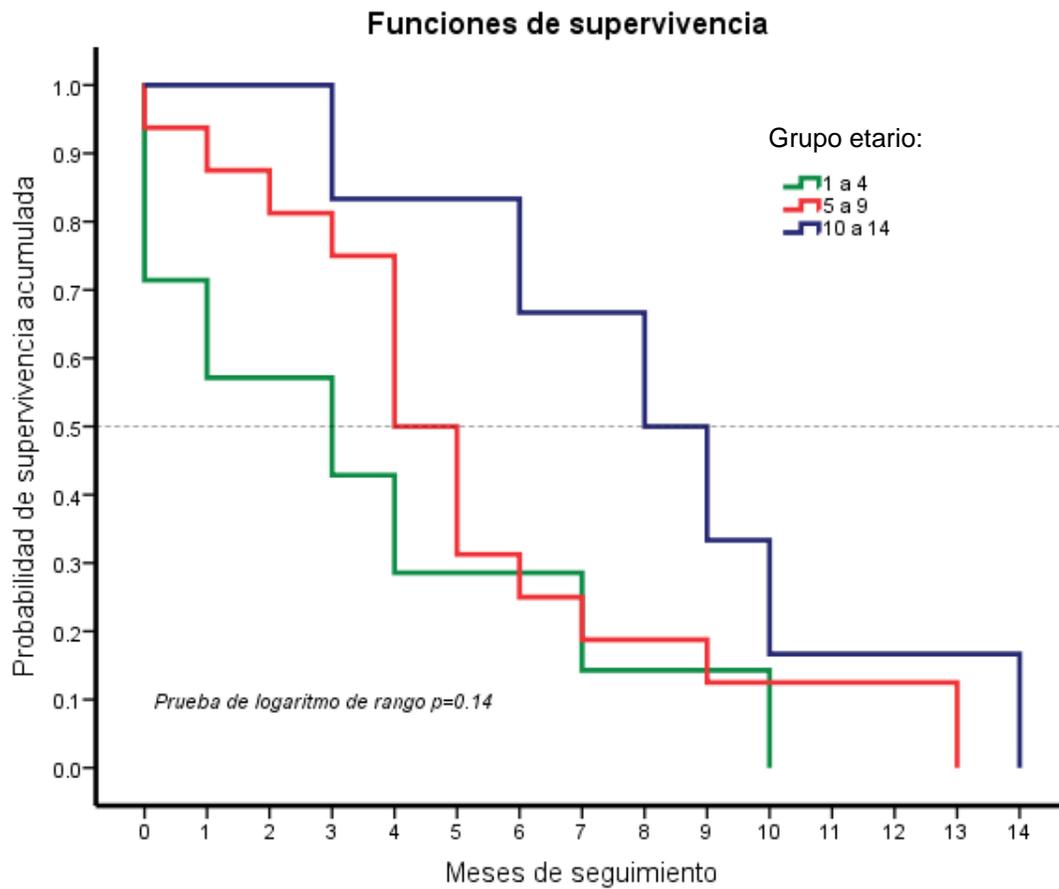


Figura 3. Supervivencia según grupos de edad (mediana grupo de 1 a 4 años: 3 meses, 5 a 9 años: 4 meses y 10 a 15 años: 8 meses, $p=0.14$).

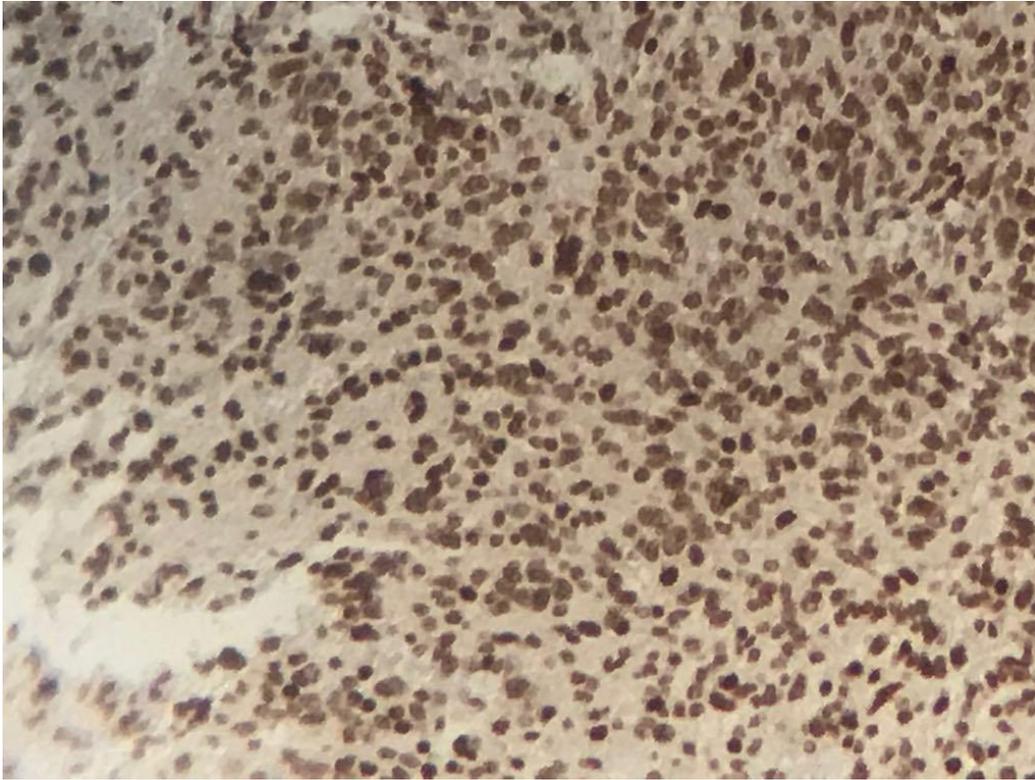


Figura 4. Inmunohistoquímica en tejido de un glioma pontino intrínseco difuso positivo para la expresión de H3.3 mutado (coloración café en el núcleo). Imagen por microscopía.

DISCUSIÓN

Este es el primer estudio en México donde se trató de asociar la expresión de Histona 3.3 mutada de tumores del tallo (gliomas) en niños con su sobrevida. La principal limitante en nuestros resultados fue la baja frecuencia de pacientes sometidos a biopsia y la aún menor proporción de muestras adecuadas para la realización de la inmunohistoquímica. Por lo anterior, solo se pudo constatar que, de los cinco pacientes completamente estudiados, la positividad se mostró en cuatro (80%), porcentaje similar al 71% y 77.5% para los gliomas de bajo y alto grado respectivamente informados por Buczkowicz ⁽⁶⁾.

Por nuestra reducida muestra de pacientes no se pudo establecer diferencias en la supervivencia relacionadas a la positividad mutado a H3.3. De nuestros pacientes positivos la mediana de supervivencia fue de cuatro meses (0.33 años), un mes menor a la mediana del grupo total. En el informe de Khuong-Quang ⁽¹⁰⁾, los pacientes con positivos a H3.3 mutado tuvieron una mediana de supervivencia de 0.73 años, para el grupo de Buczkowicz ⁽⁶⁾ fue de 0.96 años y para los pacientes de Castel ⁽⁸⁾ de 9.2 meses. En estos informes si se pudo hacer evidente la menor supervivencia al compararse con pacientes negativos a H3.3 mutado. La mayor mortalidad encontrada ha sido relacionada a una presentación más tardía en la edad de los pacientes, más agresiva de la enfermedad y a una respuesta menor a la radioterapia ⁽⁸⁾. Nuevamente nosotros no pudimos demostrar una diferencia en las edades de presentación, ya que el grupo más prevalente fue el de 5 a 9 años.

Por otro lado, las características de los pacientes de esta investigación coinciden con las reportadas en publicaciones previas; esto es, el grupo etario con mayor número de pacientes fue el de 5 a 9 (años 55%) y la proporción de mujeres fue más alta ^(2, 3).

El diagnóstico en nuestros pacientes fue radiológico basado en las imágenes de la resonancia magnética de cráneo. Las lesiones neoplásicas son bastante bien conocidas y desde 1993 Albright publicó los hallazgos radiológicos suficientes para su diagnóstico ^(1-2, 5-6). Así mismo, estudios previos han mostrado el alto riesgo de realizar biopsias sin mejorar sustancialmente el pronóstico ⁽⁵⁾. El realizar una biopsia de la tumoración en los últimos años ha sido dirigida a mejorar el diagnóstico genético y biología molecular de los tumores; en particular para establecer mejor el pronóstico al tratamiento ^(5-7,11,12).

Es de remarcar, que la sobrevida de nuestros pacientes con glioma pontino intrínseco difuso fue en promedio de cinco meses. Esta sobrevida, poco más baja a los informado por otros autores, Hhuong-Quang (2012) de 0.73 años, la reportada por Buczkowicz (2014) de 0.96 años y la reportada por Castel (2015) de 9.2 meses ^(6,8, 10), al momento no tenemos una explicación a este fenómeno y pudiera ser un motivo de un estudio posterior. Es de comentar que en varios centros la base del tratamiento es la radioterapia y distintos esquemas de quimioterapia con relación al nuestro ⁽¹⁾.

Un aspecto a resaltar es la alta frecuencia de pacientes fallecidos en su domicilio. Esto ha sido una postura de nuestro hospital para mejorar las condiciones familiares asociadas al momento del desenlace.

En conclusión, no todos los pacientes con diagnóstico de DIPG expresan Histona 3.3 mutada, el 20% en este estudio no lo hizo; la histología reportada para este caso fue Astrocitoma anaplásico. No logramos establecer una asociación entre la expresión de la Histona 3.3 mutada y la supervivencia, la mediana de supervivencia general fue de 5 y la supervivencia para los pacientes que expresaron H 3.3 mutado fue de 4 meses.

Es importante señalar que en nuestro hospital se realizan cultivos celulares del tejido tumoral, y en relación al DIPG con expresión de Histona 3.3 mutado y desarrollo de neuroesferas, se encontró que solo dos presentaron desarrollo de estas, ambos pacientes con histología Astrocitoma anaplásico, el paciente sin expresión de Histona 3.3 mutado también tuvo desarrollo de neuroesferas.

Sin embargo, a pesar del esfuerzo para realizar toma de biopsia y analizar la biología molecular de los DIPG, la supervivencia de los pacientes sigue siendo baja, deberán realizarse más estudios para introducir una nueva terapia y así mejorar la supervivencia en estos pacientes.

CRÓNOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Abril 2017	Mayo 2017	Junio 2017	Julio 2017	Agosto- Diciembre 2017	Enero 2018	Febrero 2018
Delimitación del tema a estudiar	x						
Revisión y selección de la bibliografía		x	x	X			
Evaluación por el comité local de investigación					x		
Recolección de datos						X	
Análisis de los datos						X	
Elaboración de informe final						X	
Presentación de resultados							X

ANEXO 1

Hoja de recolección de datos

“Asociación de supervivencia con la expresión de Histona 3.3 mutada en pacientes pediátricos con diagnóstico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso en un hospital de tercer nivel”

Nombre:

NSS:

Sexo:

Edad:

Fecha de diagnóstico:

Localización:

- a) Mesencéfalo
- b) Puente

Bulbo

Biopsia a) Si

Fecha de toma biopsia:

b) No

Histología del tumor:

- a) Astrocitoma Grado I
- b) Astrocitoma Grado II
- c) Astrocitoma Grado III
- d) Otro _____

Expresión H 3.3

- a) Si
- b) No

Características de la positividad

Tratamiento

Radioterapia

Quimioterapia

- a) Si
- b) No

- a) Si. Cual _____
- b) No

Fecha defunción:

Fecha de última consulta:

Meses de supervivencia:

ANEXO 2

TÉCNICA DE INMUNOHISTOQUÍMICA

Tinción manual

1. Desparafinación, rehidratación y recuperación del epítipo; el método preferido es el uso de las técnicas de recuperación del epítipo inducida por el calor (HIER). El método preferido permite la desparafinación, rehidratación y recuperación del epítipo simultáneas. Al terminar, enjuague con 5 cambios de agua destilada o desionizada.
2. Coloque los portaobjetos en un bloque de peróxido durante 10 minutos; enjuague.
3. Aplicar el anticuerpo e incubar durante 10 - 30 minutos; enjuague.
4. Para el sistema de detección de 2 pasos del polímero aplique el amplificador.
5. Aplique el reactivo de detección durante 10 minutos. Enjuague.
6. Aplique una cantidad abundante de cromógeno e incube durante 1-10 minutos; enjuague.
7. Deshidrate y coloque el cubreobjetos

Procedimiento de control de calidad

Control de tejido positivo: Los tejidos de control deben ser muestras frescas de autopsia, biopsia o cirugía preparadas o fijadas con la mayor brevedad con un proceso idéntico al de los cortes en estudio. El uso de un corte de tejido fijado o procesado de forma diferente a la muestra en estudio servirá para el control de todos los reactivos y pasos del método excepto la fijación y el procesamiento del tejido. Un tejido con una tinción positiva débil es más adecuado para un control de calidad óptimo y para detectar niveles pequeños de degradación del reactivo. Los controles de tejido positivos conocidos solo se deben usar para monitorizar el comportamiento correcto de los tejidos procesados y los reactivos de la prueba, y no como ayuda para establecer un diagnóstico específico de las muestras del paciente. Si los controles positivos del tejido no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control De Tejido Negativo: El mismo tejido utilizado para el control de tejido positivo se puede utilizar en el control de tejido negativo. La variedad de tipos de células presentes en la mayoría de los cortes de tejidos ofrece sitios de control negativo internos, pero esto debe verificarlo el usuario. Los componentes que no se tiñen deben demostrar la ausencia de tinción específica y proporcionar una indicación de tinción de fondo no específica. Si se produce una tinción específica en los sitios de control de tejido negativo, los resultados obtenidos con las muestras del paciente deben considerarse no válidas.

Reactivo De Control Negativo: Se debe utilizar un reactivo de control negativo para cada muestra para ayudar a interpretar los resultados. Para evaluar una tinción no específica se utiliza un reactivo de control negativo en lugar del anticuerpo primario. Se deberá tratar el portaobjetos con el reactivo de control negativo haciendo coincidir las especies huéspedes del anticuerpo primario e idóneamente con la misma concentración de IgG. El periodo de incubación para el reactivo de control negativo deberá ser igual que el periodo de incubación del anticuerpo primario.

Interpretación de los resultados

Control De Tejido Positivo: El control de tejido positivo teñido debe examinarse primero para determinar que todos los reactivos funcionan adecuadamente. La presencia de un producto de reacción con el color adecuado dentro de las células diana es indicativa de una reactividad positiva. Consulte en el prospecto del sistema de detección utilizado las reacciones de color esperadas. Según sea la duración de la incubación y la potencia de la hematoxilina empleada, la contratinción dará como resultado una coloración azul de pálida a oscura de los núcleos celulares. Una contratinción excesiva o incompleta puede comprometer la interpretación adecuada de los resultados. Si los controles de tejidos positivos no muestran una tinción positiva apropiada, los resultados de las muestras en estudio se deben considerar no válidos.

Control De Tejido Negativo: El control de tejido negativo debe examinarse después del control de tejido positivo para verificar la marcación específica del antígeno diana por el anticuerpo primario. La ausencia de tinción específica en el control de tejido negativo confirma la ausencia de reactividad cruzada del anticuerpo con las células o los componentes celulares. Si se produce una tinción específica en el control de tejido negativo, los resultados obtenidos con la muestra del paciente se consideran no válidos. La tinción no específica, si la hay, tendrá un aspecto difuso. También se puede observar una ligera tinción específica esporádica del tejido conjuntivo en cortes de tejidos que no estén fijados óptimamente. Para la interpretación de los resultados de la tinción deben usarse células intactas. Las células necróticas o degeneradas muestran una tinción no específica.

Tejido Del Paciente: Las muestras del paciente se deben examinar al final. La intensidad de la tinción positiva se debe valorar en el contexto de cualquier tinción de fondo del control de reactivo negativo. Como en cualquier prueba de inmunohistoquímica, un resultado negativo significa que el antígeno en cuestión no se ha detectado, no que el antígeno esté ausente de las células o del tejido analizado. Un panel de anticuerpos puede ayudar a identificar reacciones negativas falsas (consulte la sección Sumario de resultados esperados). La morfología de cada muestra del tejido también debe examinarse utilizando un corte con tinción de hematoxilina y eosina al interpretar cualquier resultado de inmunohistoquímica. Un patólogo cualificado debe interpretar los resultados morfológicos del paciente y sus datos clínicos pertinentes.

REFERENCIAS

1. Pizzo P., Poplack D. et al. Gliomas, Ependymomas, and other noembryonal tumors of the central nervous system. 2016; 26A:718-772.
2. Schoroder K., Hoeman C., Becher O. Children are just little adults: recent advances in understanding of diffuse intrinsic pontine glioma biology. *Pediatric Research*. 2014; 75:205-209
3. Louis D., Perry A., Reifenberger G., The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathologica*. 2016; 131:803-820.
4. Vanan M., Eisenstat D. DIPG in children- what can we learn from the past?. *Frontiers in Oncology*. 2015. 5:1-17.
5. Wang Z., Rao L., Bhambhani K., Miller K. Brief report Diffuse Intrinsic Pontine Glioma Biopsy: A Single Institution Experience. *Pediatric Blood & Cancer*. 2015. 62:163-165.
6. Buczkowicz P., Bartels U., Bouffet E. Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications. *Acta Neuropathologica*. 2014; 128:573-581.
7. Morales A., Hashizume R., Kieran M. Future clinical trials in DIPG: Bringing epigenetics to the clinic. *Frontiers in Oncology*. 2015; 5:1-5.
8. Castel D., Philippe C., Calmon R. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with

- different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathologica*. 2015; 130:815-827.
9. Kallappagoudar S., Yadav R., Lowe B. Histone H3 mutations- a special role for H3.3 in tumorigenesis?. *Chromosoma. Biology of the nucleus*. 2015; 124:177-189.
 10. Khuong-Quang D., Buczkowicz P., Rakopoulos P. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathologica*. 2012; 124:439-447.
 11. Buczkowicz P., Hawkins C. Pathology, molecular genetics and epigenetics of diffuse intrinsic pontine glioma. 2015; 5:1-9.
 12. Bechet D., Gielen G., Korshunov A. Specific detection of methionine 27 mutation in histone 3 variants (H3K27M) in fixed tissue from high-grade astrocytomas. 2014; 128:733-741.
 13. Huang T., Piunti A., Lulla R. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathologica Communications*. 2017; 5:1-12.