



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS MÉDICAS, ODONTOLÓGICAS Y DE**  
**LA SALUD.**

**INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**  
**CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI, HOSPITAL DE ONCOLOGÍA.**

**TÍTULO:**

Progresión tumoral y estado funcional posterior a radioterapia en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con gliomas de línea media con la mutación H3F3A K27M.

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS MÉDICAS**

Presenta: María Fátima Chilaca Rosas  
Médico Adscrito al servicio de Radioterapia en el hospital de  
oncología del Centro Médico siglo XXI.  
Dirección: Avenida Cuauhtémoc 330, colonia Doctores, 06720.  
Correo electrónico: [fatychro@hotmail.com](mailto:fatychro@hotmail.com)  
Teléfono: 56276900 extensión: 22545

Tutora Principal:

Nombre: Dra. Patricia Piña Sánchez  
Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas,  
hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.  
Dirección: Avenida Cuauhtémoc 330, colonia Doctores, 06720.  
Correo electrónico: [patricia\\_1307@yahoo.com.mx](mailto:patricia_1307@yahoo.com.mx)  
Teléfono: 56276900 extensión: 22710 y 22705

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2020



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.

Comité Tutorial:

1.-Dra. Iris Feria Romero

Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades "Bernardo Sepúlveda" del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Correo electrónico: [irisferi@yahoo.com.mx](mailto:irisferi@yahoo.com.mx)

Teléfono: 5556276900 extensión21365

2.-M. en C. Héctor Urueta Cuellar

Unidad de Genética del Hospital General de México "Eduardo Liceaga".

Correo electrónico: [uuch1506@gmail.com](mailto:uuch1506@gmail.com)

Teléfono: 27892000 extensión1278

Correo electrónico: [uuch1506@gmail.com](mailto:uuch1506@gmail.com)

3.-Marcos Gutiérrez de la Barrera

Adscripción: División de Investigación en el hospital de oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Correo electrónico: [marcosgub@gmail.com](mailto:marcosgub@gmail.com)

Teléfono: 56276900

Dr. Fabio A. Salamanca Gómez

Responsable de la sede de Centro Médico siglo XXI:

CIUDAD DE MÉXICO, FEBRERO 2020

Colaboradores:

Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes  
Jefe de servicio de Patología del Hospital de Pediatría del Centro  
Médico Nacional siglo XXI.  
Correo electrónico: [alicia.siordia@imss.gob.mx](mailto:alicia.siordia@imss.gob.mx)  
Teléfono: 56276900 extensión 22350

M. Gustavo Vázquez Morales  
Jefe de Servicio de Epidemiología  
Medicina Familiar 06, Delegación 2 Norte  
Correo electrónico: [gustavo.vazquez@imss.gob.mx](mailto:gustavo.vazquez@imss.gob.mx)  
Teléfono: 5516450142



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL  
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



**Dictamen de Autorizado**

Comité Local de Investigación en Salud **3602** con número de registro **17 CI 09 015 057** ante COFEPRIS y número de registro ante CONBIOÉTICA CONBIOÉTICA **09 CEI 022 2017082**  
HOSPITAL DE ONCOLOGIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

FECHA Jueves, 19 de julio de 2018.

**M.E. MARIA FATIMA CHILACA ROSAS**  
**PRESENTE**

Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título:

**Asociación predictiva de la mutación H3F3A K27M con progresión tumoral posterior al tratamiento de Radioterapia en Pacientes Pediátricos y Jóvenes Adultos con Diagnóstico de Glioma de Tallo**

que sometió a consideración para evaluación de este Comité Local de Investigación en Salud, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A U T O R I Z A D O**, con el número de registro institucional:

No. de Registro  
R-2018-3602-016

ATENTAMENTE

  
**DR. PEDRO MARIO ESCUDERO DE LOS RÍOS**  
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3602

**IMSS**

SECRETARÍA DE SALUD

## Solicitud de Enmienda

FECHA: Viernes, 12 de julio de 2019

**Estimado Sinuhé Barroso Bravo**

**Presidente Comité Local de Investigación y Ética en Investigación No. 3602**

**P R E S E N T E**

Por medio del presente solicito de la manera más atenta, se sirva realizar la enmienda el protocolo de investigación con título: "Asociación predictiva de la mutación H3F3A K27M con progresión tumoral posterior al tratamiento de Radioterapia en Pacientes Pediátricos y Jóvenes Adultos con Diagnóstico de Glioma de Tallo" que se registró a través del STREI CIS ante éste Comité Local de Investigación en Salud.

En los puntos que a continuación se exponen:

Cambio metodológico
<b>Cambios solicitados:</b>  Carta de consentimiento informado  Cronograma de actividades  Instrumentos de recolección  Protocolo
<b>Justificación:</b>  Se decide agregar en los criterios de inclusión que se seleccionaran pacientes con gliomas de línea media y no sólo de tallo; además se incrementa el periodo de valoración por el proyecto 2012 - 2018. Por lo previamente comentado, es consecuente el cambio de título, por lo cual se solicita por medio de esta misma enmienda, como fue recomendado por el secretario del CLTES, Dr. Gutierrez.

Atentamente



**Dr(a). MARIA FATIMA CHILACA ROSAS**

investigador principal del Protocolo



GOBIERNO DE  
**MÉXICO**



Dirección de Prestaciones Médicas  
Unidad Médica de Alta Especialidad  
Hospital de Oncología del CMN "Siglo XXI"  
Dirección General  
Dirección Médica

Of. No. 371201.200200/DM/381/2019

Ciudad de México, 29 de Noviembre de 2019

Dra. Teresa Imelda Teresa Fortoul van der Goes  
Coordinadora del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas,  
Odontológicas y de la Salud

Por medio de la presente le informo que la Médico Especialista María Fátima Chilaca Rosas, alumna del programa que Usted dignamente coordina, es la Investigadora Responsable del proyecto "Progresión tumoral y estado funcional posterior a radioterapia en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con gliomas de línea media con la mutación H3F3A K27M", autorizado (R-2018-3602-016) por el Comité Local de Investigación (17 CI 09 015 057, COFEPRIS) y por el Comité Local de Ética en Investigación (09 CEI 022 2017082, CONBIOÉTICA) de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Oncología.

Sin otro particular, reciba un cordial saludo.

Atentamente,

M.E. Sinuhé Barroso Bravo  
Presidente del Comité Local de Investigación

SBB/cme

## ÍNDICE

1. Abreviaturas	1
2. Hoja de datos de tesis	2
3. Resumen	3
4. Introducción	5
5. Marco teórico	5
6. Justificación	18
7. Planteamiento del problema (pregunta de investigación)	19
8. Objetivo general y objetivos específicos	20
9. Hipótesis	20
10. Metodología y diseño de estudio	21
• Universo del estudio	
• Población, criterios de inclusión y exclusión	
• Tamaño de muestra y muestreo	
• Desarrollo del estudio: técnicas y procedimientos	
11. Resultados	33
12. Discusión	43
13. Conclusiones	47
14. Referencias	48
15. Anexos	52



<b>1.Abreviaturas, siglas y acrónimos</b>	
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CL	Control local tumoral
CBTRUS	Central Brain Tumor Registry of The United States.
EGFR	Receptor del factor de crecimiento epidérmico
Gy	Gray, dosis de radiación ionizante absorbida en un volumen de materia.
IHQ	Inmunohistoquímica.
IRM	Imagen por Resonancia Magnética
MGMT	Metilguanidina metiltransferasa
OR	Razón de Momios.
PCR	Polymerase Chain reaction
PET	Positron emission tomography
PGFR	Receptor del factor de crecimiento plaquetario.
QT	Quimioterapia
RT	Radioterapia
RTG	Resección tumoral gruesa o resección tumoral máxima
RTOG	Radiation Therapy Oncology Group
SLP	Sobrevida libre de progresión
SG	Sobrevida global.
SNC	Sistema nervioso central
TC	Tomografía computada
VPP	Valor predictivo positivo
VPN	Valor predictivo negativo

## 2. Hoja de datos de tesis

<b>Datos del alumno (Autor)</b>	
Apellido paterno:	Chilaca
Apellido materno:	Rosas
Nombre(s):	María Fátima
Teléfono:	5530360577
Universidad:	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad o Escuela:	Facultad de Medicina
Maestría:	Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud
No. De cuenta:	509012089
<b>Datos de asesor</b>	
Apellido paterno:	Piña
Apellido materno:	Sánchez
Nombre (s):	Patricia
<b>Datos de la Tesis</b>	
Título:	Progresión tumoral y estado funcional posterior a radioterapia en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con gliomas de línea media con la mutación H3F3A K27M.
No. De páginas:	62
Año:	2019
Número de Registro:	F-2018-3602-16

### 3. Resumen

**Título:** Progresión tumoral y estado funcional posterior a radioterapia en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con gliomas de línea media con la mutación H3F3A K27M.

**Marco teórico:** Los gliomas son los tumores del sistema nervioso central más frecuentes en los pacientes pediátricos y adultos jóvenes. En recientes años se han enfocado múltiples esfuerzos en el estudio de los gliomas con localización de línea media, debido a que los pacientes que presentan dicha neoplasia tienen una mediana de sobrevida de 12 meses. Las principales alteraciones biológicas moleculares encontradas han sido las relacionadas con la mutación del gen que codifica a la histona 3 y su asociación como factor pronóstico de muerte; sin embargo, su valor predictivo con los manejos oncológicos aún se encuentra por definirse.

**Objetivo:** Identificar y comparar la diferencia en progresión tumoral, período libre de progresión, estado funcional; posterior al tratamiento de radioterapia de acuerdo con la expresión proteica H3F3A K27M por la mutación del gen H3-3A de pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de la línea media.

**Materiales y Métodos:** El presente estudio retrospectivo, valoró el tejido tumoral de pacientes con diagnóstico de glioma de línea media, tratados en el periodo 2012-2018 en el servicio de radioterapia del Hospital de Oncología de Centro Médico Siglo XXI. La extracción y amplificación del ADN se identificó la presencia de la mutación H3F3A K27M por secuenciación Sanger, la expresión de la proteína mutante por inmunohistoquímica con un anticuerpo específico, así como la asociación con desenlaces clínicos como estado funcional y sobrevida libre de progresión.

**Resultados:** Se encontró registro de 109 pacientes pediátricos y jóvenes adultos en el rango de edad 1-39 años con diagnóstico de glioma de línea media en el periodo 2012 al 2018. Sin embargo, solo 32 pacientes cumplieron con los criterios de inclusión para el análisis del estudio y 77 pacientes fueron excluidos por falta de tejido de biopsia.

El 46.9% (15) de los pacientes analizados para este estudio, se informó que residían en el área metropolitana y presentaban una mediana de edad de 10 años con predominio del sexo femenino, siendo la mayoría de los pacientes pertenecientes al grupo pediátrico en el 71.9 % (23). La presentación clínica inicial fue de mal estado funcional  $KNF \leq 70$  por el déficit neurológico de tipo motor 93.75% de los casos. En el 71.9 % pacientes fueron tratados con radioterapia y quimioterapia.

La presencia de la expresión de la proteína H3F3A K27M en pacientes pediátricos y jóvenes adultos fue 26.1% y 33.3%, respectivamente. En el 66.6% de los pacientes que presentaron la mutación no se modificó el estado funcional de  $KNF \leq 70$ , y los pacientes sin la mutación el 86.9% mejoraron el estado funcional. En los pacientes que presentaron la mutación se encontró una mediana de SLP de 1 mes y sin la mutación 4.5 meses. La dosis y modalidad de radioterapia no modificó la SLP de los pacientes que presentaron la mutación en el tejido tumoral. La presencia de la mutación H3F3A K27M confirió progresión en el 100% en comparación de 52.2% a los que no presentaron la mutación.

**Conclusiones:** El estado funcional fue relevante, debido a que la mayoría de los pacientes inicialmente se encontraron con cuadros clínicos avanzados; y la presencia de la mutación se asoció a un peor estado funcional después del manejo de radioterapia. La SLP al manejo con radioterapia se encontró modificada solo en la población adultos jóvenes con la presencia de la mutación, y fue independiente de la dosis de radiación.

#### **4. Introducción**

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan la primera causa de incidencia de tumores sólidos en el paciente pediátrico (1), y la tercera causa de incidencia de tumores sólidos en los jóvenes adultos, comprendiendo el término de jóvenes adultos a los pacientes de 18-39 años (2, 3). Los gliomas son los tumores de SNC con mayor frecuencia, en pacientes pediátricos y jóvenes adultos; en el 42.3% y 33% respectivamente. En México, la prevalencia de los tumores de SNC ocupa aproximadamente el 12% de causa de cáncer en la población, siendo los astrocitomas los gliomas más frecuentes (4, 5).

Los gliomas son tumores que se originan en las células de la glía, conformados de astrocitos y oligodendrocitos. Los astrocitomas son el subgrupo de tumores más frecuentes de los gliomas presentándose hasta en un 40- 50% (6). En la mayoría de los gliomas del subgrupo de tumores astrocíticos, aún es reducida la información de los factores asociados a la carcinogénesis como: la exposición a la radiación ionizante y síndromes genéticos. A la fecha se han identificado características histológicas asociadas a las alteraciones moleculares y clínicas con impacto pronóstico en el control tumoral, sobrevida libre de progresión y sobrevida global (7).

#### **5. Marco teórico**

Las características clínicas de los tumores de localización de la línea media se encuentran relacionadas por el efecto de masa a estructuras circundantes y su extensión, ocasionando: alteración del origen real de los nervios craneales, síndrome de fosa posterior, alteraciones motoras/ sensitivas por involucro del tracto longitudinal e inclusive datos de hipertensión intracraneal (8).

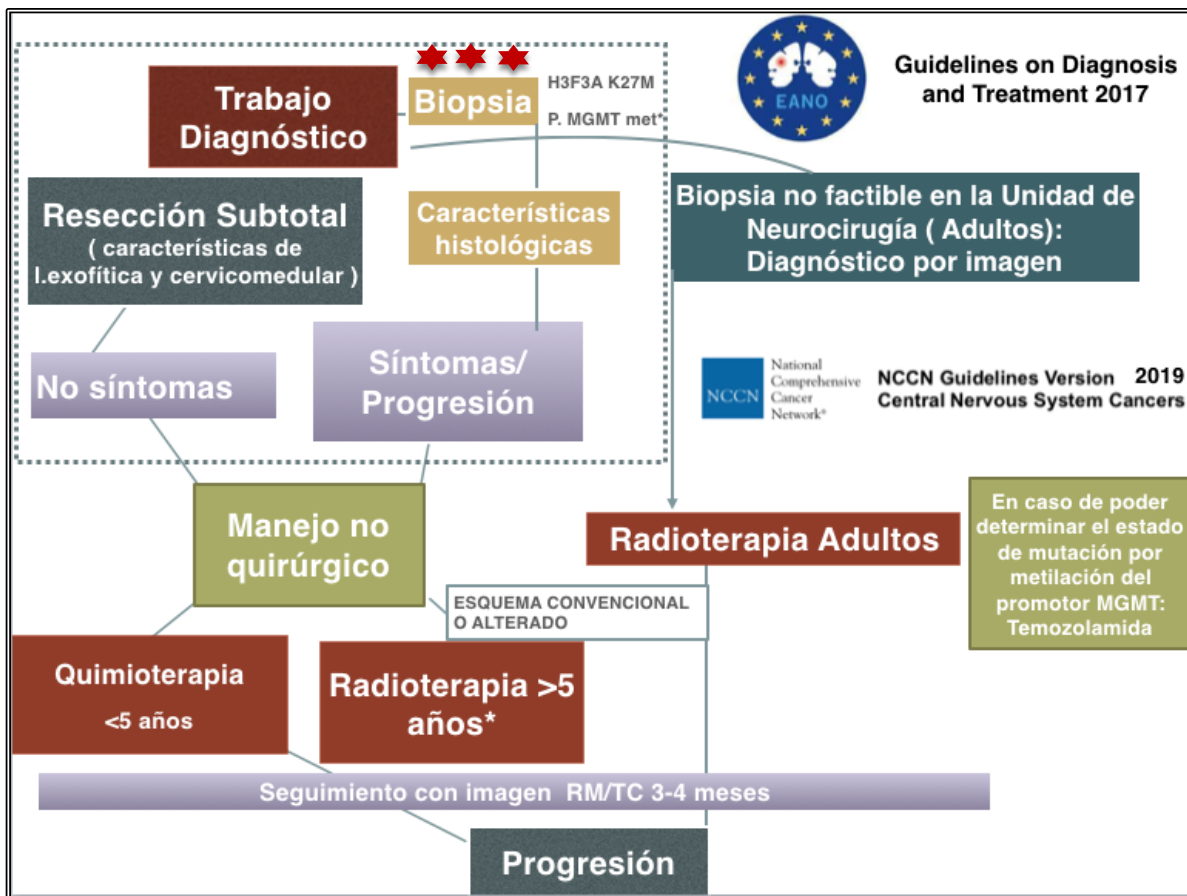
## Diagnóstico clínico

Una adecuada historia clínica con exploración neurológica extensa es importante para tener sospecha de lesiones neoplásicas de la línea media, y sirven para la justificación de solicitud de estudios paraclínicos complementarios. Inicialmente es recomendado por guías de práctica clínica nacionales, institucionales (IMSS) e internacionales, la tomografía computarizada de cráneo para valorar lesiones que puedan estar condicionando los datos clínicos de hipertensión intracraneal (9). Posteriormente, el estudio recomendado para la certeza diagnóstica es la resonancia magnética con gadolinio como contraste.

En caso de la disponibilidad del recurso de la resonancia magnética multiparamétrica (ponderaciones funcionales como perfusión, difusión y bioquímica como la espectroscopia), será el estudio de elección para una adecuada valoración diagnóstica, caracterización morfológica y funcional de la lesión tumoral como la evaluación del crecimiento o progresión (10).

La información recopilada por estudios paraclínicos será útil para el diagnóstico y planeación del tratamiento oncológico de cirugía y radioterapia, como para el seguimiento posterior al manejo oncológico, con intervalos de 3-4 meses hasta por 3-5 años(11), como se muestra en la figura 1, siendo relevante destacar que en la mayoría de las instituciones en nuestro país, no se realizan las evaluaciones con resonancia multiparamétricas por falta de infraestructura y recursos humanos capacitado.

Y con lo previamente mencionado una vez realizada la planeación de toma de biopsia o resección quirúrgica máxima posible segura, se realiza el análisis del tejido tumoral histológico, inmunohistoquímica para valoración de expresión que darán características de subtipo de neoplasia y datos de comportamiento biológico.



**Figura 1. Diagnóstico y tratamiento en tumores gliales:** En la primera parte superior la guía de abordaje o trabajo diagnóstico en tumores gliales de línea media en pacientes pediátricos y jóvenes adultos (marcado por línea discontinua); y en la figura restante se señalan las principales recomendaciones de las guías internacionales europeas y americanas para el manejo en este grupo de pacientes con dicho diagnóstico ya confirmado. Abreviaturas= EANO: European Association of Neuro-oncology(12), NCCN: National Comprehensive Cancer Network, MGMT met: mutación por metilación del promotor del gen de metilguanidina(13). Los tres asteriscos rojos muestran que la determinación de la mutación H3F3A K27M en nuestra institución (IMSS), no se realiza de forma rutinaria como parte del diagnóstico molecular.

## Clasificación histológica

En 2007, la OMS estableció una clasificación mediante las características histológicas como la atipia nuclear, actividad mitótica, proliferación endotelial y necrosis; agrupando a los tumores en 4 grupos I-IV, dentro de los cuales los tumores de la categoría I y II pertenecían a tumores de comportamiento menos agresivo o de bajo grado y los tumores pertenecientes a la categoría III y IV dentro de los cuales encontramos a los denominados astrocitoma anaplásico (con o sin componente oligodendrogial) y glioblastoma multiforme, siendo estos últimos de comportamiento agresivo o alto grado con peor pronóstico(6).

En 2016 la OMS ante la evidencia de diferentes biomarcadores pronósticos, generó una nueva clasificación de los tumores de sistema nervioso central con importantes modificaciones para el grupo de tumores tipo gliomas y tumores astrocíticos(1), de acuerdo a características: moleculares, cromosómicas y mutaciones génicas con impacto en la sobrevida global como se muestra en la tabla 1.

La mutación del gen IDH1 que codifica a la expresión de la proteína mutada de la enzima isocitrato-deshidrogenasa 1, genera el aumento de la función enzimática por la pérdida de afinidad por el isocitrato y aumento significativos en la afinidad por  $\alpha$ -cetoglutarato y NADPH (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato), contribuyendo a la gliomatosis(14). Inicialmente la mutación fue identificada en tumores de sistema nervioso central del subtipo de astrocitomas de bajo grado que no son de localización de línea media, y se encontró que en jóvenes adultos su presencia fue un factor de buen pronóstico para la SLP (6.3 vs 3 años) y posteriormente como un valor predictivo para el tratamiento multimodal [1], (15). Sin embargo, existen limitaciones en países en desarrollo como el nuestro, que, por falta de infraestructura para la toma de biopsia estereotáxica, y la limitación en el diagnóstico de los pacientes por imagen de resonancia multiparamétrica, limitando el diagnóstico preciso (Figura 1).

Además, la presencia de la mutación del gen que codifica para la histona 3, y la expresión de la proteína mutada H3K27M en gliomas de localización de línea media (tálamo, hipotálamo, tallo, mesencéfalo, médula oblonga, médula espinal), siendo un marcador diagnóstico en este grupo de pacientes y les confiere un peor pronóstico de sobrevida global a diferencia de los pacientes que no presentan la mutación.

En relación con la evaluación de la expresión de la proteína mutada H3F3 K27M, ésta puede ser determinada por IHQ debido a que se han realizado estudios en el que se ha validado que dicha técnica tiene un VPP como VPN del 100%, confirmada por la detección de la mutación del gen H3- 3A mediante secuenciación, presenta un VPP del 100%, tabla 2 (16). En la actualidad, en nuestro medio se continúa



usando la previa clasificación de 2007 por falta de recursos materiales como previamente comentado.

<b>Tabla 1. TUMORES ASTROCITICOS DIFUSOS Y OLIGODENDROGLIALES</b>	
Astrocitoma Difuso, IDH mut	Grado II
Oligodendroglioma IDH mut y 1p-19q del	Grado II
Astrocitoma Anaplásico, IDH mut	Grado III
Oligodendroglioma Anaplásico, IDH mut y 1p-19q del	Grado III
Glioblastoma, IDH mut	Grado IV
Glioblastoma, IDH Silvestre	Grado IV
Glioma Difuso de línea media H3K27M mutante (Pediátrico)	Grado IV
<b>OTROS TUMORES ASTROCITICOS</b>	
Astrocitoma pilocítico	Grado I
Astrocitoma de células gigantes subependimarias	Grado I
Xantastrocitoma Pleomórfico	Grado II
Xantastrocitoma Pleomórfico Anaplásico	Grado III

Abreviaturas: IDH= Isocitrato deshidrogenasa y mut= mutado.

Recientemente se han encontrado semejanzas en la sobrevida global en pacientes pediátricos y jóvenes adultos con la presencia de la mutación H3F3A K27M, reportándose una ocurrencia del 54% y un HR:3.6 de riesgo de mortalidad estableciéndose en el metaanálisis (17), por lo que ha cobrado mayor importancia el estudio de los pacientes por el pronóstico sombrío.

**Tabla2 Impacto en la sobrevida de los tumores gliales con la presencia de la mutación H3 K27M en población pediátrica y adulta:**

<b>Autor (Estudios en pacientes pediátricos)</b>	<b>Tipo de Estudio</b>	<b>N</b>	<b>Método de detección</b>	<b>Resultados de gen H3.3 mutado vs H3.3 gen no mutado (años)</b>
Khuong – Quang 2012 (18)	Cohorte	42	Secuenciación por Sanger	-HR:4.27 IC95(1.26-14.47) -OS=0.73+/- 0.48 vs 4.59+/-5.5
Venneti 2014 (16)	Cohorte	241 203(P) 38 (A)	Secuenciación por Sanger con validación de IHQ con VPP 100%	-HR:3.5 IC95(1.17-10.5)
Buczkwicz 2014 (19)	Cohorte	66	Secuenciación por Sanger	-HR:2.7 IC95(1.35-5.7) -OS=0.63+/- 1.77 vs 1.84+/-1.77
Castel 2015 (20)	Cohorte	89	Secuenciación por Sanger	-HR:5.1 IC95(1.95-6.89) -Mediana de Sobrevida=9.2 meses
Korshunov 2015 (21)	Cohorte	162	Secuenciación por Sanger	-HR:2.84 IC95(1.38-5.87) -OS=1.04+/- 0.4 vs 2.22+/-1.46
Karreman 2018 (22)	Cohorte	77	Secuenciación por Sanger /IHQ	-OS=0.87+/- 0.25 vs 4.54+/-0.82

Autor (Estudios de pacientes adultos jóvenes)	Tipo de Estudio	N	Método de detección	Resultados de gen H3.3 mutado vs H3.3 gen no mutado (meses)
Meyronet 2017 (23)	Cohorte	21	Sistema Múltiple para reconocimiento de polimorfismo o mutaciones de un sólo nucleótido	-Mediana de Sobrevida = 17 meses para la mutación vs 19.6 para el gen silvestre.
Kleinschmidt-DeMasters(24)	Cohorte	28 15(P) 13(A)	IHQ	-OS=9.3

Abreviaturas: N= número de sujetos estudiados, P= sujetos pediátricos, A= sujetos adultos, Vs= contra, IC= intervalo de confianza, HR= hazard ratio, IHQ=Inmunohistoquímica, OS= sobrevida global.

## Estado Funcional en el paciente oncológico

El estado funcional identifica las habilidades del paciente para poder realizar sus actividades cotidianas. La escala de Karnofsky que es un constructo para la evaluación del estado funcional del paciente oncológico, originada en 1948 para la evaluación clínica de los pacientes oncológicos y su seguimiento posterior al manejo con quimioterapia en el contexto paliativo(25).

La escala de Karnofsky se ha valorado como factor pronóstico en neuro-oncología, debido a que implica la evaluación del estado de conciencia y funciones neurológicas que permiten realizar las actividades cotidianas de los pacientes. Sin embargo, recientemente en neuro oncología se ha tratado de utilizar otros parámetros que permitan evaluar la respuesta a los tratamientos con integración de imágenes radiológicas como se ha descrito en los criterios RANO (Response Assessment in Neuro-Oncology/ Asesoramiento de la respuesta neuro-oncológica).

En los dos últimos años surgió la escala NANO (Neurologic Assessment in Neuro-Oncology/ Asesoramiento neurológico en neuro-oncología) con el objetivo complementario de valorar los diferentes dominios como: la marcha, fuerza, ataxia, sensibilidad, campos visuales, lenguaje, nivel de conciencia y conducta (ver anexo 2), encontrándose un puntaje alto como factor de mal pronóstico para la sobrevida global principalmente en la patología de glioblastoma (26), aún en México no ha sido validada.

## **Tratamiento Multimodal**

El tratamiento estándar para los gliomas de línea media en jóvenes adultos y en pacientes pediátricos mayores de 5 años, es la resección segura en lesiones exofíticas y es la piedra angular de tratamiento. Las lesiones que presenten características histológicas de alto grado resecables deberán recibir manejo con radioterapia adyuvante, y en caso de presentar algún criterio de irresecabilidad inicial (localización, extensión difusa, experiencia médica quirúrgica y limitación de recursos institucional), con diagnóstico por imagen únicamente y/o biopsia estereotáxica, estará indicado la radioterapia como manejo definitivo(27).

El uso de terapia blanco como vemurafenib que se ha planteado en ensayos clínicos, en subtipos de gliomas como el xantastrocitoma pleomorfo(28), en casos que presenten evidencia de alteraciones moleculares, adecuadamente determinadas como la mutación BRAF V600 y manejo consecuente con su inhibidor específico (29), mismos que no se encuentran disponibles de forma institucional.

## **Radioterapia en gliomas de línea media**

En el caso de pacientes mayores de 3 años de edad con características de alto grado con patrón difuso o sin posibilidad de manejo quirúrgico, está indicado el manejo de radioterapia definitiva, con una dosis total de 54-55.8 Gy con fraccionamiento convencional (1.8- 2Gy), logrando un control local en el 70-80% de los pacientes en 6-24 meses, y por consecuencia mejoría en el estado funcional a la respuesta de la radioterapia, con el objetivo de mejoría de la calidad de vida (beneficio en alteración neurológica); pero siempre con consideración de toxicidad temprana ( edema), que se verá relacionado con la localización tumoral, dosis total, volumen tumoral y terapias asociadas. Y la toxicidad tardía por la radioterapia se deberá valorar, mediante las alteraciones neurocognitivas, neuroendocrinas y vasculopatías a partir de 18 meses (30-32)

Los factores predictivos que se han involucrado en los gliomas es la dependencia de la dosis de radioterapia en relación con el control local y consecuentemente SLP; siendo el rango adecuado de dosis de 54-57Gy. Sin embargo, dosis mayores solo se ha demostrado que confieren toxicidad grave, sin beneficio de control tumoral, como se demostró con escalamiento de dosis en esquemas alterados tipo hiperfraccionamiento(33).

El fraccionamiento alterado del tipo hipo fraccionamiento (tamaño de fracción de radioterapia mayor a 2Gy), ha demostrado no ser inferior en términos de CL y SG en pacientes con gliomas de tallo y otros gliomas de línea media. En la comparación de radioterapia con esquemas hipofraccionados con el esquema convencional, ha mostrado una tendencia de mejoría rápida del estado funcional por mejoría de síntomas y signos neurológicos en algunos pacientes, pero sin clasificación previa molecular (27, 34).

Recientemente se ha propuesto la presencia de la mutación del gen *H3.3*, específicamente la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M como un factor de radioresistencia por modificación del microambiente tumoral (20). Algunos autores han propuesto que la radioresistencia de los sujetos que presentan la mutación H3F3A K27M es por la modificación del microambiente tumoral y la alteración en la expresión de los antígenos del complejo de inmunohistocompatibilidad de las células neoplásicas de glioma irradiada, mediada por la inmunoreactividad de linfocitos CD8 y ausencia de linfocitos infiltrantes de tumores (respuesta celular), lo que es conocido inmunológicamente fríos “immune cold”

En relación a lo mencionado, la radioterapia genera un aumento en la expresión de los antígenos de clase I del complejo de inmunohistocompatibilidad de las células neoplásicas de glioma irradiadas, con modificación del microambiente tumoral facilitando la respuesta celular inmunológica y rechazo tumoral con posible implicación por el tipo de esquema de radioterapia(35).

### **Quimioterapia en el manejo de gliomas**

Aún es controversial el papel de la quimioterapia adyuvante, en pacientes pediátricos mayores de 3 años, debido a que se ha relacionado que la aplicación de la misma, no mejora el pronóstico en términos de SLE; y solo presenta beneficio en la estabilidad de la enfermedad, pero sin beneficio en sobrevida global, como se ha valorado en numerosos estudios y en reportes del grupo pediátrico de cáncer con el esquema a base de lomustina, vincristina y prednisona(36).

En estudios de adultos jóvenes en los que se reportan la presencia de la metilación del promotor del gen que codifica para metilguanidina metiltransferasa que favorece la radiosensibilización por el agente alquilante de temozolamida, demostró un beneficio al manejo con radioterapia concomitante con impacto en SLE y SG como demostrado en el estudio de Stupp y colaboradores. (37).

Y recientemente las guías americanas y europeas en adultos han recomendado que ante la imposibilidad de la determinación de la presencia de la metilación del promotor del gen de MGMT en pacientes con diagnóstico de gliomas con mal estado funcional se deberá evitar manejo con temozolamida, pero si ofrecer al menos manejo paliativo con radioterapia hipofraccionada. Sin embargo, existe evidencia controversial en el paciente pediátrico, con el manejo de temozolamida concomitante con radioterapia, por estudios en los cuales los pacientes pediátricos no han presentado beneficio en términos de SLE o SG(38).

Los pacientes menores de 3 años posterior al tratamiento quirúrgico o biopsia con características histológicas e IHQ de bajo grado, la radioterapia se reservará sólo en casos de progresión de la enfermedad, debido a la morbilidad tardía que puede conferir la radioterapia en edades tempranas. En caso de postergar la radioterapia, se deberá realizar manejo con quimioterapia con esquemas basados en lomustina, vincristina, prednisona, ifosfamida, carboplatino y etopósido(39), pero hasta el momento no existe un esquema de quimioterapia que haya demostrado beneficio clínico significativo en SG como en gliomas con características de alto grado como el estudio de Stupp en Adultos(40).

En nuestro servicio de radioterapia se encontraron resultados inferiores a los reportados en la literatura mundial en sobrevida libre de progresión de 20.5% y sobrevida global de 64.5% en 6 meses en pacientes pediátricos manejados con radioterapia fraccionamiento convencional y quimioterapia con diagnóstico de glioma difuso de tallo (41), lo que genera múltiples preguntas relacionada a la posible implicación de la alteración en la histona 3.

### **Alteraciones moleculares y funcional de H3-3A con impacto en el pronóstico de sobrevida y progresión tumoral.**

Recientemente, se han evidenciado diferentes mutaciones con afcción en mecanismos epigenéticos (42), principalmente en genes codificantes a proteínas de histonas. La mutación en el gen *H3.3A* y la consecuente expresión de la proteína mutada H3F3A K27M (sustitución del aminoácido de lisina por metionina en la posición 27) se ha encontrado en gliomas principalmente de línea media, la cual su presencia se asocia con un riesgo de muerte hasta 3.5 veces, encontrándose en algunos reportes de literatura con una mediana de sobrevida menor a 18 meses en la población pediátrica secundaria a la progresión tumoral (ver figura 2A,2B y 3).(43, 44).

## **Controversias en la presencia de la mutación H3F3A K27M**

El papel de la proteína mutada H3F3A K27M, aunque ha sido extensamente valorado, aún existen incógnitas por resolver. En algunos casos de pacientes adultos con la mutación H3F3A K27M de lesiones tumorales de línea media, a pesar de las características histológicas de bajo grado los pacientes han presentado en 10-15 años recurrencias tardías y fulminantes(43); en otros casos la presencia de la mutación H3F3A K27M también se ha evidenciado en tumores con características histológicas de gangliogliomas; por lo cual su completa comprensión, aún está por definirse en los tumores gliales/ astrocíticos de pacientes pediátricos como en adultos (24).

## **Implicación de la mutación en la función celular**

En el estudio de la mutación en el gen que codifica para la histona 3.3, se ha encontrado que la producción de la proteína mutante (H3F3A K27M) genera la reducción de la proteína silvestre, afectando el patrón de metilación *trans* y consecuentemente el complejo de control epigenético regulador del empaquetamiento del ADN, llamado complejo represor policomb 2, PCR2 (45), facilitando a los factores de transcripción de genes relacionados al crecimiento, progresión y sobrevida tumoral, como: EGFR y VEGFR.

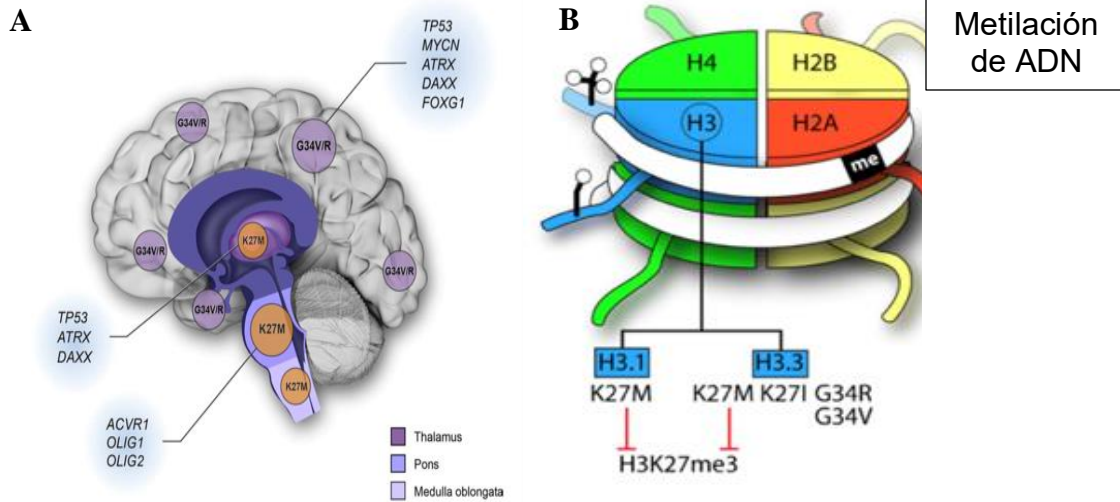


Figura 2A. Se observa en la imagen las diferentes alteraciones moleculares de la lesiones neoplasicas de la localización de línea media y de estructuras cerebrales, imagen tomada del trabajo de Lulla con colaboradores y modificada con el propósito de esquematizar la distribución ya referida(46). 2B: se observa la estructura de la proteína histona 3 y su conformación de patrón de metilación.

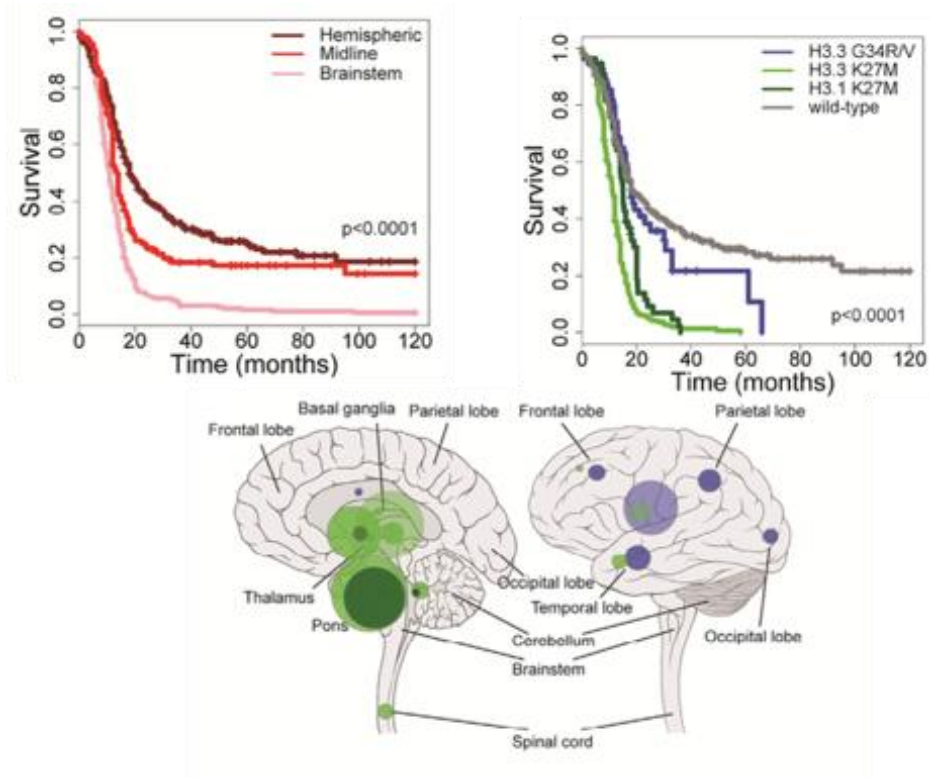


Figura 3 Se observa las diferentes distribuciones de la localización de diferentes estructuras cerebrales y asociadas con las mutaciones de la histona 3 y el ensombrecimiento de la sobrevivida global(42).



## **Avances en el entendimiento de la patogenia del glioma difuso de línea media.**

En la actualidad, se han realizado varios esfuerzos en la investigación conjunta de los pacientes pediátricos y jóvenes adultos, con hallazgos de alteraciones moleculares en gliomas de la línea media de mutaciones en genes que codifican para las histonas 1 y 3, siendo esta última la que se ha encontrado mayor afección en la patogénesis y progresión.

La presencia de la proteína mutante H3F3A K27M en los tumores de línea media se ha asociado con un compartimento biológico agresivo de progresión que incrementa el riesgo de muerte; relacionado dicho comportamiento a la alteración de mecanismos epigenéticos, inmunológicos e incremento de activación de vías de señalización de crecimiento y supervivencia (35); condicionando microambientes tumorales que pudiesen ser favorecedores a la radioresistencia (47).

## 6. Justificación

Los pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media presentan un pobre pronóstico por una mediana de supervivencia de 12 meses. En la última década se han identificado factores pronósticos de sobrevida, siendo la presencia de la mutación del gen que codifica a la histona 3 el factor pronóstico molecular más relevante en la fisiopatología de esta neoplasia. La mutación en el gen *H3-3*, codifica una proteína mutante H3F3A K27M, generando cambio en su patrón de metilación. La presencia de la proteína mutante H3F3A K27M se ha encontrado en una proporción 40-80% de los pacientes reportados en la literatura con diagnóstico de glioma de línea media, frecuentemente en el subsitio de tallo cerebral (17).

A pesar de los esfuerzos a nivel mundial, el tratamiento paliativo con radioterapia ha sido el único manejo con beneficio en esta neoplasia. La radioterapia se ha evaluado con esquemas convencionales y alterados, ambos con beneficio semejante en término de control tumoral con fines paliativos, pero con las limitantes que en la evaluación de los principales ensayos clínicos no se contaba con un perfil de biomarcadores como la expresión de la proteína mutante H3F3A K27M y su asociación con desenlaces clínicos u oncológicos, que pudiesen afectar la conducta terapéutica (27). En la literatura solamente se ha enfocado la evaluación de la presencia de la proteína mutante H3F3A K27M y su efecto en términos de sobrevida global y respuesta tumoral como se observa en los trabajos de Castel et al 2015 (20), pero no se ha estudiado el efecto en la clínica como el estado funcional basal y la modificación posterior al tratamiento de radioterapia.

En relación con lo mencionado, el presente estudio evalúo la diferencia de la respuesta al tratamiento de radioterapia por la presencia de la proteína mutante H3F3A K27M en términos de período libre de progresión tumoral y el estado funcional; con la finalidad que dicha información, apoye el diseño de estudios prospectivos en un futuro próximo y que permitan evaluar cambios en la conducta terapéutica de radioterapia para su rápido otorgamiento y beneficio clínico.

## **7.Planteamiento del problema**

Por lo previamente comentado y con los hallazgos en los últimos años respecto a la expresión de la proteína mutante H3F3A K27M como factor pronóstico de sobrevida global, surgió el interés de valorar si la presencia de la proteína mutante H3F3A K27M se relaciona con la respuesta a radioterapia, evaluada mediante la progresión, SLP, y en los desenlaces clínicos como la modificación del estado funcional de los pacientes en nuestra población de pacientes pediátricos y jóvenes adultos, por lo que nos cuestionamos:

### **Pregunta de investigación:**

¿Cuál es la diferencia en progresión, el período libre de progresión tumoral y el estado funcional después del tratamiento de radioterapia entre quienes tienen o no la expresión proteica H3F3AK27M por la mutación del gen *H3-3* de pacientes pediátricos como jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de la línea media?

### **8.Objetivo general:**

Identificar y comparar la diferencia en progresión tumoral, período libre de progresión, estado funcional; posterior al tratamiento de radioterapia de acuerdo con la expresión proteica H3F3AK27M por la mutación del gen *H3-3* de pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de la línea media.

### **Objetivos específicos:**

1. Describir las características clínicas y lugar de residencia de los pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media, así como características del manejo oncológico.

2. Determinar la presencia y frecuencia de la mutación del gen *H3.3* que producirá la proteína mutada H3F3A K27M, mediante la amplificación por PCR y posterior secuenciación de tejido tumoral, en pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media tratados con radioterapia.
3. Determinar la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M mediante la técnica de inmunohistoquímica y frecuencia, en las muestras de tejido tumoral embebido en parafina, en pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media tratados con radioterapia.
4. Determinar y comparar el desenlace oncológico de progresión, período libre de progresión tumoral mediante la evaluación de respuesta a radioterapia por imágenes de resonancia magnética funcional, posterior al tratamiento de radioterapia, en pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media tratados con radioterapia, por presencia de la mutación H3F3A K27M.
5. Identificar y comparar la evaluación clínica de estado funcional por escala de Karnofsky basal y después del tratamiento de radioterapia de los pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media de los pacientes tratados con radioterapia, por presencia de la mutación H3F3A K27M.

## **9. Hipótesis de trabajo**

Los pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media que presenten la expresión proteica H3F3A K27M tendrán al menos un 30% de mayor progresión tumoral (20), consecuentemente menor supervivencia libre de progresión con mayor deterioro del estado funcional medido por la escala de Karnofsky, en comparación a quienes no tienen la expresión proteica H3F3A K27M.

## **9. Material y métodos**

### **Diseño**

El estudio realizado fue observacional longitudinal retrospectivo comparativo para valorar la asociación de la mutación H3F3A K27M con la progresión tumoral después del tratamiento a radioterapia mediante el período libre progresión y estado funcional. Estableciendo el tiempo cero posterior a la última sesión de radioterapia.

### **Universo de trabajo para población diana:**

Se valoró a todos los pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de gliomas de línea media de la unidad médica del servicio de radioterapia del hospital de oncología de Centro Médico Nacional siglo XXI. Avenida Cuauhtémoc 330, Doctores, 06720 Ciudad de México, CDMX.

**Período:** 01 de enero 2012 a diciembre 2018.

**Fuente de información:** Expedientes clínicos, radiológicos y de patología de los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión que a continuación se comentan:

### **Criterios de inclusión:**

1. Se incluyo a todos los pacientes con edad de 1- 39 años con diagnóstico de glioma de línea media reportado por el Servicio de Patología Institucional, basados en los criterios diagnósticos histológicos de la OMS 2007; y tratados en el servicio de Radioterapia del hospital de Oncología de centro Médico siglo XXI, ciudad de México.
2. Se incluyeron los bloques de tejido embebido en parafina correspondientes a los pacientes que cumplan el previo criterio comentado, y que contaron con una muestra biológica de tejido parafinado con al menos 70% de tejido tumoral, evaluado por patólogos oncólogos.

**Criterios de exclusión:**

Pacientes con concurrencia o antecedentes de diagnóstico de cáncer previos 5 años (excepto lesiones benignas o en tumores en relación con síndromes genéticos como neurofibromatosis 1/ 2, Síndrome de Esclerosis Tuberosa y Síndrome de Turcot).

**Criterios de eliminación:**

Pacientes en los que la muestra de ADN obtenida del tejido tumoral de los bloques de parafina sea inferior a los mínimos necesarios (30 ng con 1.7 de pureza en la relación 260 / 280) para la amplificación por PCR y/o para la determinación de la proteína mutada por inmunohistoquímica.

**Tamaño de muestra (muestra prevista)**

En relación con el principal objetivo del estudio de comparación de los desenlaces oncológicos ( progresión, SLP) entre pacientes que presenten la mutación H3F3A K27M de los que no la presentan, en pacientes pediátricos y adultos jóvenes con gliomas de línea media, y en relación al único estudio que valoró la respuesta a la radioterapia fue el realizado por Castel et al 2015, encontrando de los pacientes con la presencia de la mutación H3F3A K27M respuesta a radioterapia en el 55%, y sin embargo con mayor respuesta a la radioterapia hasta en el 85% de los pacientes que no presentaron la mutación, es decir 45% y 15% progresión, respectivamente.

Por lo previamente comentado, los pacientes con la mutación H3F3A K27M tendrán una probabilidad proporcional de mayor progresión de al menos 30%; retomado esta información con el propósito para el cálculo de compromiso de tamaño de muestra, con una  $\alpha$  para evitar el riesgo de cometer el error tipo I de 5%, así como poder del 80% para evitar el error tipo II, en la plataforma G\*Power-2®, para cálculo de tamaño de muestra para estudios comparativos con proporciones de dos grupos

independientes ( no mutados y mutados) P1=0.85, P2=0.55, respectivamente. Se obtiene un tamaño de muestra de 30 pacientes para cada grupo, un total de 60. Basado el cálculo del software en la fórmula siguiente:

$$n = (Z_{\alpha/2} + Z_{\beta})^2 * (p_1(1-p_1)+p_2(1-p_2)) / (p_1-p_2)^2 = 60 \text{ pacientes}$$

Donde;

n = Tamaño de muestra

Z = Distribución en el que el valor de la media es igual a 0 y desviación estandar igual a 1

$\alpha$  = Error tipo I

$\beta$  = Error tipo II

P1 = Prevalencia en el grupo de estudio

P2 = Prevalencia en el grupo control

## Muestreo

Tipo: Muestreo no aleatorio por conveniencia

**Tabla 3. Definición de variables del estudio**

	DEFINICIÓN CONCEPTUAL	DEFINICIÓN OPERACIONAL	TIPO DE VARIABLE	ESCALA DE MEDICION Y DEFINICIÓN
Mutación del gen H3.3 Variable Independiente	Alteración genética en ADN de tejido tumoral en el gen de la histona 3, mutación de ganancia.	Determinación por extracción de ADN de tejido tumoral parafinado, posterior amplificación y secuenciación Sanger.	Cualitativa Nominal	-Presente -Ausente
Proteína H3F3AK27M Mut Variable Independiente	Proteína mutada en el residuo de lisina y sustituida por metionina en la posición 27, con resultante H3F3A K27M	Determinación por 2 patólogos y un tercero de evaluación, por técnica de inmunohistoquímica, como un patrón difuso en núcleo.	Cualitativa Nominal	-Presente -Ausente
Progresión o Crecimiento Tumoral Variable de Dependiente	Presencia de Crecimiento o presencia de lesión Tumoral por determinación de imagen de Resonancia Magnética por criterios EANO (anexo1), después al tratamiento de Radioterapia al mes.	Determinación de la falta de control tumoral de la resultante del Control de Imagen del tratamiento de Radioterapia.	Cualitativa Categórica ordinal	1Respuesta Completa 2Respuesta Parcial 3Enfermedad Estable 4Progresión Tumoral
Período Libre de Progresión de Variable de Dependiente	Tiempo o período sin evidencia de crecimiento o presencia de una nueva lesión por estudio de resonancia magnética por criterios EANO (anexo1), posterior al tratamiento de radioterapia.	Determinación en meses del control tumoral de la resultante del control de imagen del tratamiento de Radioterapia.	Cuantitativa discreta	meses

Estado Funcional Basal Karnofsky (KNF) Variable de Dependiente	Escala que evalúa el estado funcional o de actividad de los pacientes pediátricos y Adultos, antes del tratamiento de Radioterapia. ANEXO 2	Escala porcentual en acuerdo a la capacidad del realizar sus labores diarias. Y en el paciente pediátrico es la capacidad de jugar y realizar sus actividades al día.	Cuasidimensional, constructo.	Karnofsky: 0-100%
Estado Funcional Posterior a Tratamiento Karnofsky (KNF) Variable Dependiente	Escala que evalúa el estado funcional de los pacientes pediátricos y Adultos, posterior al tratamiento de Radioterapia. ANEXO 2	Escala porcentual en acuerdo a la capacidad del realizar sus labores diarias. Y en el paciente pediátrico es la capacidad de jugar y realizar sus actividades al día.	Cuasidimensional, constructo.	Karnofsky: 0-100%
Edad (Variable descriptora)	Tiempo transcurrido desde el nacimiento de una persona hasta la fecha actual.	Número de años de vida que el paciente dice tener al momento de ser recabado para el expediente clínico.	Cuantitativa discreta	Años
Sexo (Variable descriptora)	Constitución orgánica que distingue al niño de la niña.	Constitución orgánica que es recabada de lo consignado en expediente clínico.	Cualitativa Nominal	Femenino Masculino
Tratamiento quirúrgico	Manejo de resección de tumor.	Porcentaje de resección. Resección máxima 100-80%, resección subtotal =<80-30% y Biopsia<29%	Cualitativa Ordinal	-Resección Máxima -Resección Subtotal -Biopsia
Dosis Total de Tratamiento de Radioterapia	Dosis de manejo mediante radiaciones ionizantes tipo gamma, expresadas en unidad de absorción por kg de material u organismo.	Determinación dosis total en acuerdo a guías internacionales y criterio médico, reportadas en plan de sistema de planeación virtual.	Cuantitativa Continua	Gy
Técnica de Tratamiento de Radioterapia	Planeación y aplicación de dosis de radiación ionizante para su distribución dirigida a un blanco de tratamiento.	Determinación en acuerdo a lo contorneado para cada blanco tumoral en acuerdo a guías internacionales y criterio médico.	Cualitativa Nominal	-3D Conformal -Intensidad Modulada -Intensidad Modulada Dinámica Volumétrica.
Tipo de Fraccionamiento de Radioterapia	Dosis por fracción del manejo mediante radiaciones ionizantes tipo gamma, expresadas en unidad de absorción por kg de material u organismo.	Determinación dosis total en acuerdo a guías internacionales y criterio médico, reportadas en plan de sistema de planeación virtual.	Cualitativa Nominal	-Convencional -Alterado hipofraccionado
Tratamiento de quimioterapia (variable confusora)	Esquema de tratamiento de quimioterapia por vía intravenosa o vía oral como manejo oncológico.	Identificación de aplicación de manejo de quimioterapia.	Cualitativa Nominal	-Temozolamida -Esquema Híbrido -Ninguno



## Descripción general del estudio

Se realizó una valoración de los expedientes de los pacientes que cumplieron los criterios de inclusión, de los cuales se obtuvieron las muestras de proteína y de DNA para realizar las determinaciones moleculares por Inmunohistoquímica y secuenciación. Los resultados se correlacionaron con los datos clínicos y se recopilaron los desenlaces clínicos y oncológicos (Figura 4 y ver manual de procedimientos en anexo 5).

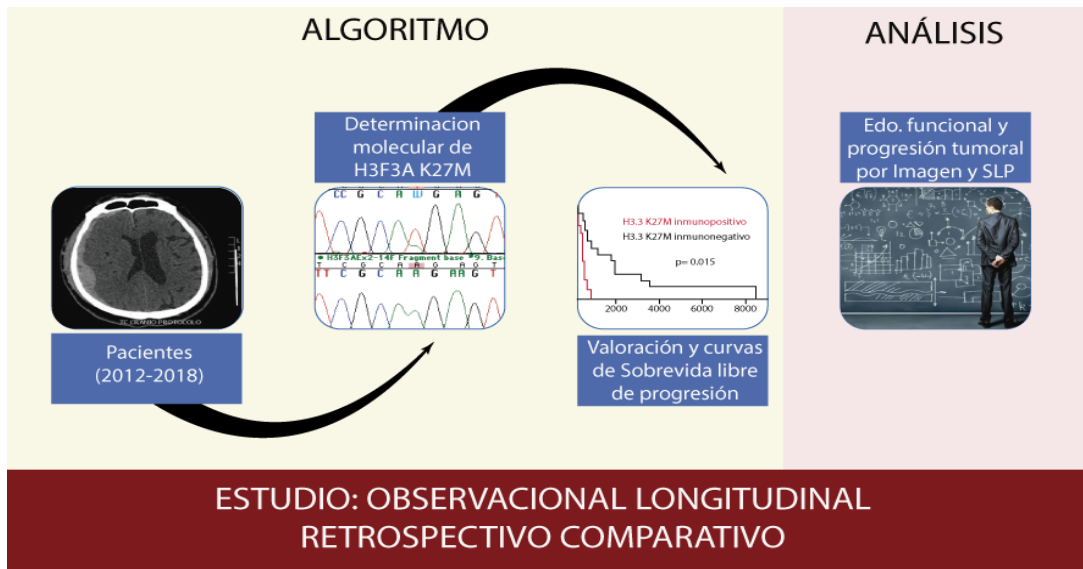


Figura 4. Se muestra el flujo de la metodología iniciando con la valoración de los expedientes de los pacientes del 2012 al 2018 que cumplan los criterios de inclusión, para posteriormente realizar las determinaciones de la mutación genética y de la proteína mutante y se analizará los datos clínicos con las determinaciones moleculares.

## Extracción de ADN y secuenciación

Se realizó la recopilación de los bloques de parafina previamente caracterizadas por tinción con Hematoxilina / Eosina de los pacientes seleccionados para la valoración del tejido tumoral en su predominio (Patólogo experto). La extracción de DNA se realizó por medio de *ReliaPrep™ FFPE gDNA MiniPrep System* de Promega siguiendo las indicaciones del fabricante. Se verificó su integridad por medio de un gel de

agarosa al 0.8 % con un desarrollo de 80 volts durante 90 minutos de corrimiento. Una vez verificado y cuantificado por espectrofotometría (EPOCH); se amplificó la región de interés por PCR convencional usando 100 ng de muestra con *GoTaq DNA polymerase* de Promega siguiendo sus recomendaciones. Los oligonucleótidos se diseñaron previamente usando Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/primer3/>) y se analizaron usando las herramientas de IDT (Integrated DNA Technologies) (<https://www.idtdna.com/>) y BLAST-N (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>) para evitar homoduplex y heteroduplex de los oligonucleotidos y amplicones inespecíficos, respectivamente. Para la reacción de secuenciación se realizó con BigDye™ terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit de Applied Biosystem con el amplicon previamente purificado por escisión de banda de gel de agarosa usando el kit QUIAEX II de QIAGEN (ver manual de procedimientos).

Las muestras fueron secuenciadas usando el 3500 Series Genetic Analyzer de Applied Biosystem. El análisis de los datos se utilizó Sequencher DNA Sequence Analysis Software de GeneCodes y la base de datos de GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>).

### **Expresión de proteína mutada**

Se valoro la expresión proteica mediante la técnica de inmunohistoquímica por el sistema de peroxidasa y diaminobencidina con un anticuerpo específico para la detección de la proteína H3F3A K27M mut (Medaysis®, catálogo RM0106, clona RM192 a la concentración 1:100) en el sistema automatizado ventana, en acuerdo a la técnica validada por Venneti et al 2014 (18). El análisis de imágenes para la evaluación semicuantitativa fue mediante el sistema de patología digital APERIO®, ver manual de procedimientos.

## **Recopilación clínica de desenlaces**

Se revisaron los expedientes clínicos y radiológicos de los pacientes con diagnóstico de glioma de línea media, tratados en el servicio de Radioterapia; y se valoró el estado funcional como desenlace clínico posterior a radioterapia. La identificación de la progresión fue mediante la respuesta radiológica a radioterapia por imágenes mediante el reporte de Radiología basado en los criterios de EANO/RANO (experto en imagen oncológica) contemplando un primer control y se obtuvo la SLP mediante los seguimientos de imagen a los 6, 9 y 12, meses, en acuerdo a las guías internacionales.

### **Análisis de información:**

El análisis estadístico se realizó con apoyo de la herramienta del paquete estadístico Prism v6. Inicialmente se realizó un análisis descriptivo para la obtención de frecuencias absolutas y proporciones, así como de distribución de las características clínicas y lugar de residencia de los pacientes. Se realizó pruebas de normalidad como la de Kolmogorov- Smirnov.

La estadística inferencial realizada fue para establecer la diferencia entre variables categóricas mediante prueba  $X^2$  con su respectivo ajuste y exacto de Fisher, para variables relacionadas (estado funcional previo y posterior a radioterapia) se realizó ajuste de Mantel- Haenszel. Y se realizó las curvas de Kaplan Meier, para la sobrevida libre progresión tumoral. El análisis de Log Rank se realizó para establecer la diferencia entre el grupo de pacientes con presencia de la mutación H3F3A K27M y el grupo que no la presentó.

**Normativa y aspectos éticos:**

El presente estudio se realizó mediante la recopilación de tejido tumoral parafinado y expedientes clínicos-radiológicos se consideró un estudio sin riesgo, con registro de aprobación por los comités de Investigación y Bioética R-2018-3602-016. La recopilación de los resultados y la presencia del biomarcador del tejido tumoral de los pacientes, así como la documentación del estudio de registros fue responsabilidad de los investigadores y se salvaguardo siempre la confidencialidad y privacidad de los pacientes.

De acuerdo con los principios de bioética vigentes se mantuvo la confidencialidad y privacidad de los pacientes en el presente estudio. La información parcial resultante del estudio ha sido utilizada con fin de información médica o investigación, y para presentaciones con el mismo fin, pero siempre se ha salvaguardo la identidad de los pacientes.

**Cumplimiento de la ley y bioseguridad:**

El protocolo de este estudio cumplió con los aspectos éticos de investigación en seres humanos de acuerdo con los principios de la Declaración de Helsinki, así como del Reglamento de la Ley General en Salud en materia de Investigación para la Salud, Título segundo, Capítulo I, artículo 17 bis1.

Este estudio se clasifico como una investigación sin riesgo de acuerdo al Reglamento de la Ley General en Salud en materia de Investigación, dado que se efectuó revisión de bloques de parafina de un archivo que contienen tejido procedente de la biopsia realizada a los pacientes como parte del procedimiento habitual en el diagnóstico patológico de gliomas de línea media, además de la revisión de sus respectivos expedientes clínicos (incluyendo el radiológico).

Los sujetos a los cuales pertenecían las muestras de tejido a estudiar no recibieron algún beneficio directo como parte de este estudio; los resultados que se obtuvieron no fueron aplicables a la práctica clínica y por lo tanto, no se aplicaron para determinar su tratamiento y establecer su pronóstico. Los resultados que se obtuvieron en este estudio representaron un beneficio indirecto, ya que se obtuvo conocimiento científico, que un futuro puede contribuir como un beneficio social.

Por lo tanto, el balance riesgo/beneficio de este estudio, se inclinó hacia el beneficio, ya que no represento ningún riesgo para los sujetos de estudio debido a que se trabajó únicamente con sus muestras de tejido. Se protegió el derecho de las pacientes a solicitar nueva revisión de su diagnóstico mediante las laminillas y bloques, teniendo el cuidado de conservar material en los bloques de tejido embebido en parafina que fue utilizado para el estudio y en lo posible con el mínimo volumen necesario utilizando la técnica de microarreglo tisular.

Al final del estudio, los bloques de tejido embebido en parafina o laminillas que no se retomaron para muestra del proyecto fueron devueltos al servicio de Patología, y las laminillas o muestras que se utilizaron para el proyecto de investigación se conservaran durante 5 años en el laboratorio de Oncología Molecular de la UMAE Hospital de Oncología, Centro Médico siglo XXI y se desecharan pasado ese periodo de tiempo, lo previamente comentado en acuerdo a la normatividad PROY-NOM-037-SSA3- 2013.

En relación a la suspensión del requisito de consentimiento informado, de acuerdo a lo que se señala en las Pautas Éticas Internacionales para la Investigación Biomédica en seres humanos preparadas por el Consejo de Organizaciones Internacionales de las Ciencias Médicas (CIOMS) en colaboración con la Organización Mundial de la Salud, en la pauta 4 en referencia al consentimiento informado individual subdivisión uso de especímenes biológicos archivado, se señala que los registros médicos y las muestras biológicas tomadas en el curso de la atención clínica pueden utilizarse para la investigación sin el consentimiento de los pacientes/sujetos, si un comité de

evaluación ética ha determinado que la investigación tiene un riesgo mínimo o no tiene riesgo, que no se violarán los derechos o intereses de los pacientes, que se asegura la privacidad y confidencialidad o anonimato y que la investigación ha sido diseñada para responder una pregunta relevante o importante y sería impracticable si el requisito del consentimiento informado fuera impuesto.

En la pauta 18 referente a la protección de confidencialidad se señala que los estudios epidemiológicos utiliza los registros médicos y generalmente es impracticable obtener el consentimiento informado de cada paciente identificable, por lo que un comité de evaluación ética puede suspender el requisito de consentimiento informado cuando esté en consonancia con los requisitos de la legislación aplicable y existan garantías seguras de confidencialidad, por lo que en relación a lo anterior, en este estudio fue apoyado por jefatura del servicio de Patología de la unidad.

### **Factibilidad del estudio**

El presente estudio fue factible debido a que se contó con la información clínica y la muestra biológica en parafina (referente a la revisión del material en las unidades de oncología ya comentadas con manejo de radioterapia). La tutora del proyecto la Dra. Patricia Piña tuvo amplia experiencia en determinaciones de biología molecular, y conto con la infraestructura necesaria para su realización, y el resto de consumibles faltantes, fueron apoyados por el laboratorio de diagnóstico oncológico y por parte del estudiante de maestría.

Además, en el hospital de Oncología contó con el apoyo de expertos en Radiología Oncológica, Patología Oncológica, Oncología Médica Pediátrica y asesores expertos de diferentes unidades como se menciona a continuación:

## **Recursos humanos**

1. D. en C. Patricia Piña Sánchez  
Bióloga, Maestra en Ciencias Químico-biológicas y Doctora en Ciencias Biomédicas. Miembro del SNI nivel I. Coordinación general del proyecto.
2. Dra. Iris Feria Romero  
Doctora en Ciencias Biológicas. Miembro de la Unidad de Investigación de Enfermedades Neurológicas del Hospital de Especialidades.
3. Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes  
Médico especialista en Patología con subespecialidad en Oncología Pediátrica.
4. M. en C. Héctor Urueta Cuellar  
Biólogo, Maestro en Ciencias Bioquímicas. Miembro del departamento de Genética, Laboratorio de Biología Molecular, del Hospital General de México.
5. M.A.E. María Fátima Chilaca Rosas  
Médico de Alta Especialidad en Radio Oncología Pediátrica y Especialista en Radio Oncología. Alumna de Maestría en Ciencias Médicas, IMSS/UNAM.

## **Infraestructura**

- El laboratorio de Oncología Molecular, Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, CMN SXXI, IMSS, se encuentran equipado para efectuar análisis de inmunohistoquímica y biología molecular.
- Archivo de bloques de parafina.
- Archivo de expedientes clínicos e imagen de los pacientes con la neoplasia.

## **Financiamiento**

El protocolo se sometió en las convocatorias de financiamiento Institucionales por el FIS y en convocatorias de la UNAM, en esta última con resultado favorable, pero finalmente el apoyo financiero no se concluyó por disyuntivas administrativas.

## 11. Resultados

Se encontró registro de 109 expedientes de pacientes pediátricos y jóvenes adultos con diagnóstico de glioma de línea media en el archivo del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional Siglo XXI, en el periodo comprendido entre 1 de enero de 2012 al 31 de diciembre de 2018 (Figura 5). Sin embargo, 61 pacientes que contaban con expediente clínico, solo fue posible recuperar el tejido tumoral embebido en parafina de 35 pacientes, posteriormente se excluyeron 3 pacientes por inadecuada calidad de ADN, por lo que se analizaron para este estudio 32 pacientes. La zona de residencia de los pacientes se distribuyó como se muestra en la figura 6, destaca que el 46.9% pertenecen al área Metropolitana, y las características clínicas de los pacientes analizados se muestran en la Tabla 4.

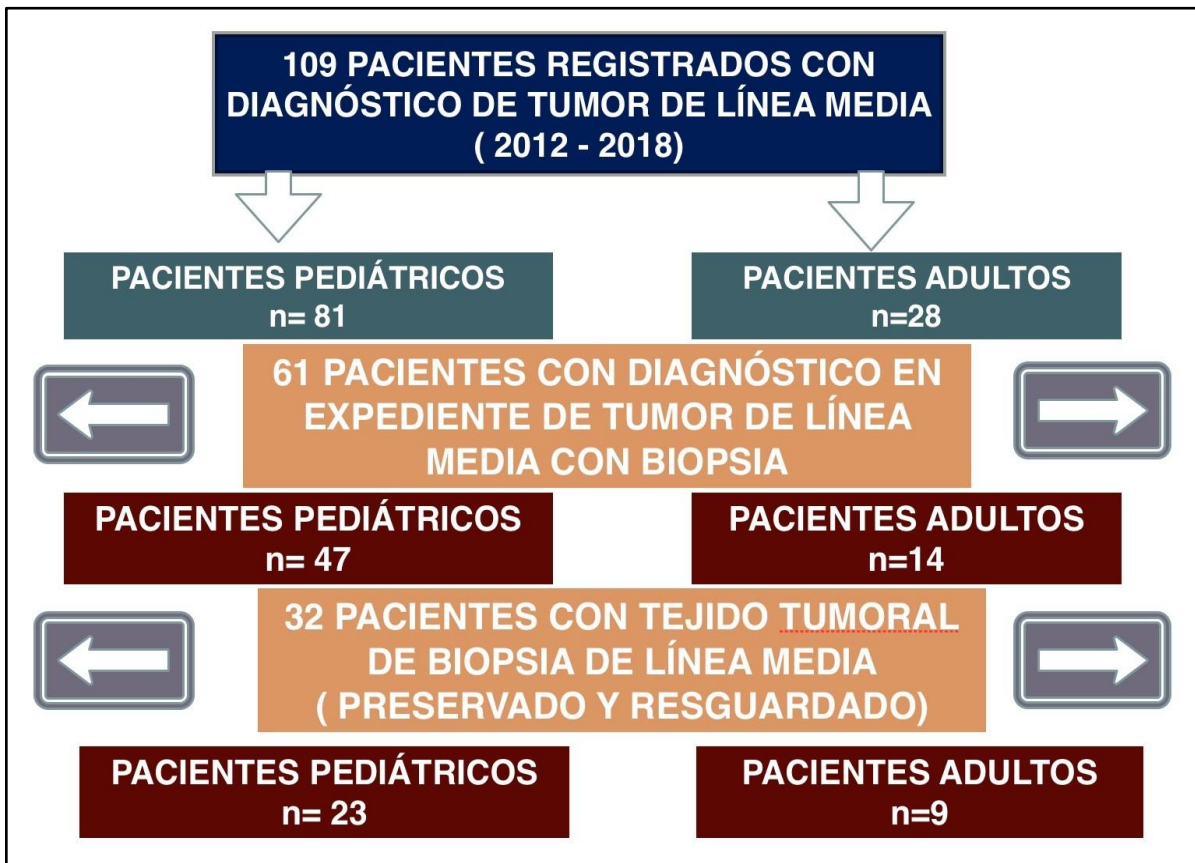


Figura 5. En el esquema se observa la pérdida de evaluación de muchos casos de pacientes, con relación a la falta de toma de biopsia diagnóstica, la obtención de tejido adecuado y preservación que permitiese cumplir los criterios para el análisis del estudio.



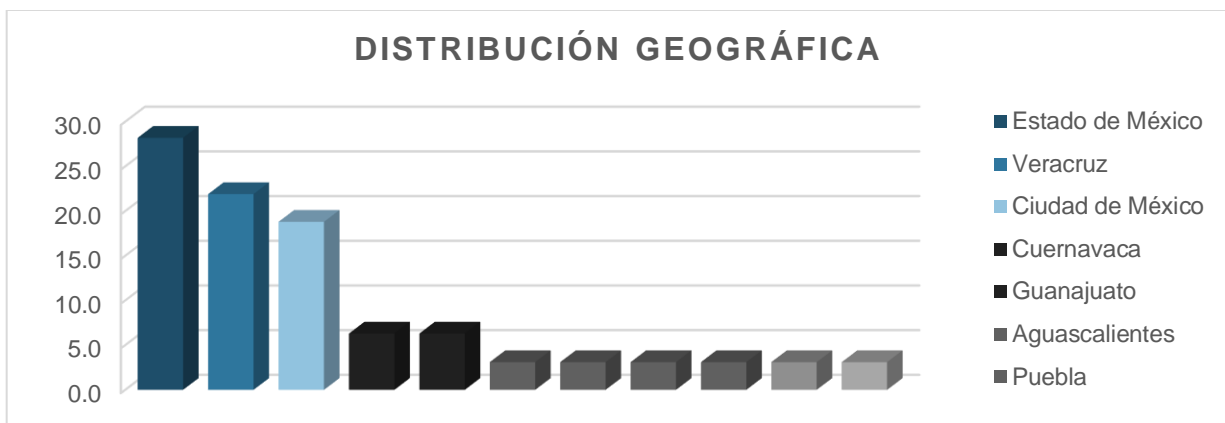


Figura 6. En la gráfica de frecuencia se observa que el lugar de origen de los 32 pacientes fue con mayor frecuencia se encontró Estado de México.

**Tabla 4. Características de los pacientes**

	n= 32	100%
Edad en grupo global		
Mediana	10 años	
Rango	(1-39)	
Sexo (F:M)	1.3:1	
-F	18	56.2
-M	14	43.8
Tipo de pacientes:		
-Pediátricos	23	71.9
-Adultos Jóvenes	9	28.1
Localización /Extensión		
-Pontino y/o extensión a mesencéfalo	20	62.5
-Tálamo	8	25
-Otros sitios de línea media	4	12.5
Síntomas		
-Alteración de nervio craneal	20	62.5
-Déficit motor	30	93.75
-Ataxia	28	87.5
Estado Funcional Basal		
>/=80%	7	21.9
</=70%	25	78.1
Intervención Quirúrgica		
-Biopsia	32	100
-Resección Subtotal	0	0
Esquema de Radioterapia		
-Convencional	30	93.8
-Alterado	2	6.2
Dosis de Radioterapia		
>/=54Gy	14	43.7
</=55Gy	18	56.3
Modalidad de Radioterapia		
-Conformal	29	90.6
-Intensidad Modulada	3	9.4
Quimioterapia		
-Manejo híbrido c/s temozolamida (3-12 c)	23	71.9
-Ninguno	9	28.1

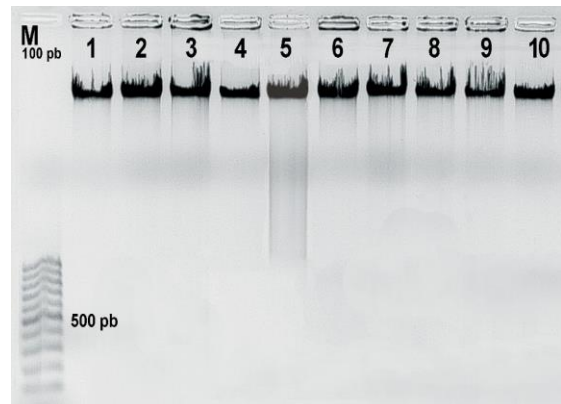
**Abreviaturas:** n= número de sujetos estudiados, F= sexo femenino, M= sexo masculino, KNF: Escala de estado funcional de Karnofsky y Gy=Gray.

### Determinación de la presencia de la mutación del gen *H3.3*

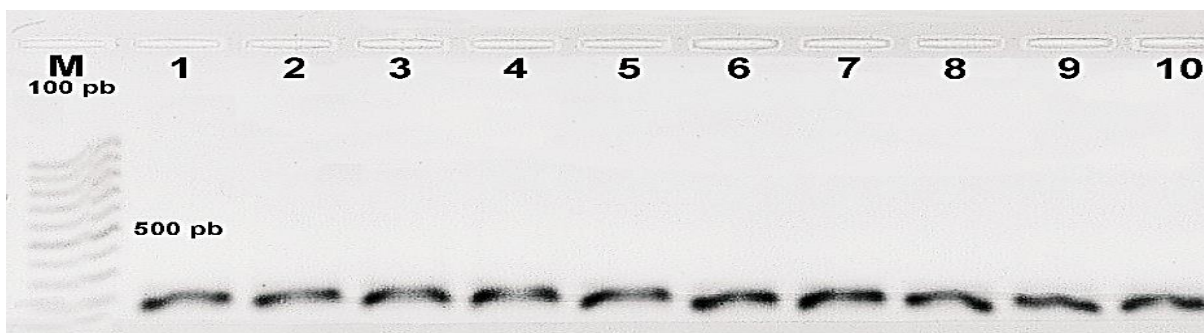
La determinación de la presencia de la mutación del gen *H3.3* se realizó como parte de la validez interna de la determinación de la mutación inicialmente por la prueba de inmunohistoquímica. Se verificó la calidad del ADN y su integridad en gel de agarosa al 0.8% (ver tabla 5 y figura 7). La amplificación de la secuencia de interés se realizó con los oligonucleótidos Forward primer: GTACAAAGCAGACTGCCCGCAAAT y Reverse primer: GTGGATACATACAAGAGAGACTTTGTCCC de las muestras determinadas como positivas por IHQ (ver figura 8). Y después se realizó la reacción de secuenciación mediante la plataforma *Sequencher 5.4.6 Gene Codes Corporation* (ver figura 9).

**Tabla 5. Relación de ADN y su pureza**

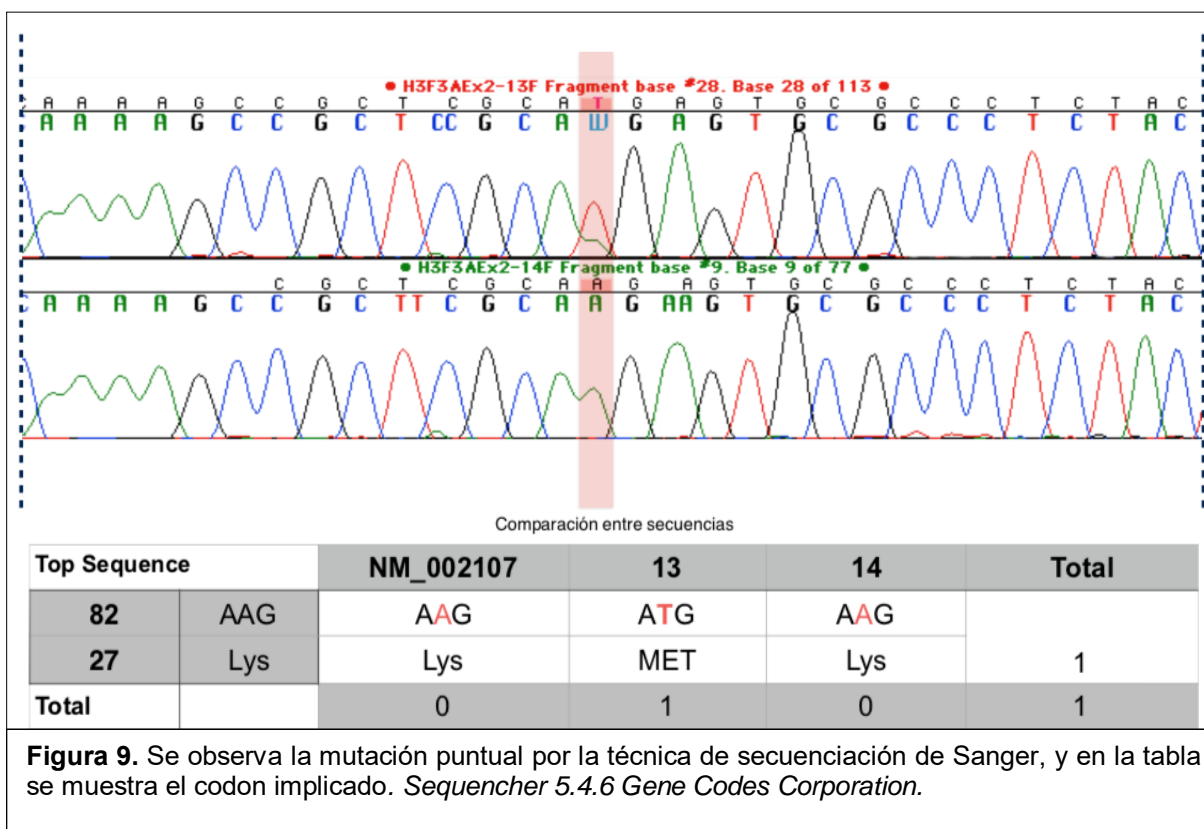
Carril	Muestra	ng/ $\mu$ L	260/280
1	H3-012	61	1.8
2	H3-022	181	1.8
3	H3-019	94	1.8
4	H3-013	111	1.8
5	H3-014	134	1.8
6	H3-023	127	1.8
7	H3-005	326	1.8
8	H3-018	206	1.9
9	H3-025	208	1.8
10	Control	115	1.8



**Figura 7:** Se observan el gel con 5 $\mu$ L de muestra a un voltaje de 80 volt/cm<sup>2</sup> durante 90 minutos y se reveló con Gel Red al 1x.



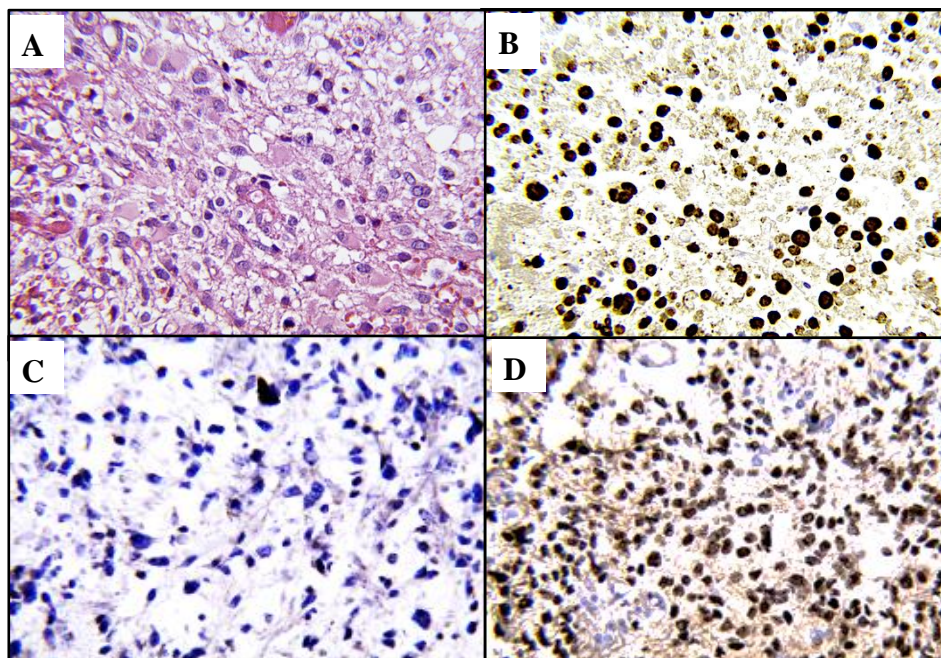
**Figura 8.** Se observa en el gel de agarosa los productos de PCR con tamaño de 179pb, las muestras de los casos de los pacientes positivos por IHQ presentes en los pozos con número de folio del 1-9 y el número 10 correspondiente al control.



**Figura 9.** Se observa la mutación puntual por la técnica de secuenciación de Sanger, y en la tabla se muestra el codon implicado. *Sequencher 5.4.6 Gene Codes Corporation.*

Encontrando que la frecuencia de la presencia de la mutación en el gen H3.3 por grupo de edades y localización como se muestra en la tabla 6, destacando que del subgrupo de pacientes pediátricos con localización únicamente de tallo en el 42.8% (6 pacientes) presentó la mutación, y en los pacientes adultos jóvenes del subgrupo de localización tallo representó el 33.3% (2 pacientes) y un solo paciente adulto con localización en tálamo con la mutación homocigota.





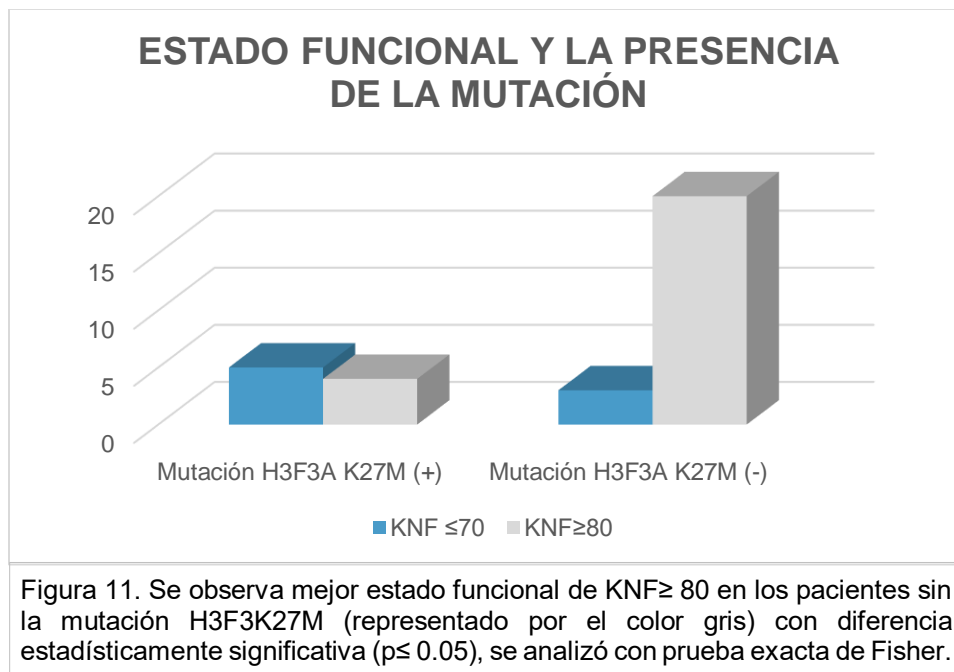
**Figura 10.** En la imagen A se observa el tejido tumoral de un glioma difuso de alto grado por características histológicas con tinción de hematoxilina- eosina (40x); en la figura B se observa el tejido tumoral de un paciente pediátrico con la inmuno-tinción nuclear difusa con reconocimiento de la proteína mutada H3F3A K27M. En la figura C se observa el tejido tumoral negativo a la inmuno-tinción del anticuerpo monoclonal de la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M. En la figura D se muestra la inmuno-tinción positiva a la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M en el tejido tumoral de un paciente joven adulto.

### **Estado funcional de los pacientes pediátricos y jóvenes adultos.**

El 78.1% de los pacientes previo a manejo con radioterapia presentaron  $\leq 70\%$  y el 21.9 % con estado funcional de 80-90%. Después del manejo de radioterapia el Karnofsky  $\geq 80\%$  se presentó en el 75% de todos los pacientes ( $p \leq 0.03$ ); cuando se agruparon por la expresión de la mutación H3F3A K27M, se encontró que los pacientes que presentaron la mutación el 66.6% (5) no modificó el estado funcional  $\leq 70\%$ , y los 23 pacientes que no presentaron la mutación el 86.9% (20 pacientes) presentaron  $\geq 80\%$ , ver tabla 7 y figura 11.

Tabla 7: Modificación del estado funcional por radioterapia				
KNF previo a RT n= 32		KNF Posterior a RT n= 32		Valor (p)
≤ 70%	≥ 80%	<=70%	≥ 80%	
<b>25 (78.1%)</b>	7 (21.9%)	8(25%)	24(75%)	≤ 0.05
<b>H3F3A K27M (+) = 7</b>	H3F3A K27M (+) = 2	H3F3A K27M (+) = 5	H3F3A K27M (+) = 4	

Tabla 10.3. Se observa mejoría del estado funcional después del tratamiento de Radioterapia con diferencia estadísticamente significativa en los casos que se presentó la mutación predominantemente sin cambios en el estado funcional ( $p \leq 0.02$ ), se analizó con prueba X2 con ajuste de Mantel-Haenszel.



## Modalidad de radioterapia

La mayoría de los pacientes analizados recibió manejo con la técnica conformal en el 90.8% (véase figura 12), sin embargo, en la distribución en proporción de los pacientes que presentaron la mutación H3F3A K27M por técnica fue semejante ( $p=0.18$ ).

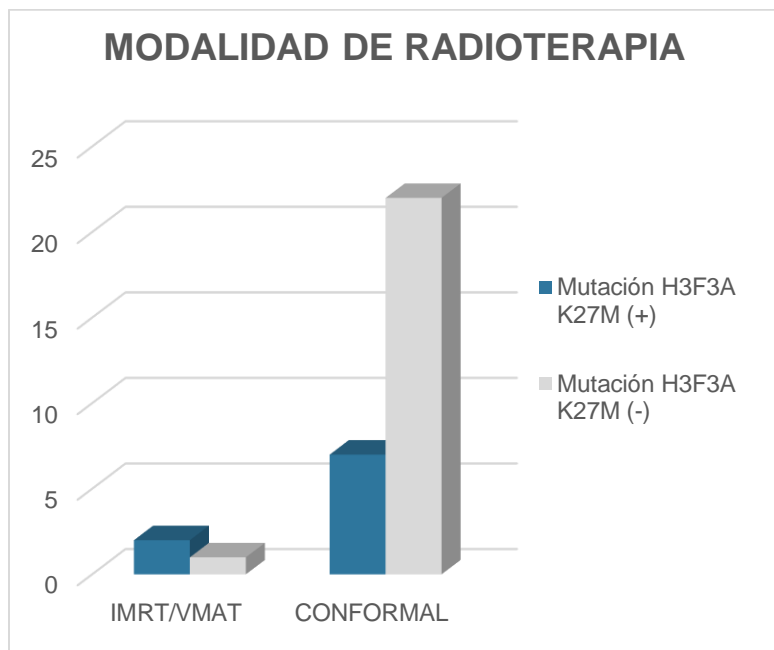


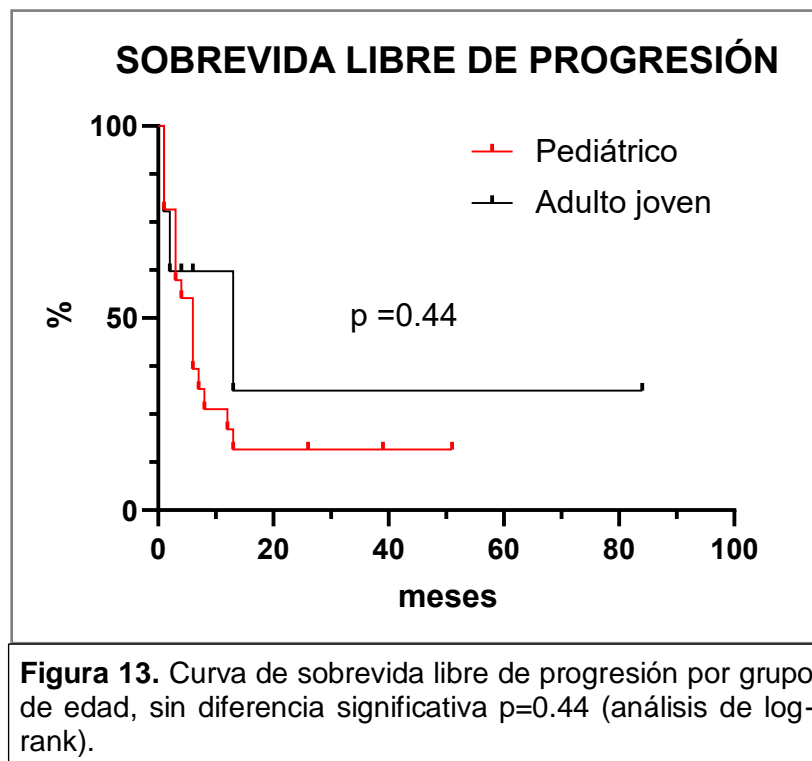
Figura 12. Se observa el área gris del gráfico los pacientes sin la presencia de la mutación y en azul la representación de los pacientes que presentaron la mutación; para ambas modalidades de técnicas de radioterapia IMRT/VMAT y Conformal, pero sin diferencia estadísticamente significativa ( $p=0.18$ ) por la presencia de la mutación H3F3A K27M; se analizó con prueba exacta de Fisher.

## Progresión y Sobrevida Libre de Progresión

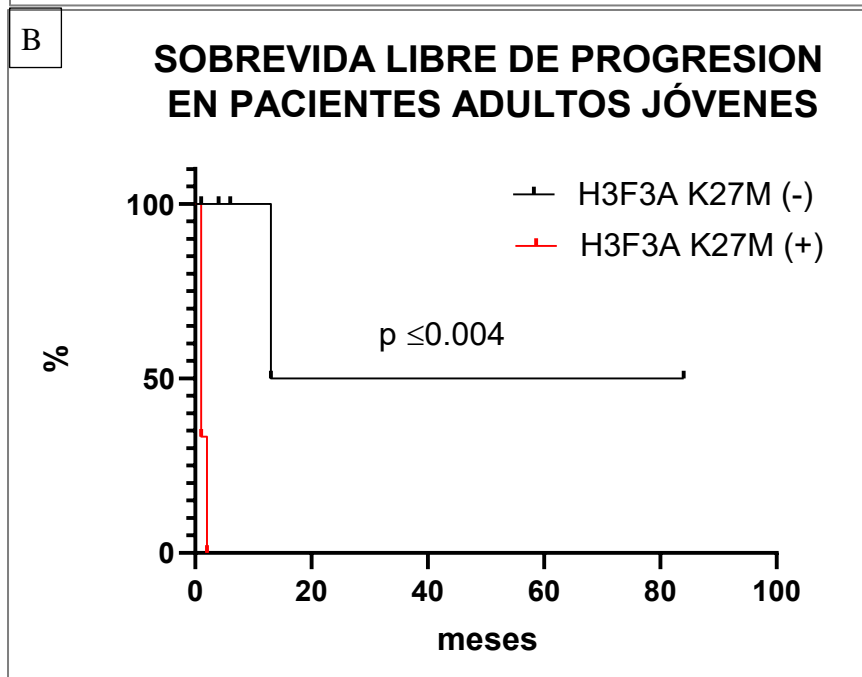
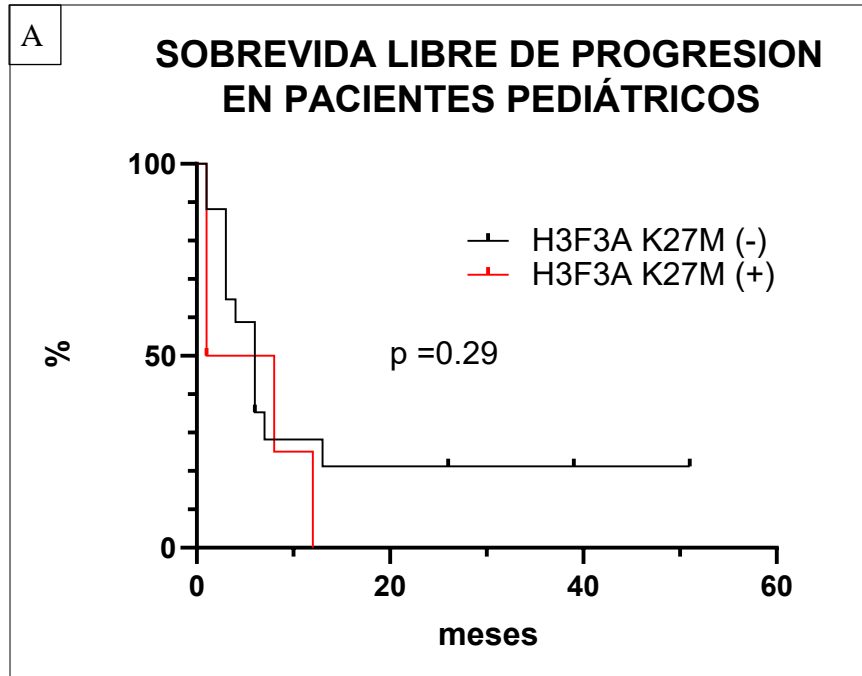
La mediana de SLP fue de 6 meses en el grupo de pacientes pediátricos y 13 meses para los pacientes adultos jóvenes (véase figura 13). El 100% de los pacientes que presentaron la mutación progresaron y en el 52.2% de los pacientes que no presentaron la mutación.

La presencia de la mutación H3F3A K27M decremento la mediana de SLP de 4.5 y 1 mes ( $p=0.29$  y  $p\leq 0.024$ ) por grupo de edad pediátrica y adulto joven, respectivamente (véase en figuras 14A y 14B).

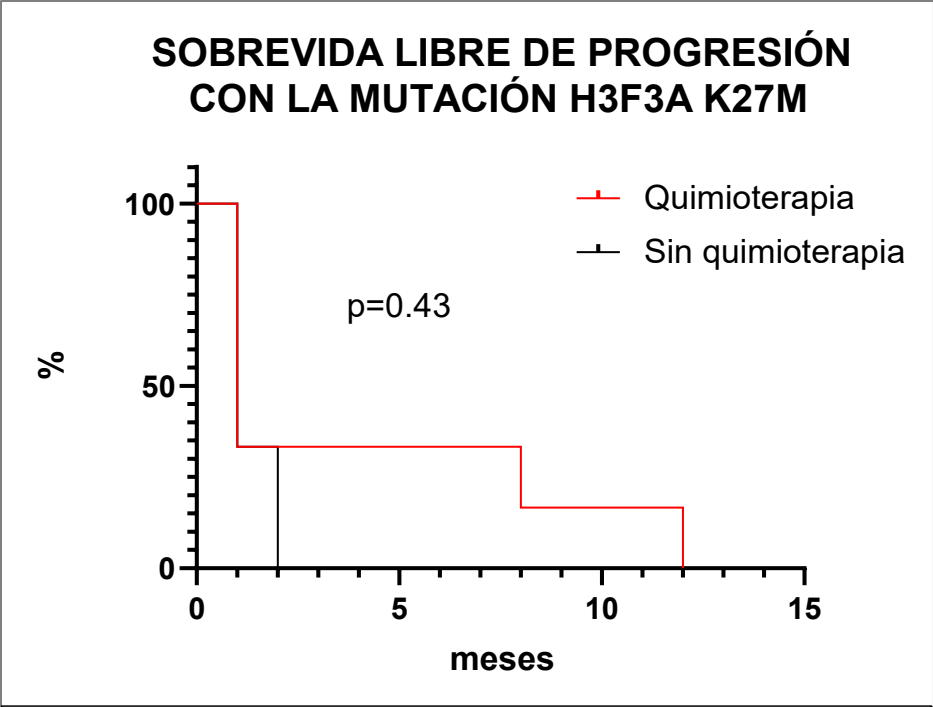
En el análisis de los pacientes que recibieron quimioterapia 71.8% vs 28.2% que no recibieron (ver figura 15), no se encontró diferencia en la SLP ( $p=0.44$ ). En referente a la dosis de radioterapia (ver figura 16), tampoco se encontró diferencia en la SLP de los pacientes que recibieron dosis menores a 55 Gy ( $p=0.44$ ).



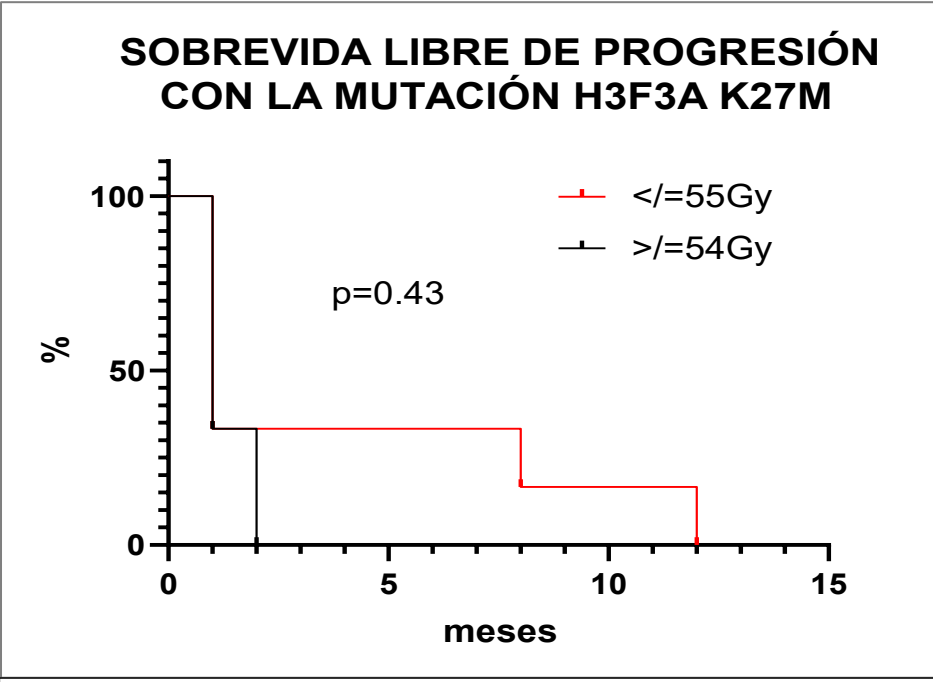




**Figura 14.A)** Curva de sobrevida libre de progresión por presencia de la mutación en el grupo pediátrico no mostrando diferencia estadística ( $p=0.29$ ). **14.B)** Curva de SLE por presencia de la mutación en el grupo de adultos jóvenes ( $p \leq 0.004$ ), con significancia estadística al análisis log-rank.



**Figura 15:** Curva de sobrevida libre de progresión en pacientes con la presencia de la mutación por manejo de quimioterapia, sin diferencia significativa al análisis de log-rank ( $p=0.43$ ).



**Figura 16:** Curva de sobrevida libre de progresión en pacientes con la presencia de la mutación con diferente dosis de radioterapia, sin diferencia significativa al análisis de log-rank ( $p=0.43$ ).

## 12. Discusión

Nuestro estudio encontró que la mayoría de los pacientes analizados fueron originarios del área metropolitana de nuestro país por la cercanía a los centros de tercer nivel de atención institucional. La mediana de edad por la localización de gliomas de línea media en el global de los pacientes fue 10 años similar a los reportado por Mackay y colaboradores(42); pero a la subdivisión por subgrupos de edades: en los pacientes pediátricos la mediana fue de 7 años muy similar a lo reportado en la literatura por el grupo de Kleinschmidt-DeMasters con mediana reportada de 8 años, y en el subgrupo de jóvenes adultos del presente trabajo con una mediana de 26 años de edad dicha cifra inferior a lo reportado en por Kleinschmidt-DeMasters, pero destacando que en dicho trabajo las edades de los pacientes adultos evaluados incluyeron adultos mayores (24).

La presentación clínica basal de nuestros pacientes fue ataxia en 87.5% y déficit motor 93.8%, y lamentablemente la descripción de la evolución de la mayoría de los pacientes fue abrupta y con frecuencia relacionada con lesiones pontinas con afección a mesencéfalo de forma difusa y/o extensa en el 62.5%, y en otros escenarios como el de 4 pacientes con lesiones extensas desde el cuerpo caloso, protuberancia hasta hipotálamo fueron considerados como afección extensa de la línea media.

Al valorarse en el subgrupo de los pacientes con la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M todos presentaron déficit motor, alteración de nervio craneal y ataxia del subgrupo de pacientes pediátricos y en el subgrupo de jóvenes adultos presentaron alteración de nervio craneal y déficit motor en el 100% de los que expresaron la proteína mutada; por lo que no se encontró diferencia clínica por subgrupo de edades en contraste a lo reportado por el trabajo de Jiang y colaboradores (48).

En los pacientes pediátricos como jóvenes adultos, presentaron la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M en el 26.1% y 33.3%; respectivamente, sugiriendo una menor proporción a 34.9% como reportado por Mackay y cols.(42), pero a la valoración de la presencia de la mutación H3F3A K27M por subgrupos de localización, se encontró que la proporción específica para la localización de tallo estuvo presente hasta en el 42.8% concordante a lo publicado en la literatura, siendo importante remarcar que la localización de tallo fue la más frecuente.

Sin embargo, la lesiones con localización en tálamo se encontró en pediátricos en mayor frecuencia pero ninguna con la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M, y solo se encontró en población adulta la presencia de la mutación H3F3A K27M en esta localización, siendo de forma contrastante con otras publicaciones en las cuales se han evidenciado esta localización con mayor frecuencia en población adulta con la mutación e inclusive de forma localizada a hipotálamo(49).

El estado funcional para nuestro estudio fue relevante en la valoración del estado basal del paciente, debido a que la mayoría de los pacientes al diagnóstico presentaron cuadros clínicos avanzados (alteración de nervio craneal, alteración motora y ataxia), en relación con la extensión de la neoplasia como ya se ha comentado. Encontramos que los pacientes con la presencia de la mutación H3F3A K27M no modificaban el estado funcional o no presentaban mejoría posterior al tratamiento de radioterapia. Al respecto Demaria y Mackay han sugerido la asociación de falla de respuesta a radioterapia y su posible relación de radioresistencia por mecanismos de afeción en la respuesta inmune celular de linfocitos CD8 y modificación del microambiente (47, 50).

Aunque algunos hallazgos ya mencionados en referente a la proporción de la presencia de la mutación y la falta de respuesta posterior al manejo de radioterapia con repercusión de la falta de mejoría del estado funcional de los pacientes, se encontró en este estudio que no se asociaba al tipo de modalidad, esquema o dosis total de radioterapia siendo estos datos importantes de este estudio.

La evaluación de la escala NANO, recientemente propuesta por las guías internacionales de neuro oncología para la práctica clínica, no fue posible valorarse en nuestros pacientes, debido a que los parámetros no se recopilaron en todas las valoraciones clínicas de la consulta externa pediátrica y de adultos jóvenes, con relación a la propia naturaleza retrospectiva del estudio. Por lo previamente descrito este trabajo nos permitió evidenciar la necesidad de complementar e implementar la valoración de esta escala NANO en la clínica médica de neuro-oncología institucional cotidiana.

En nuestro estudio se buscó la posible participación de la dosis y modalidad de tratamiento de radioterapia asociada a la SLP, pero no se encontró impacto en la SLP; aunque en este respecto, existe información del posible beneficio de esquemas alterados o por dosis en los tumores con la mutación H3F3AK27M y la respuesta a la radioterapia como en el trabajo de Demaria 2012(35), pero aún no se ha valorado en ensayos clínicos los diferentes esquemas alterados con estos contexto clínico y la posible implicación biológica y predictiva con el manejo oncológica en la presencia de la mutación H3F3A K27M.

La SLP fue reducida de manera importante por la presencia de la mutación encontrando una mediana en adultos y pacientes pediátricos de 4.5 meses vs 1 mes, respectivamente; cobrando relevancia en el pronóstico del paciente en nuestro estudio, comparado con lo reportado por Jiang en los paciente adultos y pediátricos de 16 y 10 meses, respectivamente(48, 51); por lo que generó el cuestionarnos la posible implicación del estado funcional al debut podría influir en la SLP, independientemente de la presencia de la mutación, en relación a que los pacientes acudieron de manera inicial con enfermedad clínica avanzada; pero dicha propuesta deberá ser explorada y confirmada en un estudio prospectivo.

Además, se valoró la presencia de la quimioterapia en los pacientes pediátricos que la recibieron, no encontrándose beneficio, pues solo se observó en las gráficas de SLP el efecto de la radioterapia, y lamentablemente en 4 pacientes pediátricos que recibieron quimioterapia presentaron complicaciones graves relacionadas, en ausencia o presencia de la mutación.

En nuestro estudio encontramos como principales limitaciones: la naturaleza retrospectiva, el número de sujetos analizados en relación con la baja toma de biopsia estereotáxica relacionada a la falta de recurso al diagnóstico extenso, y la falta de un banco para el adecuado resguardo de tejido tumoral.

Por lo previamente comentado será importante para futuros estudios prospectivos en nuestra población valorar y validar la toma de biopsia líquida de líquido cefalorraquídeo por punción lumbar, con procesamiento de la muestra mediante amplificación de ADN circulante tumoral mediante la PCR por punto final y secuenciación Sanger ([52](#)). Otra opción como ya se ha comentado por otros autores para una mejor precisión del diagnóstico y valoración de la agresividad y pronóstico de la enfermedad mediante la determinación de la técnica de PCR cuantitativa como lo sugerido en su trabajo de Stallard y colaboradores ([53](#), [54](#)).

La validación de la biopsia líquida permitiría obtener en la mayoría de los pacientes la evaluación de la presencia y ausencia de la mutación H3F3 K27M y consecuentemente poder conocer el pronóstico del paciente, y sustentar en un futuro ensayos clínicos, evitando las complicaciones por la toma de biopsia tradicional.

La información generada en el presente trabajo nos sugiere que en nuestra Institución se deberá buscar diferentes vías para lograr el diagnóstico molecular como ha sido remarcado en los criterios solicitados por la OMS 2016, lo cual es factible en función de los resultados logrados en el presente trabajo.

Un avance importante con este proyecto fue la validación de la técnica de IHQ para la expresión de la proteína mutada H3F3A K27M mediante secuenciación Sanger para el diagnóstico en nuestra Institución. El presente estudio apoyo la obtención de la frecuencia de la presencia de la mutación H3F3A K27M, además de que nos reveló importante información clínica a considerar y las áreas de oportunidad por valorar en este grupo de pacientes, con lo que se generaron bases de datos para el desarrollo de estudios prospectivos que puedan validar los resultados y generar información para extender diferentes esquemas de radioterapia que puedan ofrecer algún beneficio clínico en estos pacientes, y que permitan sustentar el modificar prácticas médicas clínicas institucionales.

Finalmente, el presente estudio es el único trabajo que incluye pacientes de población latinoamericana con la presencia y ausencia de la mutación H3F3A K27M en pacientes pediátricos como adultos jóvenes, y su relación con sus características clínicas, estado funcional y desenlaces oncológicos posterior al manejo de radioterapia; remarcando la importancia del beneficio de la radioterapia sin implicación dosis dependiente.

## **Conclusiones**

La presencia de la mutación H3F3A K27M confirió progresión en comparación a los que no presentaban la mutación. El estado funcional fue relevante en la valoración basal del paciente, debido a que la mayoría de los pacientes se diagnosticaron con cuadros clínicos avanzados; y la presencia de la mutación afecto la mejoría del estado funcional con el manejo de radioterapia.

Además, se encontró diferencias en los pacientes pediátricos y jóvenes adultos como la proporción de la presencia de la mutación y la localización de los pacientes que la presentaron por subgrupo de edades. La SLP al manejo oncológico con radioterapia se encontró modificada solo en la población adultos jóvenes, y fue independiente de la dosis o modalidad.

## REFERENCIAS

1. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):803-20.
2. Ostrom QT, Gittleman H, Fulop J, Liu M, Blanda R, Kromer C, et al. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012. *Neuro Oncol.* 2015;17 Suppl 4:iv1-iv62.
3. Bleyer A, Barr, R., Ries, L., Whelan, J., & Ferrari, A. . *Cancer in Adolescents and Young Adults. Pediatric Oncology.* 2017.
4. SINAVE/DGE/SALUD. Perfil epidemiológico de cáncer en niños y adolescentes en México. In: *Epidemiologica SNdV*, editor. México2011. p. 163.
5. Aguirre-Cruz L, Rangel-Lopez E, Cruz-Aguilera DL, Rodriguez-Perez CE, Ruano L, Velasquez-Perez L, et al. Historical distribution of central nervous system tumors in the Mexican National Institute of Neurology and Neurosurgery. *Salud Publica Mex.* 2016;58(2):171-8.
6. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Burger PC, Jouvet A, et al. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* 2007;114(2):97-109.
7. Gupta A, Dwivedi T. A Simplified Overview of World Health Organization Classification Update of Central Nervous System Tumors 2016. *J Neurosci Rural Pract.* 2017;8(4):629-41.
8. Duffner PK. Diagnosis of brain tumors in children. *Expert Rev Neurother.* 2007;7(7):875-85.
9. Osborn Aea. *Diagnostic imaging brain.* In: Amirsys, editor. *Diagnostic imaging brain.* 3rd edition ed. Salt Lake City2007.
10. Aboian MS, Solomon DA, Felton E, Mabray MC, Villanueva-Meyer JE, Mueller S, et al. Imaging Characteristics of Pediatric Diffuse Midline Gliomas with Histone H3 K27M Mutation. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2017;38(4):795-800.
11. Steffen-Smith EA, Shih JH, Hipp SJ, Bent R, Warren KE. Proton magnetic resonance spectroscopy predicts survival in children with diffuse intrinsic pontine glioma. *J Neurooncol.* 2011;105(2):365-73.
12. Weller M, van den Bent M, Hopkins K, Tonn JC, Stupp R, Falini A, et al. EANO guideline for the diagnosis and treatment of anaplastic gliomas and glioblastoma. *Lancet Oncol.* 2014;15(9):e395-403.
13. Network NCC. Gliomas (GLIO-1). *Central Nervous System Cancers. U.S.A.*2019. p. GLIO1-5.
14. Yen KE, Bittinger MA, Su SM, Fantin VR. Cancer-associated IDH mutations: biomarker and therapeutic opportunities. *Oncogene.* 2010;29(49):6409-17.
15. Vanan MI, Underhill DA, Eisenstat DD. Targeting Epigenetic Pathways in the Treatment of Pediatric Diffuse (High Grade) Gliomas. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):274-83.
16. Venneti S, Santi M, Felicella MM, Yarilin D, Phillips JJ, Sullivan LM, et al. A sensitive and specific histopathologic prognostic marker for H3F3A K27M mutant pediatric glioblastomas. *Acta Neuropathol.* 2014;128(5):743-53.



17. Lu VM, Alvi MA, McDonald KL, Daniels DJ. Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. *J Neurosurg Pediatr.* 2018;23(3):308-16.
18. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.* 2012;124(3):439-47.
19. Buczkowicz P, Bartels U, Bouffet E, Becher O, Hawkins C. Histopathological spectrum of paediatric diffuse intrinsic pontine glioma: diagnostic and therapeutic implications. *Acta Neuropathol.* 2014;128(4):573-81.
20. Castel D, Philippe C, Calmon R, Le Dret L, Truffaux N, Boddaert N, et al. Histone H3F3A and HIST1H3B K27M mutations define two subgroups of diffuse intrinsic pontine gliomas with different prognosis and phenotypes. *Acta Neuropathol.* 2015;130(6):815-27.
21. Korshunov A, Ryzhova M, Hovestadt V, Bender S, Sturm D, Capper D, et al. Integrated analysis of pediatric glioblastoma reveals a subset of biologically favorable tumors with associated molecular prognostic markers. *Acta Neuropathol.* 2015;129(5):669-78.
22. Karremann M, Gielen GH, Hoffmann M, Wiese M, Colditz N, Warmuth-Metz M, et al. Diffuse high-grade gliomas with H3 K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. *Neuro Oncol.* 2018;20(1):123-31.
23. Meyronet D, Esteban-Mader M, Bonnet C, Joly MO, Uro-Coste E, Amiel-Benouaich A, et al. Characteristics of H3 K27M-mutant gliomas in adults. *Neuro Oncol.* 2017;19(8):1127-34.
24. Kleinschmidt-DeMasters BK, Mulcahy Levy JM. H3 K27M-mutant gliomas in adults vs. children share similar histological features and adverse prognosis. *Clin Neuropathol.* 2018;37 (2018)(2):53-63.
25. Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH. The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. With particular reference to bronchogenic carcinoma. *Cancer.* 1948;1(4):634-56.
26. Nayak L, DeAngelis LM, Brandes AA, Peereboom DM, Galanis E, Lin NU, et al. The Neurologic Assessment in Neuro-Oncology (NANO) scale: a tool to assess neurologic function for integration into the Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) criteria. *Neuro-Oncology.* 2017;19(5):625-35.
27. Hu X, Fang Y, Hui X, Jv Y, You C. Radiotherapy for diffuse brainstem glioma in children and young adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016(6):CD010439.
28. Kaley T, Touat M, Subbiah V, Hollebecque A, Rodon J, Lockhart AC, et al. BRAF Inhibition in BRAF(V600)-Mutant Gliomas: Results From the VE-BASKET Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2018;36(35):3477-+.
29. Brown NF, Carter T, Kitchen N, Mulholland P. Dabrafenib and trametinib in BRAFV600E mutated glioma. *CNS Oncol.* 2017;6(4):291-6.
30. Hyder DJ, Sung L, Pollack IF, Gilles FH, Yates AJ, Davis RL, et al. Anaplastic mixed gliomas and anaplastic oligodendroglioma in children: results from the CCG 945 experience. *J Neurooncol.* 2007;83(1):1-8.
31. Chan JL, Lee SW, Fraass BA, Normolle DP, Greenberg HS, Junck LR, et al. Survival and failure patterns of high-grade gliomas after three-dimensional conformal radiotherapy. *J Clin Oncol.* 2002;20(6):1635-42.
32. Terezakis S. Target volume delineation for pediatric cancers. 1. 1st ed2018.

33. Shrieve DC, Wara WM, Edwards MS, Sneed PK, Prados MD, Cogen PH, et al. Hyperfractionated radiation therapy for gliomas of the brainstem in children and in adults. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 1992;24(4):599-610.
34. Hu J, Western S, Kesari S. Brainstem Glioma in Adults. *Front Oncol.* 2016;6:180.
35. Demaria S, Formenti SC. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Front Oncol.* 2012;2:95.
36. Packer RJ. Primary Central Nervous System Tumors in Children. *Curr Treat Options Neurol.* 1999;1(5):395-408.
37. Stupp R, Dietrich PY, Ostermann Kraljevic S, Pica A, Maillard I, Maeder P, et al. Promising survival for patients with newly diagnosed glioblastoma multiforme treated with concomitant radiation plus temozolomide followed by adjuvant temozolomide. *J Clin Oncol.* 2002;20(5):1375-82.
38. Cohen KJ, Pollack IF, Zhou T, Buxton A, Holmes EJ, Burger PC, et al. Temozolomide in the treatment of high-grade gliomas in children: a report from the Children's Oncology Group. *Neuro Oncol.* 2011;13(3):317-23.
39. Wolff JE, Gnekow AK, Kortmann RD, Pietsch T, Urban C, Graf N, et al. Preradiation chemotherapy for pediatric patients with high-grade glioma. *Cancer.* 2002;94(1):264-71.
40. Lashford LS, Thiesse P, Jouvet A, Jaspan T, Couanet D, Griffiths PD, et al. Temozolomide in malignant gliomas of childhood: a United Kingdom Children's Cancer Study Group and French Society for Pediatric Oncology Intergroup Study. *J Clin Oncol.* 2002;20(24):4684-91.
41. Fernandez A. Experiencia del manejo de Radioterapia en pacientes pediátricos de la Unidad de Radioterapia de centro médico S XXI. Hospital de oncología, ciudad de México: U.N.A.M.; 2014.
42. Mackay A, Burford A, Carvalho D, Izquierdo E, Fazal-Salom J, Taylor KR, et al. Integrated Molecular Meta-Analysis of 1,000 Pediatric High-Grade and Diffuse Intrinsic Pontine Glioma. *Cancer Cell.* 2017;32(4):520-37 e5.
43. Hochart A, Escande F, Rocourt N, Grill J, Koubi-Pick V, Beaujot J, et al. Long survival in a child with a mutated K27M-H3.3 pilocytic astrocytoma. *Ann Clin Transl Neurol.* 2015;2(4):439-43.
44. Wu G, Diaz AK, Paugh BS, Rankin SL, Ju B, Li Y, et al. The genomic landscape of diffuse intrinsic pontine glioma and pediatric non-brainstem high-grade glioma. *Nat Genet.* 2014;46(5):444-50.
45. Weinberg DN, Allis CD, Lu C. Oncogenic Mechanisms of Histone H3 Mutations. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2017;7(1).
46. Lulla RR, Saratsis AM, Hashizume R. Mutations in chromatin machinery and pediatric high-grade glioma. *Sci Adv.* 2016;2(3):e1501354.
47. Mackay A, Burford A, Molinari V, Jones DTW, Izquierdo E, Brouwer-Visser J, et al. Molecular, Pathological, Radiological, and Immune Profiling of Non-brainstem Pediatric High-Grade Glioma from the HERBY Phase II Randomized Trial. *Cancer Cell.* 2018;33(5):829-42 e5.
48. Jiang H, Yang K, Ren X, Cui Y, Li M, Lei Y, et al. Diffuse midline glioma with H3 K27M mutation: a comparison integrating the clinical, radiological, and molecular features between adult and pediatric patients. *Neuro-Oncology.* 2019.
49. Wang L, Li Z, Zhang M, Piao Y, Chen L, Liang H, et al. H3 K27M-mutant diffuse midline gliomas in different anatomical locations. *Human Pathology.* 2018;78:89-96.

50. Demaria S, Formenti SC. Role of T lymphocytes in tumor response to radiotherapy. *Frontiers in oncology*. 2012;2:95-.
  51. Landolfi JC, Thaler HT, DeAngelis LM. Adult brainstem gliomas. *Neurology*. 1998;51(4):1136-9.
  52. Huang TY, Piunti A, Lulla RR, Qi J, Horbinski CM, Tomita T, et al. Detection of Histone H3 mutations in cerebrospinal fluid-derived tumor DNA from children with diffuse midline glioma. *Acta Neuropathol Commun*. 2017;5.
  53. Stallard S, Savelieff MG, Mullan B, Miklja Z, Bruzek A, Garcia T, et al. Csf H3F3A K27M Circulating Tumor Dna Copy Number Quantifies Tumor Growth And Treatment Response. *Neuro-Oncology*. 2018;20:209-10.
  54. Stallard S, Savelieff MG, Wierzbicki K, Mullan B, Miklja Z, Bruzek A, et al. CSF H3F3A K27M circulating tumor DNA copy number quantifies tumor growth and in vitro treatment response. *Acta Neuropathol Commun*. 2018;6:4.
- \*\* DNeasy Blood & Tissue Handbook 2013. New York QIAGEN Inc. pp15-9.

**ANEXO1**

**INSTRUMENTO DE RECOLECCIÓN**

HOJA RECOLECCIÓN (INSTRUMENTO)

FOLIO:

**PROTOCOLO: PROGRESIÓN TUMORAL Y ESTADO FUNCIONAL POSTERIOR A RADIOTERAPIA EN PACIENTES PEDIÁTRICOS Y ADULTOS JÓVENES CON GLIOMAS DE LÍNEA MEDIA CON LA MUTACIÓN H3F3A K27M.**

NOMBRE PACIENTE:

NSS:

EDAD:

RESIDENCIA:

CLINICA (DESCRIBA):

KARNOFSKY INICIAL:

DX PATOLOGICO:      FECHA DE CAPTURA:

-FECHA DE PRIMER ESTUDIO RM ANATOMICO Y FUNCIONAL/  
DIAGNOSTICO (DESCRIBA):

TIPO DE TRATAMIENTOS:

NEOADYUVANTE Y CUAL:

-FECHA DE CIRUGIA:      TIPO DE CIRUGÍA:

ADYUVANTE, CUAL?:

ESQUEMA DE QUIMIOTERAPIA (DESCRIPCIÓN):

DOSIS TOTAL DE RADIOTERAPIA Y TECNOLOGIA:

KARNOFSKY POSTERIOR A RADIOTERAPIA:

-DOSIMETRIA:

IC=\_\_\_ IH=\_\_\_ DMAX=\_\_\_

IMAGEN DE CONTROL POSTERIOR 3,6,9 12MESES POSTERIOR A RADIOTERAPIA ( ESPECIFIQUE FECHA, TIPO DE ESTUDIO Y CON PARAMETROS EN CASO DE ESTUDIO):

HALLAZGOS:

\*3 MESES, CONTROL TUMORAL (EANO/RANO):

\*6 MESES:

\*9 MESES:

\*12 MESES:

PERÍODO LIBRE DE PROGRESIÓN (MESES)=

DETERMINACION DE MUTACION: ENCIERRE

H3F3A K27M : PRESENTE [ ] AUSENTE [ ]

DETERMINACIÓN SEMICUANTITATIVA DE IHQ: REPORTE POR SISTEMA

APERIO +=1

++=2

+++= 3

ANEXO2

**KARNOFSKY, 1984.**

<b>100</b>	Normal, no complaints, no evidence of disease
<b>90</b>	Able to carry on normal activity
<b>80</b>	Normal activity with effort
<b>Unable to work, able to live at home cares for most personal needs, a varying amount of assistance is needed</b>	
<b>70</b>	Cares for self, unable to carry on normal activity or to do active work
<b>60</b>	Requires occasional assistance but is able to care for most needs
<b>50</b>	Requires considerable assistance and frequent medical care
<b>Unable to care for self, requires equivalent of institutional or hospital care, disease may be progressing rapidly</b>	
<b>40</b>	Disabled, requires special care and assistance
<b>30</b>	Severely disabled, hospitalization indicated, although death not imminent
<b>20</b>	Very sick, hospitalization necessary
<b>10</b>	Moribund, fatal process progressing rapidly

## ANEXO 3

### EANO/RANO

---

#### CR

Disappearance of all enhancing measurable and nonmeasurable disease sustained for a minimum of 4 weeks  
Stable or improved FLAIR/T2-weighted lesions  
No new lesions  
Stable or improved clinically  
Patients cannot be receiving corticosteroids (physiologic replacement doses are acceptable)

#### PR

≥50% decrease (compared with baseline) in the sum of products of perpendicular diameters of all measurable enhancing lesions sustained for a minimum of 4 weeks  
No progression of nonmeasurable disease  
No new lesions  
Stable or improved FLAIR/T2-weighted lesions  
Stable or improved clinically  
Corticosteroid dosage at the time of the scan should be no greater than the dosage at the time of the baseline scan

#### SD

Patient does not qualify for CR, PR, or progression  
Stable FLAIR/T2-weighted lesions on a corticosteroid dose no greater than at baseline  
Stable clinically

#### PD

≥25% increase in sum of the products of perpendicular diameters of all measurable enhancing lesions compared with the smallest tumor measurement obtained either at baseline or best response following the initiation of therapy, while on a stable or increasing dose of corticosteroids  
Significant increase in FLAIR/T2-weighted lesions compared with baseline or best response following initiation of therapy, not caused by comorbid events (e.g., radiation therapy, ischemic injury, seizures, postoperative changes, other treatment effects), while on a stable or increasing dose of corticosteroids  
New lesions  
Clinical deterioration not attributable to other causes apart from the tumor (e.g., seizures, medication side effects, complications of therapy, cerebrovascular events, or infection) or decreases in corticosteroid dose  
Failure to return for evaluation owing to death or deteriorating condition  
Clear progression of nonmeasurable disease

---

response; SD=Stable disease; PD=Progressive disease; FLAIR=Fluid-attenuated inversion-recovery