



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS,
ODONTOLÓGICAS Y DE LA SALUD
CAMPO DISCIPLINARIO CIENCIAS MÉDICAS
CAMPO DEL CONOCIMIENTO PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

EXPRESIÓN DE ANO2, DISC1, ARHGAP18, GMR8 Y PRDM6 EN
MEDULOBLASTOMAS PEDIÁTRICOS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:
ALAN IRVING VICENTEÑO LEÓN

TUTORA
MARÍA DEL PILAR EGUÍA AGUILAR
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., MAYO DE 2023



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.

Índice

Antecedentes.....	6
Planteamiento del problema.....	23
Pregunta de investigación	24
Justificación.....	24
Hipótesis.....	25
Objetivos.....	25
Metodología.....	26
Análisis de los datos.....	41
Consideraciones éticas.....	41
Resultados.....	42
Discusión.....	48
Conclusiones	51
Alcances del estudio.....	52
Limitaciones del estudio.....	52
Referencias.....	54
Anexos.....	63

Resumen estructurado

Antecedentes: Los meduloblastomas se dividen en al menos cuatro grupos moleculares reconocidos por la Organización Mundial de la Salud: Wingless (WNT), Sonic-hedgehog (SHH), grupo 3 (G3) y grupo 4 (G4), los cuales poseen características genéticas distintivas que se correlacionan con variables clínico-patológicas y, actualmente, se considera que clasificar a los pacientes de acuerdo con el origen molecular es la mejor manera de asegurar acceso a terapias potencialmente eficaces.

En los países con recursos económicos limitados, uno de los principales retos de dicha clasificación es poder identificar marcadores moleculares útiles y asequibles en la práctica anatomopatológica rutinaria. Especialmente entre los grupos 3 y 4, los cuales presentan características citogenéticas que han llevado a agruparlos en la categoría provisional “no WNT/SHH”. No obstante, la relevancia de la distinción entre G3 y G4 se manifiesta cuando se considera que la supervivencia a cinco años de los pacientes del grupo 3 oscila entre 20 y 50%, mientras que en el grupo 4 lo hace entre 40 y 95%.

Este trabajo estudió cinco genes referidos en la literatura como posibles marcadores que permitan distinguir entre los cuatro grupos principales y específicamente entre G3 y G4.

Objetivo: Determinar si la expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* permite diferenciar entre los grupos moleculares de los meduloblastomas pediátricos y, posteriormente, evaluar si la expresión de dichos genes permite discernir entre G3 y G4.

Material y métodos: Se incluyeron 84 muestras de pacientes diagnosticados con meduloblastomas en dos instituciones de tercer nivel en la Ciudad de México: 6 del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI del IMSS, y 78 del Hospital Infantil de México Federico Gómez.

Se trabajó con 13 muestras de tejido congelado y 71 de tejido fijado en formol e incluido en parafina obtenidas entre los años 2000 y 2022. Para la clasificación en los cuatro grupos moleculares se realizaron ensayos RT-qPCR y agrupamiento jerárquico no supervisado con base en el panel de genes de Northcott y colaboradores 2012.

Se descartó la distribución normal de los valores de expresión de los cinco genes evaluados y se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para identificar si existían diferencias significativas

entre los cuatro grupos moleculares. Finalmente, se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para comparar las diferencias de expresión entre los grupos 3 y 4.

Resultados: La clasificación molecular de las 84 muestras fue: 8 WNT, 27 SHH, 18 G3 y 31 G4.

Al comparar entre los cuatro subgrupos, la expresión de los cinco genes en estudio mostró diferencias estadísticas: Kruskal-Wallis con $p < 0.0001$, $p < 0.0319$, $p < 0.0016$, $p < 0.0060$ y $p < 0.0001$ para *ANO2*, *ARHGAP18*, *DISC1*, *GRM8* y *PRDM6* respectivamente.

Sin embargo, sólo *DISC1*, *PRDM6* y *GRM8* expresaron diferencias significativas para distinguir entre los grupos 3 y 4, U de Mann-Whitney con $p = 0.0093$, $p = 0.0003$ y $p = 0.0303$, respectivamente.

Discusión: El abordaje clínico efectivo de los meduloblastomas no puede realizarse sin el conocimiento de su biología molecular. Las causas genéticas que dan origen a los meduloblastomas han sido reconocidas en los grupos WNT y SHH, pero aún hay casos heterogéneos que plantean retos. A pesar de las múltiples propuestas sobre cómo dividir al grupo no WNT/no SHH, al momento la distinción G3 y G4 es la opción preferible para desarrollar estudios que pudieran establecer el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes.

La sobreexpresión de *GRM8* y *PRDM6* como marcadores de G4 vs G3 concuerda con los principales estudios en el meduloblastoma. Este es el primer estudio que evalúa la expresión de *DISC1* en meduloblastomas y que refiere sobreexpresión en el G4 en comparación con G3.

Conclusiones:

La expresión diferencial de cada uno de los genes evaluados, *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6*, es estadísticamente significativa para distinguir entre los cuatro grupos principales de meduloblastomas.

Se sustenta la posibilidad de distinguir entre los grupos 3 y 4 con base en la expresión de *DISC1*, *PRDM6* y *GRM8*.

Es necesario validar la expresión de las proteínas mediante inmunohistoquímica de los genes evaluados para poder aplicar la clasificación molecular en la práctica anatomopatológica rutinaria.

1. Antecedentes

Los meduloblastomas son las neoplasias cerebrales malignas más comunes en niños, representan hasta 30% de los casos^{1,2,3,4,5,6}. Se consideran tumores embrionarios y dentro de este rubro también son los más frecuentes de sistema nervioso, con hasta el 90 % de los casos⁷. Su incidencia se estima entre 5 y 6 casos por millón de niños y hasta 70% se diagnóstica en pacientes menores de 10 años^{3,4,6,8,9,10}.

Se consideran de alto grado de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), grado 4/4, ya que, en general, a pesar de un tratamiento agresivo hasta 30% de los pacientes fallecen por la enfermedad y las secuelas del tratamiento afectan de forma considerable la calidad de vida de los supervivientes, principalmente secundario a déficits neurológicos permanentes^{3,4,6,8,9,11}

En el año 2007, la OMS describió cinco patrones histológicos, sin embargo, en la clasificación del 2016 se modificó a cuatro patrones: el clásico, el desmoplásico/nodular, el de extensa nodularidad y el anaplásico/células grandes^{2,6,9,10,11,12,13}. Al inicio, cada patrón microscópico se correlacionó con ciertas variables clínicas, no obstante, la correspondencia pronóstica no es constante.

Mediante técnicas genómicas, en el año 2002 se demostró que existen grupos moleculares con expresiones genéticas distintas, los cuales tienen mayor correlación pronóstica que los criterios histológicos o clínicos^{14,15}. Con base en ello, el Grupo de Trabajo Internacional en Meduloblastoma definió en el año 2010 cuatro grupos moleculares^a: Wingless (WNT), Sonic Hedgehog (SHH), grupo 3 y grupo 4, cada uno de ellos con características genéticas, correlación demográfica, clínica y pronóstica específicas^{10,14,16,17,18}.

A partir del año 2015 la OMS reconoció a dichos grupos como entidades biológicas distintas y las introdujo dentro de la clasificación de tumores del SNC 2016⁵. La importancia de tal hecho radica en que actualmente la clasificación molecular es el mejor indicador pronóstico en la evaluación tanto de la supervivencia global como de la supervivencia libre de recurrencias¹⁹.

^a En la literatura suele referirse al término “subgrupo molecular”, sin embargo, para este trabajo se utilizará el término “grupo molecular”.

1.1 Grupos moleculares

La clasificación 2021 de los tumores del Sistema Nervioso Central de la OMS, considera los siguientes grupos moleculares de los meduloblastomas²⁰:

- WNT activado.
- SHH activado con mutación *p53*.
- SHH activado con *p53* silvestre.
- No WNT/SHH.

Los grupos WNT y SHH hacen referencia a la vía molecular alterada, mientras que la categoría provisional “no WNT/SHH” integra a los grupos 3 y 4, nombrados de forma genérica porque se desconoce la vía de lesión¹⁷.

A pesar de que la OMS acepta la categoría no WNT/SHH, también reconoce que la distinción G3 y G4 puede hacerse mediante técnicas de metilación o perfiles de expresión de RNA, e insta a continuar con el estudio molecular de ambos grupos ya que, en conjunto, el grupo no WNT/SHH alberga entre 50 y 70% de los casos pediátricos y las diferencias pronósticas según el grupo son significativas^{6,8}.

Grupo WNT

Representa de 10 a 15% de los casos ^{6,8,10,17}, afecta por igual a ambos sexos^{6,10,14,15} y; comúnmente, los pacientes tienen entre 7 y 14 años^{6,8}.

Casi todos los tumores con activación de esta vía presentan histología clásica, raramente se han reportado casos con morfología anaplásica y la variante desmoplásica nodular no se presenta⁶.

La activación de la vía WNT puede demostrarse con la acumulación nuclear de β -catenina (fig. 1), a diferencia de los otros tipos de meduloblastomas que, aunque pueden presentar algún grado de inmunorreactividad para β -catenina, suele ser citoplasmática. Hasta 90% de los casos presentan monosomía del cromosoma 6 y/o variantes patogénicas en el exón 3 del gen *CTNNB1*. Otros genes con variantes patogénica son *DDX3X* (36-50% de los casos),

SMARCA4 (19-26.3%), *TP53* (12.5-14%), *CSNK2B* (14%), *KMT2D* (12.5%), *PIK3CA* (11%) y *EPHA7* (8%)^{2,4,6,8,10,15,21}.

En este grupo la mutación en *TP53* no confiere mal pronóstico^{8,10} y no suelen encontrarse amplificaciones de *MYC* y *N-MYC*, al grado que su presencia puede hacer sospechar de un error en la clasificación molecular⁸.

Las metástasis son infrecuentes⁵ y el pronóstico de los pacientes menores de 16 años es favorable, pudiendo alcanzar una supervivencia superior a 95% a los 5 años^{3,5,6,12,17,18}. Se refiere que aún los pacientes con histología de células grandes/anaplásicas mantienen el buen pronóstico de este grupo¹⁷. Sin embargo, los pacientes mayores de 16 años suelen tener un pronóstico intermedio⁵ y los adultos un peor pronóstico¹².

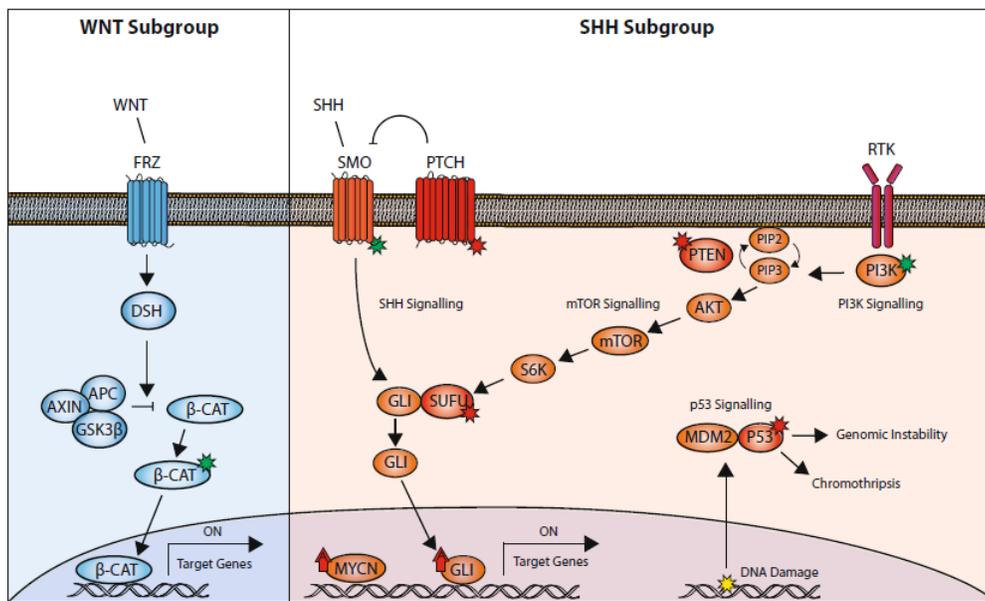


Figura 1. Alteraciones en la regulación en la vía WNT produce la acumulación nuclear de la β -catenina, que promueve la transcripción de genes que regulan procesos como la apoptosis, proliferación y adhesión celular. En la vía SHH, el ligando SHH se une a SMO y activa al factor de transcripción GLI en los cilios primarios, por su parte PTCH tiene como función inhibir a SMO. El aumento en la actividad de los factores que componen la vía ya sea por mutaciones de activación (asterisco verde) o inactivación (asterisco rojo) genera aumento en la transcripción. En ocasiones la vía PI3K/mTOR también se encuentra alterada y coopera con la vía SHH²². (tomado de Skowron P, Ramaswamy V & Taylor M, 2015).

Grupo SHH

Representa entre 25 y 30% de los casos y afecta a todos los grupos de edad, pero se presenta preferentemente en una distribución bimodal, primero en infantes^b y posteriormente en niños mayores de 16 años^{6,8,10,11,14,15}.

Todas las variantes histológicas pueden ocurrir en este grupo, pero más de 50% corresponde a la variante desmoplásico/nodular, seguida del patrón clásico y en tercer lugar la variante de células grandes/anaplásicas⁸.

Las principales mutaciones que activan la vía SHH ocurren en los genes *PTCHI* (43% de los pacientes), *TERT* (39%), *SUFU* (10%) y *SMO* (9%), además se suelen presentar deleciones en *PTEN* y amplificaciones de *GLI-1* o 2 (9%) y *N-MYC* (7%) (fig. 1)^{4,6,8,10,11,14,15,21}.

Las alteraciones citogenéticas más comunes son las pérdidas del 9q y 10q, lo que deriva en pérdida de la heterocigocidad de *PTCHI* (9q22) y *SUFU* (10q24), ambos reguladores negativos de la vía SHH^{4,14}.

El pronóstico general de la variante SHH se aproxima a 70%¹⁵ a los cinco años, pero está influido por la presencia de la mutación en el gen *TP53*⁶. A pesar de que *TP53* puede estar mutado también en el grupo WNT, sólo en el grupo SHH tiene correlación pronóstica¹⁸; por lo que este grupo molecular se divide en dos subclases reconocidas por la OMS:

Grupo SHH con *TP53* silvestre

Ocurre en pacientes menores de 4 años, adolescentes o adultos jóvenes⁶. Se puede asociar a mutaciones somáticas o germinales con regulación negativa de los genes *PTCHI* o *SUFU*, activación somática de mutaciones en *SMO* o, raramente, amplificación de *GLI-2*⁶. El pronóstico de supervivencia se describe entre 76 y 80% a cinco años^{8,18}.

^b En este trabajo, la categoría “infante” corresponde a niños menores de 3 años y la categoría “niñez” comprende entre los 3 y 10 años.

Grupo SHH con mutación en TP53

Es una variante rara que ocurre aproximadamente en 20% de los casos SHH y afecta a niños entre 4 y 17 años^{6,21}. Hasta 66% de los casos corresponde a histología de células grandes/anaplásicas, en comparación con menos de 10% en los casos con *TP53* silvestre⁶.

La pérdida del cromosoma 17p, las amplificaciones de *GLI-2* o *NMYC*, y la ausencia de mutaciones en *PTCH1*, *SUFU* y *SMO* se asocian a la mutación en *TP53*^{6,8,18}.

A pesar de que los meduloblastomas SHH suelen presentar menor frecuencia de metástasis que otros grupos, la variante *TP53* mutante puede presentar implantes en el neuroaxis⁶. En adición, la mutación *TP53* puede presentarse en casos de recaídas tumorales aun cuando el tumor primario pertenecía al grupo SHH con *TP53* silvestre⁶.

La mutación en *TP53* se asocia con cromotripsis y confiere un mal pronóstico, con disminución de la supervivencia a 40% a cinco años^{6,8,18}.

Grupo 3 (G3)

Ocurre aproximadamente en 25-30% de los meduloblastomas y afecta principalmente a niños entre tres y cinco años, en quienes puede representar hasta 45% de los casos^{6,8,9,14,15,23}.

Las alteraciones presentes en este grupo son el isocromosoma 17q (40-60% de los casos), la ganancia de los cromosomas 1q y 7 o la pérdida de los cromosomas 8, 10q y 16q, la activación de *GFI1A/GFI1B*, las amplificaciones de *MYC* (17-25% de los casos), *OTX2* (7.7%) y *N-MYC* (5%), así como, las mutaciones en *SMARCA4* (10.5%), *KBTBD4* (6%), *CTDNEP1* (5%), *KMT2D* (5%) y *LRP1B* (4.6%)^{2,4,6,8,11,15,19}.

En general, las metástasis al momento del diagnóstico llegan a presentarse hasta en 40% de los casos y las recurrencias tumorales son frecuentes, especialmente mediante diseminación metastásica con el lecho tumoral primario libre de lesión^{6,11,14}.

Usualmente, este grupo es refractario a la terapia multimodal y la supervivencia global reportada a cinco años va de 20 a 50%¹⁴, de acuerdo con la presencia o no de algunos factores de mal pronóstico, entre ellos: la histología anaplásica/células grandes, la enfermedad

metastásica, la presencia del isocromosoma 17q y la amplificación de *MYC*, en este último caso la supervivencia disminuye hasta ser de 20%^{4,6,8,11,15,24}.

Grupo 4 (G4)

Es el más frecuente de todos, entre 35 y 40% de los casos^{6,10,11,14,16}. El pico de incidencia es en la niñez tardía y la adolescencia, entre los 5 y 15 años, siendo poco frecuente en infantes^{6,8,10,11}.

A pesar de ser el grupo más común, sus características biológicas son de las menos detalladas^{11,17}. No obstante, las alteraciones citogenéticas identificadas hasta en 80% de los casos involucran al cromosoma 17: delección 17p, ganancia 17q o combinación de ambas en forma de 17q isodicéntrico; también se ha asociado con la pérdida del cromosoma 11, mientras que las mutaciones más frecuentes ocurren en *PRDM6* (17% de los casos), *KDM6A* (13%), *SNCAIP* (10.4%), *N-MYC* (5-10%), *GFI1/GFI1B* (5-10%), *KMT2C* (6%), *KBTBD4* (6%), *OTX2* (6%), *CDK6* (6%) y *ZMYM3* (6%)^{3,5,6,11,15,19,25}.

La supervivencia a cinco años puede llegar a ser de hasta 95%¹⁷, aunque en general el pronóstico es intermedio entre los grupos WNT y el grupo 3. La supervivencia a cinco años puede ensombrecerse en los casos metastásicos, que llegan a ser de hasta 40% al momento del diagnóstico. A diferencia del grupo 3, los pacientes con isocromosoma 17 o con pérdida del cromosoma 11 presentan un pronóstico favorable^{5,18}. Las recurrencias suelen deberse a diseminación tumoral con sitio primario libre^{5,6,10,12}.

La figura 2 resume algunas características genéticas, correlación demográfica, clínica y pronóstica específicas por grupo molecular.

Subgroup		WNT		SHH				Group 3			Group 4		
Subtype		WNT α	WNT β	SHH α	SHH β	SHH γ	SHH δ	Group 3α	Group 3β	Group 3γ	Group 4α	Group 4β	Group 4γ
Subtype proportion													
Subtype relationship													
Clinical data	Age												
	Histology			LCA Desmoplastic	Desmoplastic	MBEN Desmoplastic	Desmoplastic						
	Metastases	8.6%	21.4%	20%	33%	8.9%	9.4%	43.4%	20%	39.4%	40%	40.7%	38.7%
	Survival at 5 years	97%	100%	69.8%	67.3%	88%	88.5%	66.2%	55.8%	41.9%	66.8%	75.4%	82.5%
Copy number	Broad	6 ⁻		9q ⁺ , 10q ⁺ , 17p ⁺		Balanced genome		7 ⁺ , 8 ⁺ , 10 ⁺ , 11 ⁺ , 117q			7q ⁺ , 8p ⁺ , 117q		
	Focal			MYCN amp, GLI2 amp, YAP1 amp		PTEN loss		10q22 ⁻ , 11q23.3 ⁻			MYCN amp, CDK6 amp		
Other events				TP53 mutations				High GF11/1B expression					

Age (years): 0-3 >3-10 >10-17 >17

Figura 2. Grupos moleculares de los meduloblastomas: clínica, histología, alteraciones en el número de copias, vías de señalización y metilación de ADN (tomada de Cavalli F, Remke M, Rampasek L et al., 2017).

Múltiples estudios han demostrado que los grupos 3 y 4 comparten características citogenéticas que se traslapan y que se traducen en dificultades para su diferenciación, causando falta de consenso en cuanto a los métodos diagnósticos, por lo que la OMS 2021 los continúa integrando en la categoría provisional “no WNT/SHH”^{5,6,8,10,26, 27}.

Por otro lado, las propuestas de clasificación del grupo no WNT/SHH han incluido trabajos como el de Lastowska y colaboradores (2018) que consideraron dividirlo en tres grupos: G3, grupo intermedio G3/G4 y G4, de acuerdo con el patrón transcripcional que obtuvieron²⁸. No obstante el consenso es considerar dos grupos: G3 y G4.

1.2 Expresión de genes

El primer método descrito para la clasificación molecular de los meduloblastomas se basó en la tecnología Nanostring N-Counter. Mediante dicha técnica, en el año 2012, Northcott y colaboradores desarrollaron un panel rápido, validado y reproducible de expresión génica que pudo clasificar los meduloblastomas en los cuatro grupos moleculares (Anexo 1)²⁹.

Utilizando entre cinco y seis genes específicos para cada grupo molecular, crearon un panel de 22 genes que demostró una precisión de 97% en la clasificación de una cohorte original de 101 casos comparada mediante arreglos de expresión. Dicho panel fue validado en tres cohortes internacionales independientes (n=130) con concordancia de 98% (127/130), sin reconocerse el motivo de la falla en los tres casos erróneos.

En 2018, Leal y colaboradores reprodujeron dicho panel y método en una corte brasileña de 104 muestras en donde 100% fue clasificable³⁰.

Las ventajas del método NanoString N-Counter son que distingue entre los cuatro grupos moleculares y que puede utilizar tejido fijado en formol e incluido en parafina, pero las principales desventajas son la variabilidad en las plataformas de perfiles de transcripción al comparar las bases de datos⁸, que la efectividad disminuye de forma proporcional a los años de almacenamiento de la muestra en bloques de parafina y, además, a pesar de referirse como un método más económico en comparación con la metilación, la adquisición del equipo es elevada.

Por ello, Kunder y colaboradores realizaron en 2013 un estudio en el que utilizaron RT-PCR para validar la expresión diferencial de 12 genes (derivados del panel de Northcott y colaboradores) y 9 microRNAs en la clasificación molecular de los cuatro grupos de meduloblastomas y obtuvieron una eficacia global de 97% en una muestra de 103 casos, con una eficiencia específica por grupo de 100%, 93.3%, 85.7% y 100% en los grupos WNT, SHH, 3 y 4, respectivamente. El grupo de genes y miRNA fue validado contra un grupo de 34 meduloblastomas clasificado previamente mediante NanoString³¹.

Por su parte, en 2019, Cruzeiro y colaboradores redujeron el panel original de Northcott y cols. a uno de 20 genes, a partir del cual clasificaron una muestra brasileña de 92 meduloblastomas en los cuatro grupos moleculares mediante arreglos de baja densidad Taqman. Para probar el panel utilizaron los 763 casos de meduloblastomas del estudio de Cavalli y colaboradores (2017) y posteriormente validaron el panel comparando los resultados de 11 muestras aleatorias de la muestra brasileña mediante metilación de DNA³². La asignación grupal resultó efectiva en 94.29% de los casos WNT, en 99.1% de los casos SHH, en 92.36% de los casos del grupo 3 y en 95.4% de los casos del grupo 4³².

1.3 Subtipos moleculares

El avance continuo de la biología molecular ha permitido reconocer que no sólo entre los cuatro grupos moleculares previamente descritos existen diferencias notables, sino que también dentro de cada uno se presentan variaciones. En forma de consenso, dichas variantes se designan con letras griegas mientras que no sea demostrada la alteración específica^{3,8,17,19}.

De esta forma, en cada grupo hasta el año 2017 se había referido al menos 12 subtipos moleculares: WNT α , WNT β , SHH α , SHH β , SHH γ y SHH δ , Grupo 3 α , Grupo 3 β y Grupo 3 γ , Grupo 4 α , Grupo 4 β y Grupo 4 γ ^{29,33}.

Los subtipos de los grupos WNT y SHH se presentan en la figura 2. Respecto a los grupos 3 y 4, diferentes estudios han descrito que el grupo no WNT/SHH se divide en al menos entre 4 y 8 subtipos (fig. 3)³⁴.

Study	Medulloblastoma Group 3/4 Subtypes							
Northcott et al. (2017)	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
Schwalbe et al. (2017)	Grp3-HR			Grp3-LR	Grp4-LR			Grp4-HR
Cavalli et al. (2017)	G3- β G4- γ	G3- γ	G3- α		G4- α		G4- γ	G4- β

Figura 3. Subtipos moleculares del espectro grupo 3-4 descritos por tres grupos de estudio diferentes (tomada de Kumar R., Liu A. & Northcott P. 2019).

En 2019, Sharma y colaboradores realizaron un metaanálisis internacional mediante metilación de DNA de 1501 casos de los grupos 3 y 4 mediante el cual describieron un espectro de 8 subtipos (I a VIII) con correlación demográfica, histológica, clínica, molecular y de supervivencia específica (fig. 4). Asimismo, identificaron evidencia que apoya la subdivisión del subtipo VII en VII-A y VII-B³⁴.

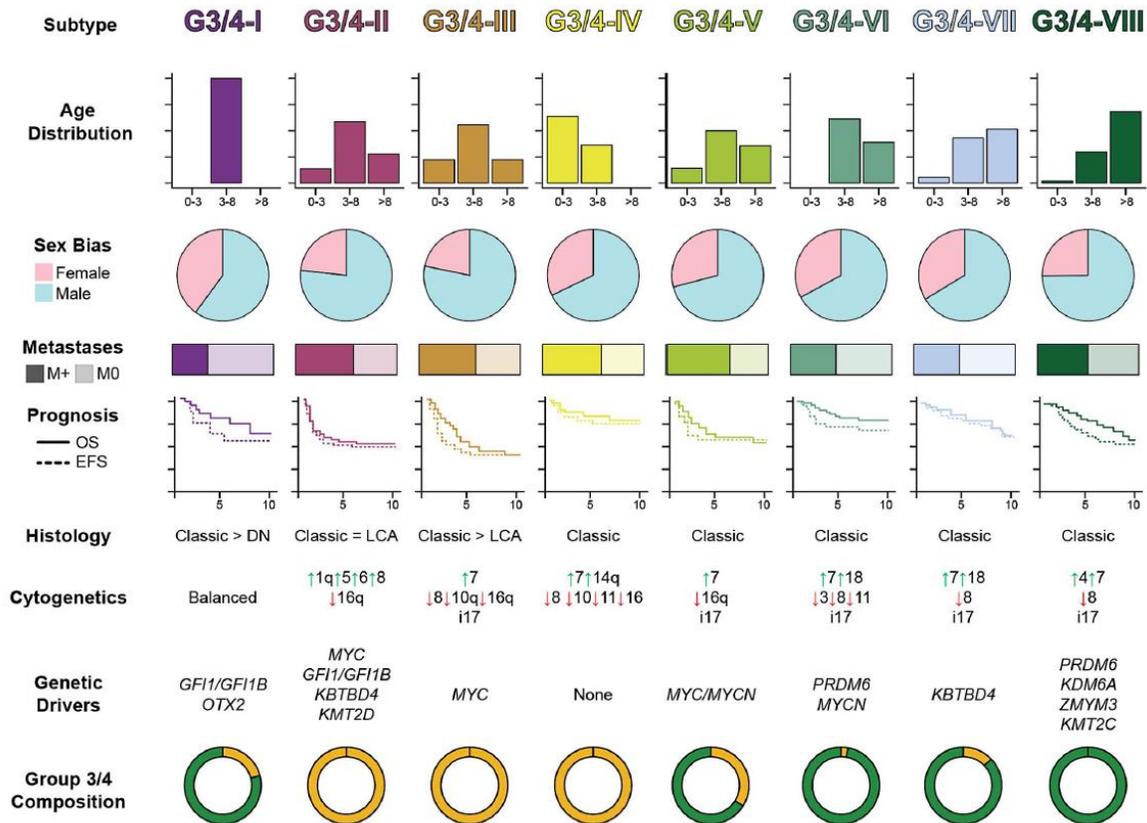


Figura 4. Subtipos moleculares descritos por Sharma y colaboradores, los cuales representan un continuo entre los grupos 3 y 4 (tomada de Kumar R., Liu A. & Northcott P. 2019).

El reconocimiento de los subtipos plantea la posibilidad de considerar que los cuatro grupos moleculares hasta ahora reconocidos sean simplificaciones de las verdaderas subestructuras moleculares^{29,33}. Al respecto, la OMS 2021 no ha fijado una postura tajante, pero sí reconoce su existencia. De hecho, considera al menos cuatro subtipos de SHH y ocho subtipos del grupo no WNT/SHH, algunos de los cuales podrían tener implicaciones clínicas, diagnósticas y pronósticas relevantes; respecto al grupo WNT no emite consideraciones para la subtipificación^{26,35}.

1.4 Células de origen

Diversos estudios han referido que identificar mecanismos de inicio oncogénico en los meduloblastomas no ha sido efectivo porque las mutaciones somáticas que liderean la oncogénesis son raras. Por ello, otro abordaje se ha enfocado en los procesos de desarrollo

cerebelar, pues la evidencia ha mostrado vías genéticas comunes entre el desarrollo normal del cerebelo y la tumorigénesis de los meduloblastomas³⁶.

Las primeras descripciones de los meduloblastomas datan de la década de 1910, cuando se propuso que eran tumores derivados de precursores neuronales (neuroblastos). Una década más tarde, se postuló que procedían de una célula indiferenciada con capacidad de autorregeneración y de diferenciación neuronal y glial³⁵ denominada “meduloblasto”, la cual revestía el epéndimo del cuarto ventrículo^{8,9,10,37}, pero dicha célula no fue identificada.

Para la década de 1970 se refirió que se originaban de células indiferenciadas de la zona subependimaria y, posteriormente, se sugirió a las células granulares como el origen³⁷. No obstante, la evidencia actual propone que cada grupo molecular puede originarse de diferentes células^{38,39,40,41}.

El grupo más estudiado son los meduloblastomas SHH, que se postula derivan de progenitores de las células granulares, las cuales dependen de dicha vía para su expansión perinatal, sin embargo, también se han referido neoplasias derivadas de precursores de células en cepillo unipolares de edad comparable a los progenitores de las células granulares^{41, 42}. De hecho, se refiere que a pesar del uso extendido de modelos animales para evaluar los meduloblastomas SHH, no se ha podido recapitular completamente a los casos en infantes (subtipos SHH-1 y SHH-2 referidos en la OMS 2021²⁶), sugiriendo que la célula de origen aún no ha sido puntualmente identificada^{42,43}.

En cuanto al grupo WNT, se planteaba que derivaban de células del labio rómbico inferior, pero estudios posteriores, como el de Jessa y cols. (2019), refieren que son de origen extra-cerebelar, pues derivan de células del tronco encefálico dorsal embrionario^{41,44,45}.

Referente a las neoplasias del grupo no WNT/SHH, diferentes trabajos postulan que defectos en la diferenciación de células progenitoras en la zona ventricular y subventricular del labio rómbico durante distintas etapas del desarrollo intrauterino da origen a los meduloblastomas de los grupos 3 y 4 (fig. 5)^{39,44,46}.

Hooper y cols. (2014) refirieron que las células del grupo 3 semejan precursores neuronales entre las 10 y 15 semanas (fase del desarrollo pineal y de la retina), mientras que las del grupo 4 lo hacen de células entre las 20 y 30 semanas. Por lo que, se planteó que el grupo 3 podría

resultar de alteraciones en la diferenciación neuronal, mientras que el grupo 4 podría ser consecuencia de apoptosis asociada a falla en la regulación sináptica⁴⁶.

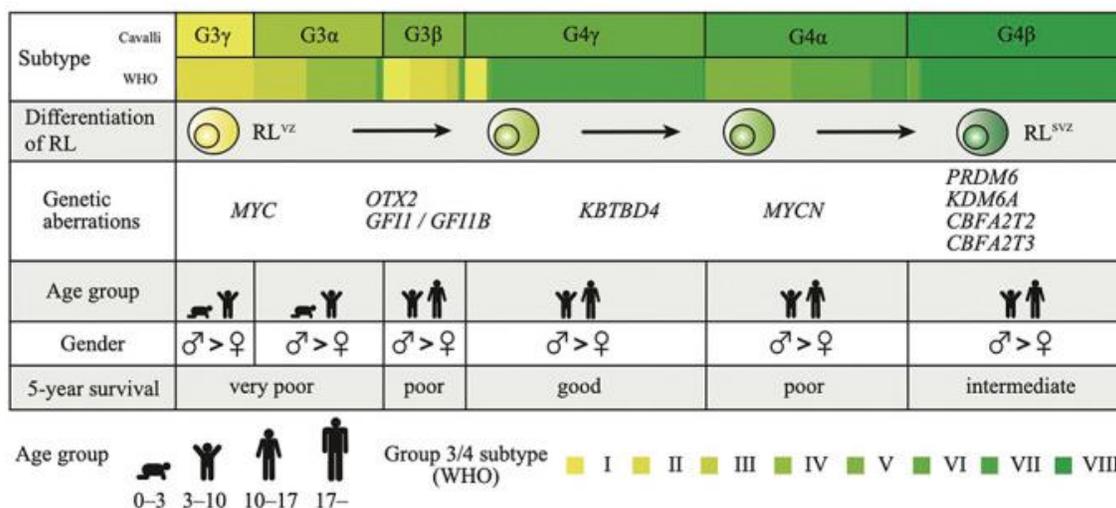


Fig. 5. Relación de la diferenciación de las células del labio róbico con el subtipo de meduloblastoma, tomando como referencia los grupos del espectro G3-G4 descritos por Cavalli y cols. (2017) y los VIII subtipos reconocidos por la OMS, basados en Nortcoth y cols. (2017). Tomada de Funakoshi y cols. (2022).

Mientras que Hendrikse y cols. (2022) reportaron que el grupo 3 deriva de una población temprana de células madre y el grupo 4 deriva de células en cepillo unipolares^{44,47}.

Por otro lado, Kool y colaboradores (2008) y Cho y colaboradores (2011) describieron marcadores de diferenciación neuronal y de diferenciación fotorreceptora como posibles características distintivas de los meduloblastomas noWNT/SHH^{48,49}.

Al respecto, Williamson y colaboradores (2022) refirieron que el grupo 3 expresa genes codificadores de proteínas fotorreceptoras, normalmente presentes en las células en cepillo unipolares, lo que indica que su expresión no es aberrante y que no está asociada a tumorigénesis⁴⁰. Mientras que el grupo 4 expresa genes asociados a factores de transcripción de linaje neuronal (neuronas glutamatérgicas)⁴⁰.

En dicho estudio, mediante secuenciación de RNA y metilación de 331 meduloblastomas, se concluyó que los grupos 3 y 4 no son entidades transcripcionales distintas, sino que representan un continuo entre dos extremos transcripcionales G3-G4⁴⁰. Tomando como referencia los 8 subtipos del espectro G3-G4 presentado por autores como Northcott y cols.

(2017) y Sharma y cols. (2019), la figura 6 muestra la distribución propuesta de dichos grupos entre los polos G3-G4.

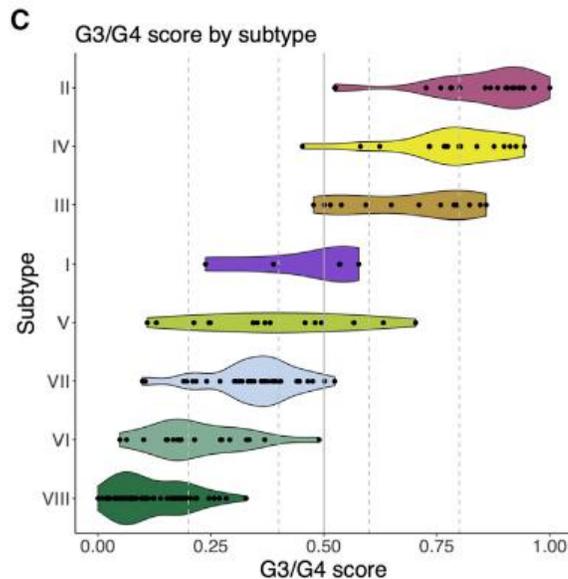


Fig. 6. La distribución entre 0 y 1 de los 8 subtipos descritos en el espectro G3-G4 refleja la proporción de expresión metagenética G3/G4, en donde 0 indica un tumor 100% G4 y 1 un tumor 100% G3. Aunque se describió cierta variación celular intratumoral, la mayoría de las células de un tumor pertenecían al mismo rango del espectro G3-G4. Tomada de Williamson y cols., 2022.

Por otra parte, de acuerdo con Luo y colaboradores (2022), existen progenitores cerebelares transicionales entre células madre neurales y linajes neuronales en el cerebelo fetal en desarrollo, los cuales podrían originar tanto a progenitores de células granulares como a células en cepillo unipolares, por lo que serían células potenciales para desarrollar meduloblastomas SHH, G3 y G4. Aunque refirieron que, de las neoplasias estudiadas, hubo mayor población de células transicionales en el grupo 3⁵⁰.

1.5 Estudio de nuevos marcadores

Con base en los diferentes trabajos expuestos, aún es necesario continuar el estudio molecular de los meduloblastomas para poder entender su naturaleza y ofrecer herramientas acuciosas para la toma de decisiones en el abordaje de los pacientes y en el desarrollo de terapias blanco.

A partir de la revisión de la literatura, este trabajo utiliza cinco genes para la clasificación molecular de los meduloblastomas con un enfoque entre los grupos menos definidos: G3 y G4. Resaltando que a pesar de que no hay consenso sobre cómo dividir al grupo no

WNT/SHH, si en 8 o más subtipos, en un espectro, en dos polos radicales o en tres grupos, sí se reconoce que la distinción, al momento pragmática, G3 y G4 es la opción preferible para desarrollar proyectos que pudieran establecer mejor el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes.

A continuación, se describen las principales características de los genes estudiados: *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GRM8* y *PRDM6*.

ANO2 (proteína Anoctamina 2, TMEM16) proteína transmembranal que forma homodímeros funcionando como canales de cloruro activados por calcio. Su función se traduce en la inhibición sináptica GABAérgica en las células de Purkinje y en la regulación de la plasticidad cerebelar. También juega un rol importante en la transducción olfatoria^{51,52}.

En 2018, Castillo Rodríguez y colaboradores realizaron un estudio *in Silico* a partir de una muestra de 137 perfiles de expresión de meduloblastomas para identificar posibles marcadores diagnósticos entre G3 y G4. Entre los genes evaluados, la expresión diferencial de *ANO2* apoyó la caracterización de G4, e incluso, con base en la variación intragrupal, se procedió a identificarlo de forma distintiva entre dos grupos: G4 α y G4 β ⁵³.

DISC1 (disrupción de esquizofrenia 1) participa el desarrollo de procesos neurales en células embrionarias y adultas, incluida la proliferación neuronal, migración, crecimiento de las neuritas y mantenimiento sináptico. Este gen se expresa durante periodos críticos del desarrollo en regiones donde se encuentran progenitores neurales en proliferación, como las zonas ventricular y subventricular durante el desarrollo embrionario y en el giro dentado del hipocampo en los adultos^{54,55}.

DISC1 es regulador de múltiples aspectos en la neurogénesis, participa en la proliferación neuronal mediada por WNT, y actúa como regulador negativo de *GSK3B* (punto de convergencia de las vías AKT-mTOR y *CTNMB1*), controlando el tiempo del proceso de integración de las neuronas en el recién nacido y el proceso de neurogénesis en el adulto^{54,55,56}.

Hasta el momento no hay estudios que evalúen la expresión de *DISC1* en los meduloblastomas, sin embargo, podría ser un gen clave si se considera que los

meduloblastomas surgen de alteraciones en programas transcripcionales en distintos linajes celulares durante el desarrollo cerebelar temprano. Lo cual apoya el estudio de vías genéticas comunes entre el desarrollo normal del cerebelo y la tumorigénesis⁵⁷.

ARHGAP18 (codifica la proteína Rho GTPasa activadora) controla la proliferación de los progenitores neurales y contribuye al plegamiento de la neocorteza; además de ser regulador de la función celular, la migración y la angiogénesis⁵⁸.

Entre los genes con los que interactúa, *ARHGAP18* puede suprimir la actividad de *YAPI* a través de retroalimentación negativa⁵⁹; e inhibir la actividad de RhoA⁵⁸. *ARHGAP18* actúa como regulador negativo de *YAPI* e inhibe la polimerización de actina, lo cual reduce la localización nuclear de *YAPI*⁶⁰.

YAP tiene un papel primordial en la tensión tisular vía *ARHGAP18* y sus genes asociados mediante la regulación de la formación de la red cortical de actino-miosina, mecanismo esencial para moldear correctamente el órgano/cuerpo⁵⁹.

Se ha descrito que la pérdida de *YAPI* junto con la activación de la vía Hippo son necesarios para el desarrollo neuronal. La proteína YAP1 se utiliza como marcador de inmunohistoquímica que se sobreexpresa en los grupos WNT y SHH, pero no en G3 y G4⁷.

Debido a su asociación con la transición epitelial-mesenquimal, *ARHGAP18* ha sido evaluado en diferentes neoplasias como promotor de metástasis. En el adenocarcinoma de mama triple negativo la sobreexpresión de *ARHGAP18* se asocia con menor supervivencia global, supervivencia libre de recurrencia y supervivencia libre de metástasis. Dicho evento está asociado con la subexpresión del supresor tumoral miR-200b y la inhibición de RhoA⁵⁸.

Por otro lado, la sobreexpresión de *ARHGAP18* también se ha asociado con el desarrollo de glioblastomas mediante correlación negativa de miR-181a, que actúa como supresor tumoral en glioblastomas⁶¹.

GRM8 (receptor metabotrópico de glutamato 8) receptor de la familia de las proteínas G del grupo III del glutamato, el cual está asociado a la inhibición de la cascada del AMP cíclico⁶².

El glutamato es el mayor neurotransmisor excitatorio en el sistema nervioso central y su receptor *GRM8* ha sido relacionado con la progresión de diversos tumores mediante diferentes acciones, por ejemplo, en líneas celulares de neuroblastomas y gliomas actúa como supresor tumoral, mientras que en el carcinoma escamoso pulmonar y en el cáncer de mama actúa como oncogen⁶².

Cho y colaboradores (2011) analizaron la sobreexpresión de *GRM8* como marcador de diferenciación neuronal en meduloblastomas con características del grupo 4. En dicho artículo se describen 6 grupos de meduloblastomas C1-C6. C6 corresponde al grupo WNT y C3 al grupo SHH, mientras que C1, C2, C4 y C5 son un continuo de tumores que van desde el extremo de diferenciación neuronal/vía glutamaérgica (grupo 4) hasta la diferenciación fotorreceptora/vía GABAérgica (grupo 3)⁴⁸.

Kool y colaboradores (2008), describieron 5 grupos A-E: A corresponde al grupo WNT, B al SHH y C, D y E a la gama entre el grupo 3 y el grupo 4 (fig. 7)⁴⁸. Igualmente refieren que dicho umbral va desde la diferenciación neuronal (tumores con expresión aumentada de *GRM8*) hasta la expresión de genes de diferenciación retiniana (tumores que expresan antígeno-S y opsina, marcadores que en tejido sano únicamente se expresan en fotorreceptores de la retina y una clase de pinealocitos derivados de células fotorreceptoras pineales)⁴⁹.

Por otro lado, Kunder y colaboradores (2013) evaluaron un panel de 9 miRNAs y 12 genes para distinguir entre los cuatro grupos moleculares reconocidos por la OMS. Entre sus resultados destacan que *GRM8* se sobreexpresa en el grupo 4³¹.

Posteriormente, Kaur y colaboradores (2016), identificaron mayor expresión de *GRM8* en el grupo 4 con respecto a WNT, SHH y G3 ($p < 0.0001$) mediante PCR. Posteriormente, al evaluar un panel de 10 marcadores de inmunohistoquímica, entre ellos *GRM8*, concluyeron que sólo fueron útiles para la clasificación molecular B-catenina, YAP1 y GAP1¹⁸.

Por último, Qin y colaboradores (2021) lo evaluaron en el grupo 3 y asociaron la sobreexpresión con peor pronóstico. En este artículo también se planteó que *GRM8* se correlacionó río abajo con el oncogen *MYC*⁶³.

Medulloblastoma type	A	B	C	D	E
Molecular characteristics	WNT / TGF signaling β-catenin mutations	SHH signaling PTCH1 mutations			
	NOTCH / PDGF signaling				
	Increased protein biosynthesis / cell cycle				Increased protein biosynthesis / cell cycle
			Neuronal differentiation		
Genetic characteristics	Loss of chrom 6	Loss of chrom 9q	Loss of chrom X, gain of chrom 18		
			Loss of chrom 8 and 17p, gain of chrom 17q		
				Photoreceptor differentiation	
Clinical characteristics	Classic histology	Desmoplastic histology	Mainly classic histology		
			Metastasis		
	Older children	Young children + adults	Children	Children	Young children

Figura 7. Clasificación molecular en la que se identificaron 5 grupos de meduloblastomas. El grupo A corresponde al grupo WNT, el B al SHH, el C y E a los actuales grupos 3 y 4, respectivamente, mientras que el grupo D incluye a los tumores intermedios 3-4 (zona gris) (tomado de Kool y cols., 2008).

PRDM6 (proteína PR6 dominio de dedo de zinc) funciona como un represor transcripcional implicado en la regulación de proteínas contráctiles del músculo liso vascular, el metabolismo y la degradación de lisina⁶⁴.

Roussel y Stripay (2018), Menyhart y colaboradores (2019), y Kumar y colaboradores (2020) describieron la sobreexpresión de *PRDM6* en aproximadamente 17% de los meduloblastomas del grupo 4. Su acción se ha descrito como regulador epigenético de la actividad génica (regulador de la cromatina) y su activación se asocia a duplicación tándem *SNCAIP*^{3,24,44,64,65}.

Por otro lado, en 3.1% de los meduloblastomas G4 se han identificado mutaciones somáticas en *CBFA2T2*, un coexpresor transcripcional que liga modificadores epigenéticos y factores transcripcionales e interactúa con los dominios SET y PR de las proteínas PRDM, incluida *PRDM6*⁴⁴.

PRDM6 ha sido referido como marcador del grupo 4 “puro”, el cual, de acuerdo con las clasificaciones de Northcott y colaboradores (2017) y Sharma y colaboradores (2019), está

sobreexpresado, en el subtipo 8, aunque también se ha descrito, en menor medida, en el subtipo 6 del espectro 3-4^{34,66} (figs. 3,5 y 8).

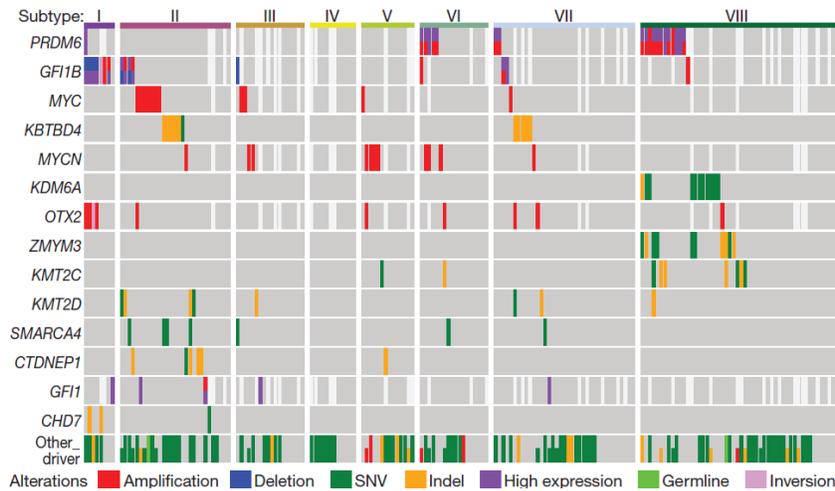


Figura 8. Características moleculares de los meduloblastomas del espectro 3-4, en la que *PRDM6* se identifica como marcador del extremo G4 (tomada de Northcott y cols., 2017).

2. Planteamiento del problema

Los meduloblastomas se dividen en al menos cuatro grupos moleculares con características genéticas distintivas que se correlacionan con variables clínico-patológicas y, actualmente, se considera que clasificar a los pacientes de acuerdo con el origen molecular de la neoplasia es la mejor manera de asegurar acceso a terapias potencialmente eficaces^{4,8}.

En los grupos WNT y SHH se conoce la vía de lesión y el avance en el conocimiento de la biología molecular ha permitido identificar marcadores específicos, sin embargo, aún se consideran grupos con casos heterogéneos⁴⁸.

Por otro lado, los grupos 3 y 4 comparten características citogenéticas que se traslapan y que pueden dificultar su diferenciación diagnóstica, por lo que la OMS 2021 continúa agrupándolos en la categoría provisional “no WNT/SHH”. No obstante, la categoría no WNT/SHH limita el valor diagnóstico, pronóstico y terapéutico de los pacientes con meduloblastoma, pues alberga entre 50 y 70% de los casos pediátricos^{6,8}.

La relevancia de la distinción entre los grupos 3 y 4 se manifiesta cuando se considera que la supervivencia a cinco años de los pacientes del grupo 3 oscila entre 20 y 50%, mientras que en el grupo 4 lo hace entre 40 y 95%.

Este trabajo propone estudiar cinco genes referidos en la literatura como posibles marcadores que permitan distinguir entre los cuatro grupos principales y específicamente entre G3 y G4.

3. Pregunta de investigación

Pregunta principal:

¿La expresión de los genes *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* permite discriminar entre los grupos moleculares de los meduloblastomas pediátricos?

Pregunta secundaria:

¿Hay diferencias en la expresión de los genes *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* que permitan discriminar entre los grupos moleculares 3 y 4 de los meduloblastomas pediátricos?

4. Justificación

Hasta el momento, se ha demostrado que los cuatro grupos moleculares de meduloblastomas son heterogéneos y se pueden subtipificar.

Los estudios de biología molecular han servido para ampliar la información genética de los grupos principales de meduloblastomas y generar indicios sobre las células de origen; información esencial para posteriormente desarrollar terapias blanco⁴². Sin embargo, aún faltan detalles moleculares por conocer, para poder implementar acciones clínicas, entre las que destaca: identificar marcadores útiles y asequibles en la práctica anatomopatológica rutinaria.

El impacto principal de este proyecto es el aumento de conocimiento, pues, si la expresión de los genes *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* apoya la distinción entre los diferentes grupos moleculares, y específicamente entre los grupos 3 y 4, se podrían continuar futuros estudios para afinar el diagnóstico molecular, la clasificación de los subtipos y el establecimiento del origen de los meduloblastomas.

5. Hipótesis

Principal:

La expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* apoya la distinción significativa entre los cuatro grupos principales de meduloblastomas.

Secundarias:

La expresión diferencial de *ANO2* puede distinguir entre MB G4 y G3.

La expresión diferencial de *DISC1* puede distinguir entre MB G4 y G3.

La expresión diferencial de *ARHGAP18* puede distinguir entre MB G4 y G3.

La expresión diferencial de *GMR8* puede distinguir entre MB G4 y G3.

La expresión diferencial de *PRDM6* puede distinguir entre MB G4 y G3.

6. Objetivos

Objetivo general: Determinar si la expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* permite diferenciar entre los grupos moleculares de los meduloblastomas pediátricos.

Objetivos específicos

- Establecer la expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* en tejido neoplásico y tejido control.
- Identificar si la expresión de los cinco genes puede distinguir entre los grupos moleculares de meduloblastomas pediátricos.

Objetivo secundario

- Evaluar si la expresión diferencial de los genes propuestos puede discriminar entre G3 y G4.

7. Variables:

A. Variable dependiente:

- Expresión diferencial.

Definición operacional: número de veces que el gen estudiado es transcrito en mayor o menor medida en el tejido neoplásico frente a los controles de cerebelo normal.

Escala de medición: cuantitativa, continua.

Categoría: expresión del mRNA (*fold change*) de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6*.

B. Variable independiente:

- Variante molecular de los meduloblastomas.

Definición operacional: grupo molecular reconocido por la OMS y determinado mediante PCR con base en el panel de genes de Northcott y cols. 2012.

Escala de medición: cualitativa, dicotómica.

Categorías: WNT, SHH, G3 y G4.

8. Metodología

Diseño del estudio: transversal y analítico.

Población de estudio: muestras de tejido congelado o tejido fijado en formol e incluido en parafina con diagnóstico molecular de meduloblastoma.

Muestreo: no probabilístico por conveniencia.

Tamaño de la muestra: No se realizó el cálculo porque se trabajó con todos los casos clasificados.

Criterios de inclusión: meduloblastomas clasificados mediante RT-qPCR de acuerdo con el panel de genes propuesto por Northcott y cols. 2012.

Criterios de exclusión: ninguno.

Criterios de eliminación: muestras con Ct (cycle threshold) de 36 ciclos en adelante.

Recursos humanos: Investigadores, personal médico y pasantes que colaboran en el Departamento de Patología Clínica y Experimental y en el Laboratorio de Biología Molecular del HIMFG.

Recursos financieros: se contó con el apoyo de Fondos Federales 2021 (HIM/2018/092.SSA.1555).

Descripción de los procedimientos:

Para la realización de este trabajo era necesario contar con un grupo de meduloblastomas clasificados molecularmente que pudiera servir para el análisis de los 5 genes propuestos. Debido a que en el HIMFG no se contaba con dicho grupo, esta investigación se realizó en conjunto con la investigación de Barrera Velázquez y Eguía Aguilar cuya finalidad fue aplicar el panel de Northcott y cols. 2012 mediante PCR en muestras del HIMFG para obtener una clasificación molecular en muestras del biobanco de anatomía patológica entre 1990 y 2022.

A continuación, se describen los pasos:

A. Identificación de los casos

A partir del estudio previo realizado por Villavicencio Zepeda y Eguía Aguilar, se cuenta con una base de 160 casos de los meduloblastomas diagnosticados en el HIMFG entre 1990 y 2016²⁵.

Los casos entre 2017 y julio del 2020 se obtuvieron de la base de datos del trabajo de Vicenteño León y Eguía Aguilar (171 casos acumulados)⁶⁷.

Los casos entre agosto del 2020 y marzo del 2022 se obtuvieron de la revisión de las libretas del Departamento de Patología Clínica y Experimental del HIMFG. En este periodo de tiempo se registraron 9 casos nuevos, dando un total de 180 casos acumulados.

Por otro lado, se obtuvieron 6 casos de meduloblastomas del Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI, del Instituto Mexicano del Seguro Social, a través de la Dra Alicia Rodríguez Velasco.

El total de casos acumulado fue de 186.

B. Obtención de los bloques de parafina y las laminillas

Los bloques de parafina y laminillas estaban en resguardo del Laboratorio de Biología Molecular del Departamento de Patología Clínica y Experimental a cargo de la Dra. Pilar Eguía.

El material (bloques y laminillas) de los 9 casos nuevos del HIMFG fue solicitado al archivo del Departamento de Patología y se almacenaron con el resto de los casos.

C. Obtención del tejido congelado

A partir del año 2016, se solicitó al Departamento de Neurocirugía del HIMFG a cargo del Dr. Fernando Chico Ponce de León y a los residentes de patología que se avisara al Laboratorio de Biología Molecular cuando se realizara un diagnóstico transoperatorio de tumores de fosa posterior para obtener tejido en fresco y almacenar a -70°C para su posterior uso en los diferentes protocolos de estudio molecular de neoplasias del sistema nervioso central que se realizan en dicho Departamento.

Sólo se almacena material fresco en los casos con tejido suficiente para el diagnóstico histopatológico definitivo. En los casos con poco material no se guarda tejido fresco para no comprometer el diagnóstico de los pacientes.

D. Revisión de laminillas

Las laminillas teñidas con hematoxilina y eosina fueron evaluadas por patólogos del Departamento de Patología del HIMFG para corroborar el diagnóstico microscópico de meduloblastoma y seleccionar los bloques. Se consideraron como casos adecuados aquellos con tejido suficiente y viable (necrosis menor de 30%).

E. Selección de casos

Con el apoyo económico de Fondos Federales, en este proyecto se adquirieron 60 placas para el análisis de 120 muestras tumorales.

Se eligieron 110 casos de la base general de meduloblastomas partiendo de los casos más recientes y se escogieron los casos que tuvieran estudios de inmunohistoquímica (14 muestras de tejido congelado y 98 de muestras de tejido de bloques de parafina). Se utilizaron

2 muestras para estandarización y 6 muestras de tejido congelado control de cerebelo (autopsias).

Los casos seleccionados (incluyendo las muestras para estandarización) correspondieron a muestras entre los años 2000 y 2022 y las 6 muestras de autopsia se obtuvieron entre 2017 y 2021.

F. Tejido de cerebelos control

A partir del año 2018, los residentes de patología obtienen una muestra de tejido fresco de cerebelo en los casos de autopsias completas de pacientes no oncológicos para utilizar como tejido control en los diferentes proyectos de estudio molecular de los tumores pediátricos del sistema nervioso central.

La degradación del RNAm en los tejidos postmortem es una de las mayores consideraciones cuando se realizan estudios de expresión génica. Dicha degradación comprende un proceso complejo que se relaciona con factores peri y postmortem^{68,69}.

Los factores perimortem comprenden las características agonales, condiciones como el tiempo de coma, hipoxia, pirexia, convulsiones, deshidratación, hipoglucemia, falla orgánica múltiple, etc., mientras que los factores postmortem incluyen el intervalo postmortem y el intervalo de congelación (almacenamiento)⁶⁸.

De acuerdo con Tomita y colaboradores (2004), los factores agonales afectan de forma adversa la integridad del RNAm e influyen en los perfiles de microarreglos de expresión en mayor medida que otros factores biológicos, como el sexo, la edad y el diagnóstico principal, y que los factores postmortem⁶⁸.

Por su parte, el estudio de Zhu y colaboradores (2017) concluyó que la degradación de RNAm relacionada con el intervalo postmortem es específica según el tejido, específica según el gen y dependiente del genotipo; descartando un patrón global de degradación de ARNm en genes individuales entre los diferentes tejidos⁶⁹.

De acuerdo con dicho estudio, el ARNm es relativamente estable en el SNC, mientras que es inestable en el tracto digestivo. No obstante, hay que considerar que la degradación del ARNm puede no ser un proceso lineal, inclusive, se debe de considerar que diferentes

regiones de un mismo tejido pueden tener variación en la degradación del ARNm⁶⁹. La tabla 1 muestra el número de genes asociados con el intervalo postmortem en 15 tejidos, entre ellos el cerebelo.

Se postula que los cambios postmortem ocurren cuando la sangre deja de fluir y hay estancamiento en los vasos de tamaño pequeño. Lo que sugiere que tejidos ricos en dicha vasculatura son menos susceptibles a la degradación del ARNm (como el cerebro y el pulmón) que tejidos con vasos medianos y grandes⁶⁹.

Por otro lado, la relativa estabilidad del ARN en el SNC coincide con los resultados de Ervin y colaboradores (2007), quienes refieren que ni el intervalo postmortem, ni el pH del líquido ventricular interfieren con la integridad postmortem del ARNm de la mayoría de las regiones cerebrales. De forma que, es razonable y práctico utilizar tejido de SNC con un intervalo postmortem prolongado (hasta 30 horas) para investigaciones moleculares⁷⁰.

Tissues	FDR < 1%			FDR < 5%			FDR < 10%		
	up	down	total	up	down	total	up	down	total
(1) Cerebellum (n= 100)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(2) Pituitary (n= 81)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
(3) Subcutaneous Adipose (n= 144)	3	3	6	6	5	11	8	5	13
(4) Suprapubic Skin (n= 116)	10	14	24	19	26	45	29	32	61
(5) Cerebral Cortex (n= 83)	2	8	10	41	64	105	124	138	262
(6) Lung (n= 125)	40	78	118	56	100	156	68	113	181
(7) Tibial Artery (n= 138)	49	67	116	85	109	194	113	144	257
(8) Tibial Nerve (n= 122)	165	70	235	228	110	338	252	129	381
(9) Lower leg Skin (n= 171)	198	159	357	351	285	636	485	366	851
(10) Thyroid (n= 116)	225	223	448	317	333	650	378	390	768
(11) Heart (n= 89)	199	200	399	421	405	826	582	575	1157
(12) Aorta Artery(n= 85)	430	494	924	693	720	1413	853	844	1697
(13) Skeletal Muscle (n= 208)	653	600	1253	843	811	1654	963	922	1885
(14) Whole Blood (n= 183)	677	842	1519	884	1106	1990	1021	1237	2258
(15) Esophageal Mucosa (n= 101)	1129	1020	2149	1529	1234	2763	1732	1355	3087

Tabla 1. Las columnas “up” y “down” identifican el número de correlación de expresión al alza o a la baja, respectivamente, de genes asociados con el intervalo postmortem (tomada de Zhu y cols., 2017).

En el cerebelo no se identificó degradación de genes individuales asociados al intervalo postmortem. FDR= tasa de descubrimiento falso.

En este trabajo, se utilizó tejido congelado de 6 autopsias (A1-A6) de pacientes no oncológicos cuyos diagnósticos, causas de muerte e intervalos postmortem en horas se muestran en la tabla 2.

Tabla 2. Características pre y postmortem de las autopsias control			
Autopsia	Diagnóstico de base	Causa de muerte	Intervalo postmortem (h)
1	Síndrome colestásico de inicio neonatal	Choque séptico	04:00
2	Distrofia muscular de cinturas pélvica y escapular con cardiomiopatía dilatada	Hemorragia pulmonar masiva bilateral	03:00
3	Cardiopatía congénita compleja con discordancia atrioventricular y ventriculoarterial	Choque mixto	06:15
4	No se encontró el expediente		04:00
5	Atresia intestinal tipo III A	Choque	06:00
6	Síndrome de delección 22q11.22	Hemorragia pulmonar bilateral	02:00

G. Extracción de RNA.

La extracción en el tejido en parafina se inició realizando 4 cortes de 10 micras de grosor de cada bloque, los cuales se colocaron en un microtubo. Los pasos siguientes fueron:

1. Se limpió la cuchilla del microtomo para remover ribonucleasas.
2. Se eliminó el exceso de parafina alrededor del corte con una navaja de bisturí.
3. Los primeros dos cortes se eliminaron y el resto se colocaron inmediatamente en el microtubo y se cerró. Se procesaron las muestras inmediatamente debido a que ribonucleasas presentes en el ambiente pueden degradar parte del RNA.
4. Se colocó una capa de parafina en el bloque recién cortado para que el tejido no estuviera en contacto con el aire o se cubrió con papel parafilm.

El paso siguiente fue eliminar la parafina, para ello:

5. Se agregó 1 ml de xilol y se incubó 2 veces en xilol por 3 min a 42 °C con agitación. Se centrifugó en cada ocasión por 1 min.
6. Se lavó con 1 ml de Et-OH absoluto 3 veces por 3 min a temperatura ambiente (TA) con agitación; se centrifugó en cada ocasión a máxima velocidad (14000 rpm).
7. Se dejó evaporar el OH durante 5 min a TA o hasta que el tejido estuviera completamente seco.

Para la extracción en el tejido congelado, se utilizó hielo seco, sobre el cual se colocó un mortero en el que se trituró el tejido mientras se agregaba nitrógeno líquido. Una vez pulverizado, se colocó el material en un microtubo.

A continuación, en ambos casos, se digirieron los tejidos:

8. Se agregaron 350 μ l de buffer de digestión por muestra y se incubó a 42 °C hasta que no se observó tejido. La tabla 3 indica las cantidades colocadas buffer de digestión por muestra. La otra opción fue preparar un volumen mayor, por ejemplo 50 ml, pero solo agregar Tris, EDTA y SDS. En cualquier caso, se guardaron a temperatura ambiente (TA) y de esta solución se agregaron 335 microlitros más 15 microlitros de proteinasa K.

Tabla 3. Componentes y volúmenes para buffer de digestión por muestra			
Componentes	Stock	Con. Deseada	Vol.
Tris_HCl pH 7.8	1 M	20mM	7 μ l
EDTA	0.5 M	10 mM	7 μ l
Prot. K	20 mg/ml	500 μ g/ml	14 μ l
SDS	10 %	1 %	35 μ l
H ₂ O			287 μ l
Vol. total			350 μ l

9. Se incubó la solución a 42 °C hasta que el corte se digiriera (el tiempo varió de acuerdo con el tiempo de fijación, edad del bloque y tipo de tejido). Después de las primeras 24 horas, si todavía existía más de 40% de tejido sin digerir, se agregaron 5 μ l de proteinasa K (20 mg/ml) y en caso de ser necesario, se facilitó la disrupción de los tejidos mediante métodos físicos como maceración dentro del mismo tubo con un pistilo. En promedio la incubación fue de 48 horas.

Posteriormente, se realizó la extracción de RNA:

10. Se agregaron 600 μ l de Trizol (tiocianato de guanidina), se agitó la solución y se incubó por 5 min a TA.

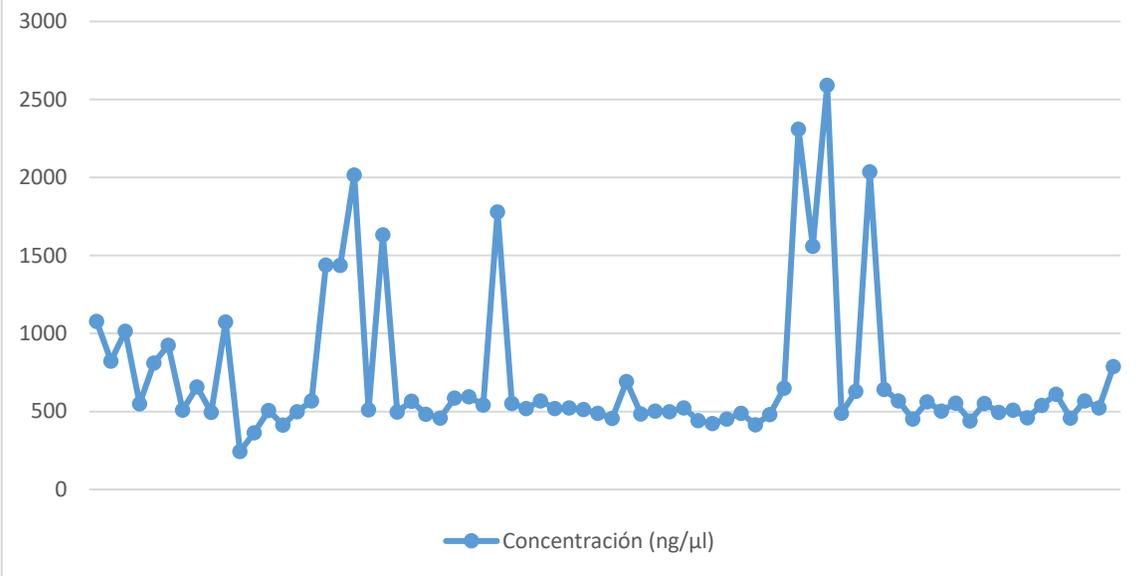
11. Se agregaron 200 μ l de cloroformo y se agitó vigorosamente por 20 segundos. Después se incubó por 5 min a TA y se centrifugó a alta velocidad (14,000 rpm) por 5 min a TA.
12. Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y se midió el volumen extraído.
13. Se agregaron 2 μ l de glucógeno (5 μ g/ μ l) dentro de la muestra y un volumen de isopropanol, esto fue un volumen igual al que se recuperó en la fase acuosa. Se mezcló por inversión lentamente y se incubó a -20 °C toda la noche.
14. Al día siguiente, se centrifugó a velocidad máxima a 4 °C por 20 min. Se decantó el sobrenadante y la pastilla de RNA formada en el fondo se lavó con 1 ml de Et-OH al 75 % y se centrifugó a velocidad máxima a 4 °C por 10 min, se eliminó el Et-OH. Si persistía el olor del fenol se hizo otro lavado igual.
15. Por último, se dejó secar la pastilla en un ambiente libre de ribonucleasas y al final se resuspendió el RNA total en 30 μ l de agua libre de nucleasas. El volumen del agua dependió del tamaño del botón.

Enseguida se realizó el tratamiento con DNAsa:

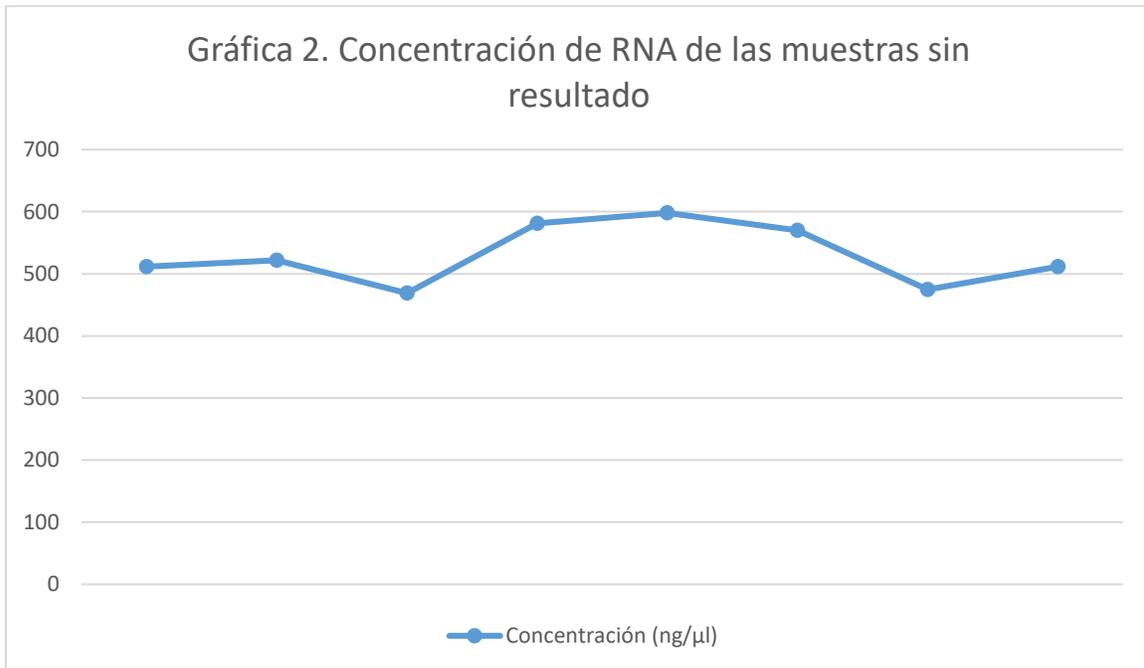
16. La pastilla de RNA se resuspendió en 30 μ l de agua libre de nucleasas y se colocó en cada muestra 1 μ l de buffer DNAsa 10X (Thermo Scientific) + 1 μ l de DNAsa (1U/ μ l) (cat. EN0521, Thermo Scientific). Se incubó la solución por 30 min a 37 °C; al cabo de ese tiempo, se agregó 1 μ l de EDTA 0.5 M y se volvió a incubar 10 min a 65 °C para inactivar a la DNAsa.
17. La determinación de la pureza y concentración de la solución se analizó por espectrofotometría (nanodrop 2000). Durante la realización de los primeros ensayos se utilizaron muestras con concentraciones de RNA entre 300-400 ng/ μ l. No obstante, posteriormente, se consideró 500 ng/ μ l como la concentración mínima adecuada para utilizar las muestras. La pureza de las muestras utilizadas varió entre 1.8 y 2.0.

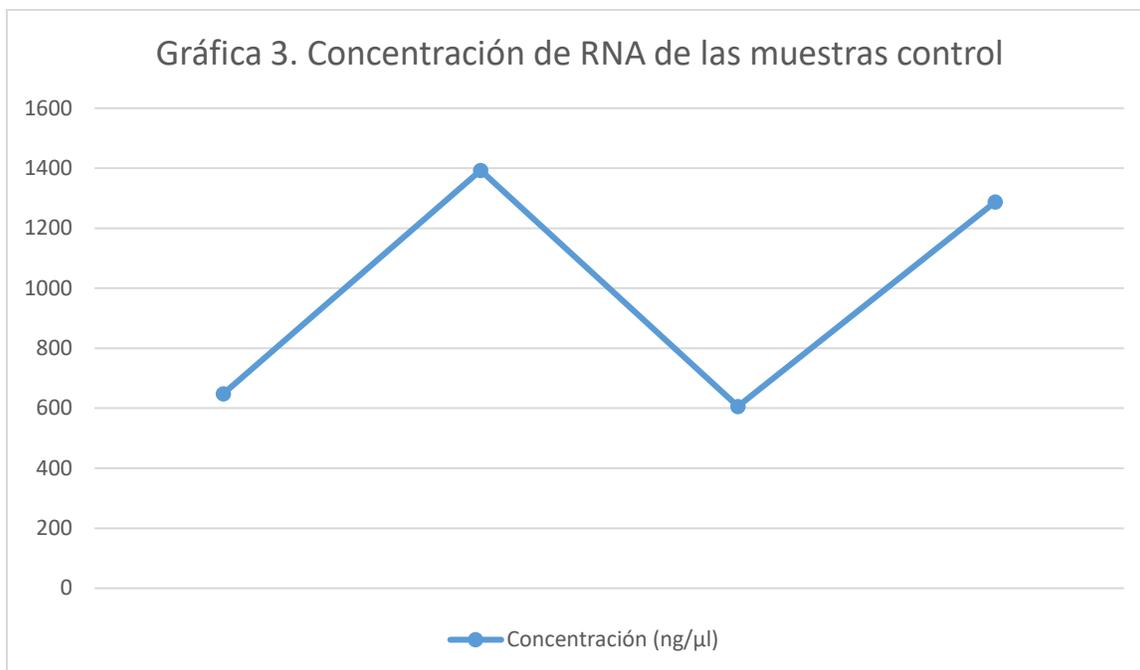
Las gráficas 1 a 3 muestran la concentración de RNA de las muestras clasificadas, las muestras sin resultados y las muestras control, respectivamente.

Gráfica 1. Concentración de RNA de las muestras clasificadas



Gráfica 2. Concentración de RNA de las muestras sin resultado





H. Ensayo RT-PCR

RT-PCR punto final

Para evaluar la integridad del RNA se determinó la amplificación de dos controles endógenos GAPDH y HPRT mediante RT-PCR punto final. Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 μg de RNA total de cada tumor y el kit First Strand (cat K1612, Thermo Scientific). La tabla 4 muestra los volúmenes utilizados para la síntesis de una muestra de cDNA.

Tabla 4. Componentes y volúmenes para la síntesis de una muestra de cDNA.	
Componentes	Volumen
RNA	2 μl
Primer Random Hexámeros 100 μM	1 μl
Agua libre de nucleasas	8 μl
Buffer 5X	4 μl
Inhibidor de RNAsa (200/μl)	1 μl
Mezcla dNTP 10 mM	2 μl
Transcriptasa reversa (20 U*/μl)	2 μl
Total	20 μl

La PCR se realizó con el kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (cat M8291A, Promega), se utilizaron dos genes endógenos GAPDH y HPRT de 105 y 124 pb, respectivamente. La reacción se realizó como se muestra en tabla 5.

Tabla 5. Componentes y volúmenes para la PCR por muestra.	
Componentes	Volumen
Agua libre de DNAsas y RNAsas	13.875 µl
5X Green GoTaq Flexi Buffer	5 µl
Solución Buffer MgCl ₂ (25 mM)	2 µl
Mezcla de Nucléotidos PCR (10 mM)	0.5 µl
Oligonucleótido sentido (10 mM)	0.75 µl
Oligonucleótido reverso (10 mM)	0.75 µl
GoTaq Flexi DNA polimerasa (5 u/µl)	0.125 µl
Total	25 µl

Se colocaron las reacciones en el termociclador. El protocolo de ciclado para la amplificación fue el recomendado por el fabricante (tabla 6).

Tabla 6. Condiciones de termociclado para kit Go Taq Flexi DNA Polymerase			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	30 seg	25-35
Alineamiento	60	30seg	
Extensión	72	30 seg	
Extensión final	72	5 min	1
Enfriamiento	4	indefinido	

Posterior a ello se separaron los productos de la PCR mediante electroforesis en el gel de agarosa y se visualizaron en un transiluminador con luz UV. La figura 9 muestra amplicones en el gel de agarosa mediante el cual se evaluó la amplificación de los genes endógenos *GAPDH* y *HPRT* en muestras representativas.

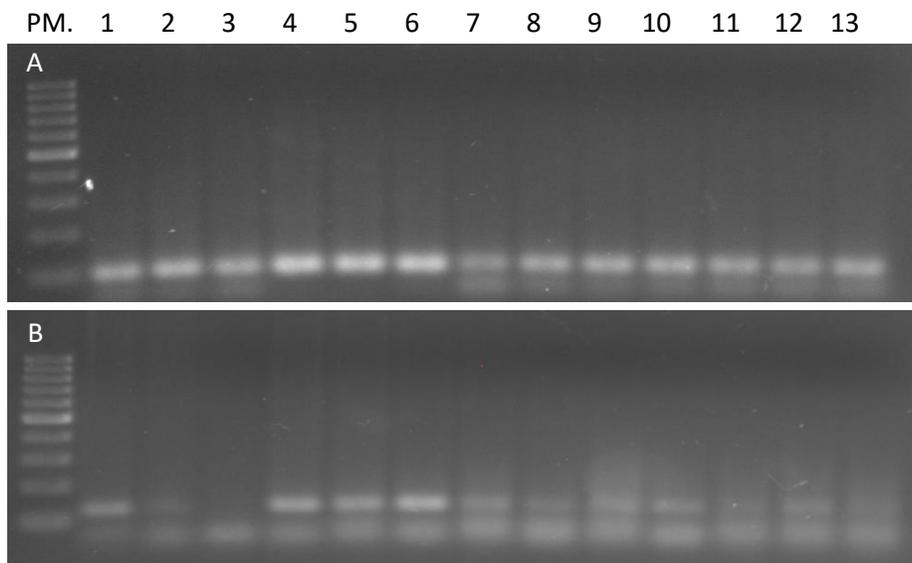


Figura 9. Amplificación de *GAPDH* (A) y *HPRT* (B) en trece de las muestras utilizadas. Gel de agarosa a 2%.

RT-qPCR

Una vez que se comprobó la amplificación de los genes endógenos se procedió a cuantificar los genes *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* en los meduloblastomas.

Previo a la síntesis de cDNA se realizó un paso para eliminar DNA residual. Este paso consistió en mezclar 6µL de muestra (3000ng RNA total) + 1.5µL Buffer GE (Qiagen) e incubar durante 10 minutos a 42 °C.

La síntesis de cDNA se realizó con el kit RT2 First strand. La reacción se realizó como se muestra en tabla 7. Las condiciones para la incubación fueron 42 °C por 15 min, inmediatamente después, se detuvo la reacción mediante incubación a 95 °C por 5 min.

Tabla 7. Componentes y volúmenes para la reacción de transcriptasa reversa	
Componentes	Volumen
Control P2	0.5 µl
Agua libre de nucleasas	1.5 µl
5X Buffer BC3	1 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
RNA + Buffer GE	7.5
Total	12.5µl

Una vez que terminó la síntesis de cDNA se realizó la qPCR con el kit RT2 SYBR® Green qPCR Master mix (Qiagen) y los arreglos de 96 pozos Custom RT2 PCR Arrays (Qiagen). A cada tubo de cDNA se le agregaron 90 µL de agua libre de nucleasas. Posteriormente se realizó la reacción como lo indica la tabla 8. Finalmente, en las placas de 96 pozos se dispensaron 15µL por pozo

Tabla 8. Componentes y volúmenes para la PCR	
Componentes	Volumen
2x RT ² SYBR® Green Mastermix	375 µl
cDNA	102 µl
Agua libre de nucleasas	275 µl
Total	752 µl

Las condiciones de ciclado se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Condiciones de termociclado para RT-qPCR.			
Ciclos	Temperatura (°C)	Duración	Número de ciclos
1	95	10 min	La DNA Taq polimerasa se activa al calentar.
40	95	15 s	Colección de datos de fluorescencia
	60	1 min	

La configuración de la placa fue realizada por los investigadores, y se muestra en la tabla 10.

	1	2	3	4	5	6
A	<i>WIF1</i>	<i>TNC</i>	<i>GAD1</i>	<i>DKK2</i>	<i>EMX2</i>	<i>PDLIM3</i>
B	<i>EYA1</i>	<i>HHIP</i>	<i>ATOH1</i>	<i>SFRP1</i>	<i>IMPG2</i>	<i>GABRA5</i>
C	<i>EYS</i>	<i>NRL</i>	<i>MAB21L2</i>	<i>NPR3</i>	<i>ANO2</i>	<i>DISC1</i>
D	<i>ARHGAP18</i>	<i>KCNA1</i>	<i>EOMES</i>	<i>RBM24</i>	<i>UNC5D</i>	<i>KHDRBS2</i>
E	<i>OAS1</i>	<i>GRM8</i>	<i>PRDM6</i>			
F	<i>GAPDH</i>	<i>HPRT1</i>	<i>HGDC</i>	<i>PPC</i>	<i>RTC</i>	

Tabla 10. Configuración de la placa con los genes incluidos para la qPCR. Basada en los 22 genes del panel de Northcott y cols. (2012), los 5 genes blanco del estudio (amarillo) y los controles: **HGDC** control de DNA genómico, **PPC** control positivo de la PCR, **RTC** control de RT y **NTC** control sin RT.

Se realizaron los ensayos PCR en las 60 placas y con base en los resultados se procedió a clasificar los meduloblastomas según la expresión de los 22 genes que han mostrado utilidad para diferenciar entre los cuatro subgrupos de acuerdo con los estudios de Northcott y

colaboradores (2012), Veiga Cruzeiro y colaboradores (2019), Leal y colaboradores (2018) y Kaur y colaboradores (2019).

Para evaluar mediante RT-qPCR los 22 genes, tanto en las muestras de meduloblastoma como en los cerebelos control, se utilizó un termociclador Aria Mx (Agilent). Los valores de Ct se registraron en una hoja de Excel^c y se realizaron los cálculos de cuantificación relativa con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak 2008) donde:

$$\Delta\Delta Ct = [(Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen endógeno}) \text{ de la muestra 1} - (Ct \text{ gen interés} - Ct \text{ gen endógeno}) \text{ de la muestra control}]$$

$$\text{Expresión relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

Los valores de Ct de cada tumor se normalizaron con los genes endógenos *GAPDH* y *HPRT*, sin embargo, debido a que *HPRT* no amplificó de forma adecuada, sólo se utilizaron los valores de *GAPDH*. Finalmente, los valores de expresión se compararon con respecto a muestras de cerebelo control (no tumoral). El valor obtenido se consideró como el número de veces que la expresión aumenta o disminuye, mayor de 2 se consideró sobreexpresión y valores menores de 0.5 como baja expresión.

Para realizar la clasificación, se consideró necesaria la expresión de al menos 75% de los genes por muestra y que la amplificación de los genes tuviera un Ct menor de 36 ciclos.

I. Clasificación molecular con base en el panel de Northcott y cols. (2012)

La clasificación molecular fue realizada como parte del trabajo de Barrera Velázquez y Eguía Aguilar (2022). Para ello, se utilizó el programa MEV (Multi Experiment Viewer v4.9.0) para el análisis de los datos y el agrupamiento jerárquico no supervisado con correlación de Pearson y enlace promedio. Posteriormente, se graficaron los valores en un mapa de calor y con base en el agrupamiento de las muestras con expresión similar se identificaron los grupos de moleculares⁷¹.

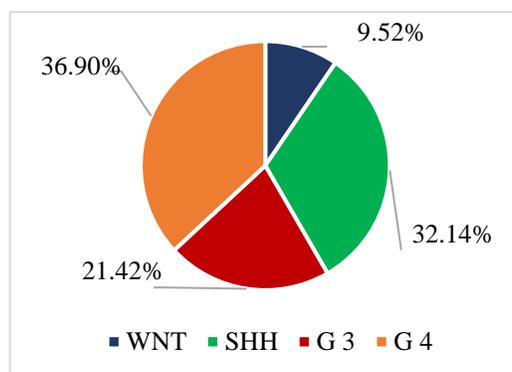
^c La base de datos puede solicitarse a los investigadores a través de los correos electrónicos: difropal@gmail.com y eguiapilar@yahoo.com.mx.

Por otro lado, se utilizó el programa R studio cloud v1.4 para el análisis de componentes principales (PCA) y la agrupación de las muestras con expresiones similares mediante los valores de correlación entre la expresión general de los genes y la expresión de cada muestra. En R los datos se escalaron y centraron con lo que la media y desviación se convierte en 1 y 0, respectivamente, con la finalidad de eliminar los valores extremos que pudieran desviar los puntos y dar observaciones falsas al momento de realizar el PCA⁷¹.

Dicho cálculo se utiliza para realizar la correlación entre todos los genes y las muestras, es decir, la similitud del gen “A” con el gen “B” y así sucesivamente hasta obtener la relación entre todos los genes. Los genes con una correlación cercana a 1 fueron los seleccionados para clasificar los grupos⁷¹.

Con base en los valores de expresión (*fold change* o número de veces que la expresión de la muestra es mayor o menor que los controles) y el agrupamiento jerárquico, se clasificaron 84 meduloblastomas de acuerdo con el panel de Northcott y colaboradores (2012) (tabla 11 y gráfica 4).

Tabla 11. Clasificación molecular de meduloblastomas mediante PCR utilizando el panel de genes de Northcott y cols. 2012				
Grupo molecular	WNT	SHH	G3	G4
Número de casos	8	27	18	31



Gráfica 4. Meduloblastomas clasificados por PCR de acuerdo con el panel de Northcott y cols., 2012.

Del resto de muestras: en nueve casos no se obtuvieron resultados, 12 casos se repitieron debido a que no arrojaron resultados en la primera ocasión a pesar de que sí hubo

amplificación del gen control *GADPH*, siete muestras se repitieron más de una vez empleando una alícuota nueva de RNA, y dos muestras se eliminaron.

De los cerebelos control, en 4 casos se pudo evaluar la expresión de los genes, pero en las otras dos muestras varios genes no se amplificaron.

9. Análisis de los datos:

Para evaluar la expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* se utilizó el mismo método descrito en el apartado de procedimientos para la evaluación de los 22 genes del panel de Northcott y cols. 2012.

Se utilizó la prueba de Shapiro–Wilk para evaluar la distribución de los datos. Después de descartar normalidad, se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la expresión promedio de los 5 genes entre los cuatro subgrupos moleculares (anexo 2).

Por último, para comparar la expresión de los genes entre los grupos G3 y G4 se usó la prueba U de Mann-Whitney (anexo 3).

Para el análisis estadístico y para la presentación gráfica de los resultados se utilizó el programa PRISM GraphPad.

10. Consideraciones éticas:

Este proyecto forma parte del proyecto central “Clasificación molecular de los meduloblastomas pediátricos”, el cual cuenta con la aprobación de los comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad del HIMFG (anexo 4).

De acuerdo con el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud^d, se clasifica como investigación sin riesgo debido a que no implica intervenciones directas en individuos⁷².

^d Título segundo, Cap. I (De los Aspectos Éticos de la Investigación en Seres Humanos): Art. 17. Título segundo, Cap. VI (De la Investigación en Órganos, Tejidos y sus Derivados, Productos y Cadáveres de Seres Humanos): Art. 59 y Art. 60.

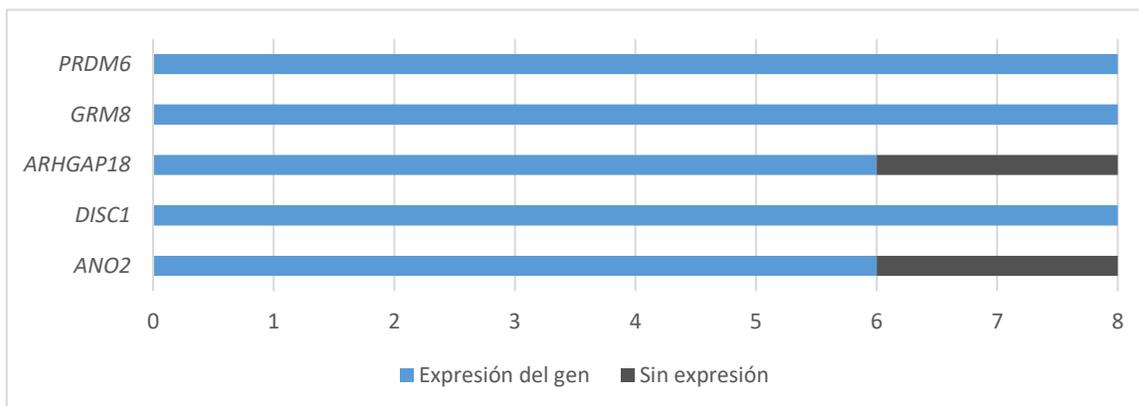
Adicionalmente, como parte de las consideraciones bioéticas se salvaguardó la confidencialidad de los datos personales extraídos de los reportes histopatológicos y tanto el protocolo de investigación como los resultados del estudio estará abiertos al acceso público.

Debido a la naturaleza del estudio, no se realizó la obtención de un nuevo consentimiento informado para la utilización de las muestras, únicamente se solicitó la aprobación por el Comité de Ética en Investigación (DG/1000/293/2019).

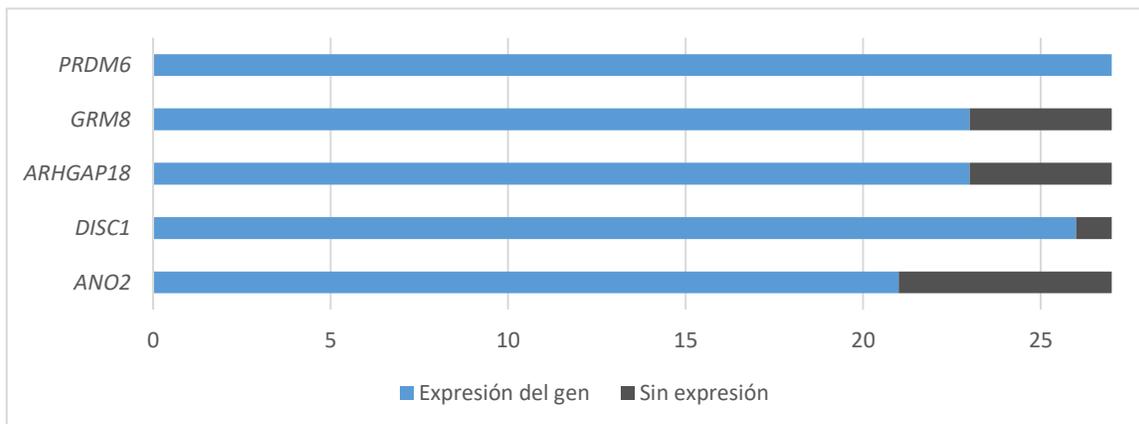
11. Resultados

Las gráficas 5 a 8 exponen el número de muestras por grupo molecular que expresaron los cinco genes evaluados.

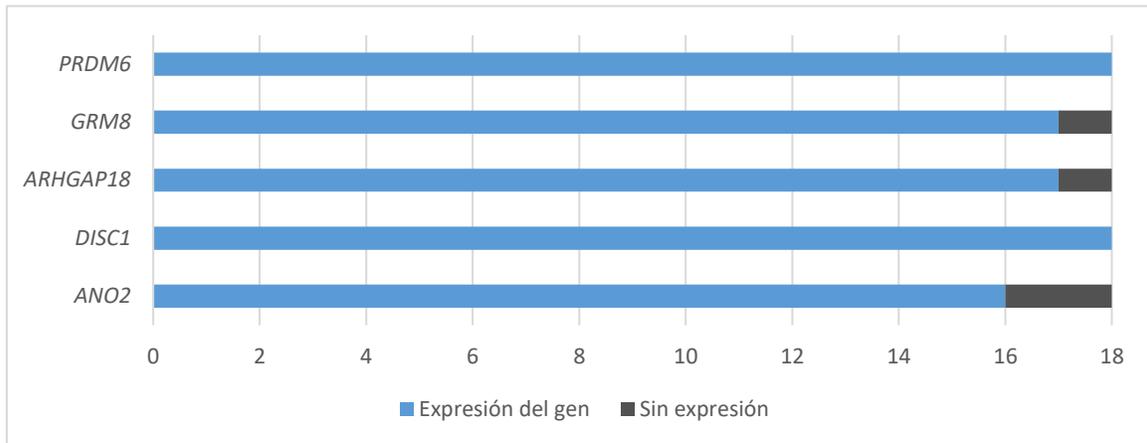
Gráfica 5. Número de casos en los que se observó expresión de los genes en el grupo WNT (n=8)



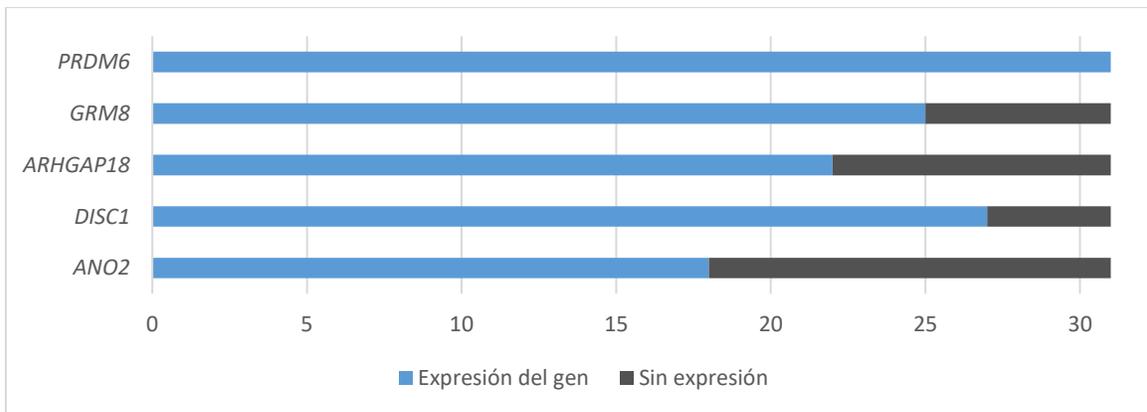
Gráfica 6. Número de casos en los que se observó expresión de los genes en el grupo SHH (n=27)



Gráfica 7. Número de casos en los que se observó expresión de los genes en el grupo 3 (n=18)



Gráfica 8. Número de casos en los que se observó expresión de los genes en el grupo 4 (n=31)



PRDM6 fue el único gen que se expresó en las 84 muestras. Cabe resaltar que el tamaño del producto amplificado de los genes evaluados fue de 120, 83, 129, 182 y 85 pares de bases para *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GRM8* y *PRDM6*, respectivamente.

Considerando que el tamaño ideal para la amplificación de genes en material fijado en formol y embebido en parafina es entre 80 y 150 pares de bases, con excepción de *GRM8*, los cuatro genes restantes cubrían dicha característica. Sin embargo, además del tamaño del gen, que es constante, hay variables, como la antigüedad del bloque, la conservación del material, el tiempo de fijación y el tamaño de la muestra, que se deben de considerar para asegurar la amplificación adecuada de los genes. En este caso, se utilizaron bloques de hasta 22 años de antigüedad y la conservación del material no fue óptima.

Las siguientes figuras exhiben la expresión de cada gen (logaritmo 2) según el grupo molecular. En A se muestra el porcentaje de muestras de acuerdo con la expresión de cada gen (\uparrow sobreexpresión, \downarrow subexpresión y = expresión normal). En B se grafica la expresión de cada muestra por grupo molecular. La línea punteada superior representa el límite para referir sobreexpresión (valor de expresión de 2 que en log2 corresponde 1) y la línea punteada inferior subexpresión (valor de expresión de 0.5 que en log2 corresponde a -1). Por lo tanto, todas las muestras entre 1 y -1 son muestras sin cambio en la expresión de los genes.

Fig. 10 A. <i>ANO2</i>			
Grupo molecular	% muestras expresión		
	\uparrow	\downarrow	=
WNT	84	0	16
SHH	24	62	14
G3	69	6	25
G4	94	0	6

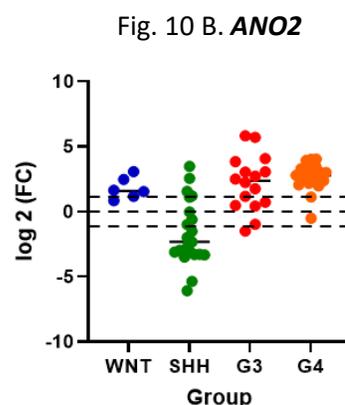


Figura 10. En A se observa aumento de la expresión de *ANO2* en los grupos WNT, G3 y G4, así como subexpresión en SHH. En B se grafica la expresión de cada muestra de acuerdo con el grupo molecular. La expresión de *ANO2* solo apoya la diferenciación de SHH con los grupos WNT, G3 y G4, p 0.0054, p <0.0001 y p <0.0001, respectivamente.

Figura 11 A. <i>DISC1</i>			
Grupo molecular	% muestras expresión		
	\uparrow	\downarrow	=
WNT	100	0	0
SHH	50	23	27
G3	67	11	22
G4	89	4	7

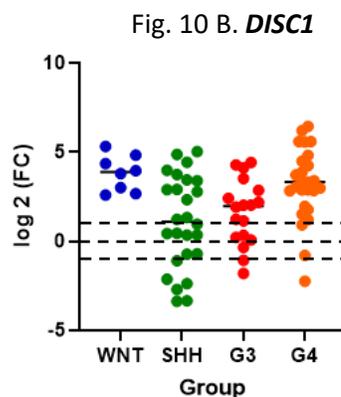


Figura 11. En A se observa aumento de la expresión de *DISC1* en todas las muestras WNT, así como aumento de expresión en G3 y G4. En B se grafica la expresión de cada muestra de

acuerdo con el grupo molecular. La expresión de *DISC1* apoya la diferenciación de WNT con SHH (p 0.0079) y G4 (p 0.0034), así como, la distinción entre G4 y SHH (p0.0033) y G3 (p 0.0093), pero no fue significativo para distinguir entre WNT y G4.

Figura 12 A. <i>ARHGAP18</i>			
Grupo molecular	% muestras expresión		
	↑	↓	=
WNT	17	17	66
SHH	39	35	26
G3	65	6	29
G4	64	0	36

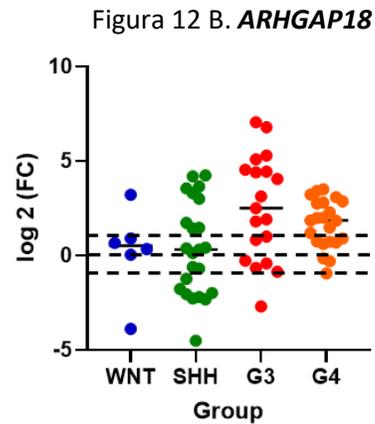


Figura 12. En A se observa aumento de la expresión de *ARHGAP18* en G3 y G4 y subexpresión en WNT. En B se grafica la expresión de cada muestra de acuerdo con el grupo molecular. La expresión de *ARHGAP18* solo fue estadísticamente significativa para diferenciar SHH de G3 (p 0.0122).

Figura 13 A. <i>GRM8</i>			
Grupo molecular	% muestras expresión		
	↑	↓	=
WNT	62.5	12.5	25
SHH	39	39	22
G3	76	12	12
G4	84	0	16

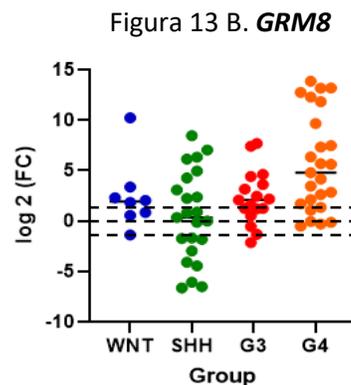


Figura 13. En A se observa aumento de la expresión de *GRM8* en WNT, G3 y G4. En B se grafica la expresión de cada muestra de acuerdo con el grupo molecular. La expresión de *GRM8* fue estadísticamente significativa para diferenciar G4 de SHH (p 0.0011) y G3 (0.0303).

Figura 14 A. <i>PRDM6</i>			
Grupo molecular	% muestras expresión		
	↑	↓	=
WNT	88	0	12
SHH	63	18.5	18.5
G3	67	11	22
G4	100	0	0

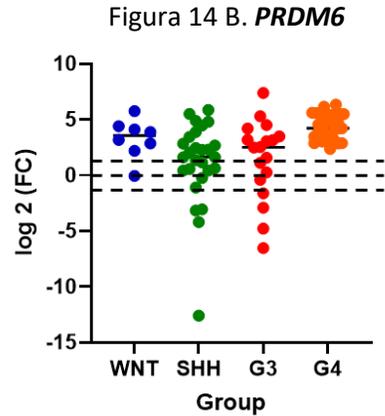


Figura 14. En A se observa aumento de la expresión de *PRDM6* en todos los subgrupos. En B se grafica la expresión de cada muestra de acuerdo con el grupo molecular. La expresión de *PRDM6* fue estadísticamente significativa para diferenciar G4 de SHH ($p < 0.0001$) y G3 (0.0003).

La tabla 12 muestra el promedio y la desviación estándar y la tabla 13 muestra la mediana y los valores mínimos y máximos de la expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* entre los cuatro grupos moleculares en comparación con los controles *GAPDH*.

Tabla 12. Promedio $2^{-\Delta\Delta CT}$ GAPDH FOLD CHANGE								
	WNT		SHH		G3		G4	
	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE	Promedio	DE
<i>ANO2</i>	4.00	2.51	1.34	2.64	11.54	17.43	7.85	4.58
<i>DISC1</i>	17.36	11.97	6.74	9.10	6.01	6.79	19.98	23.24
<i>ARHGAP18</i>	2.52	3.38	4.18	5.95	21.68	39.37	4.40	3.36
<i>GRM8</i>	152.92	421.81	30.77	77.20	27.65	61.15	1998.34	3934.41
<i>PRDM6</i>	16.21	16.83	9.62	14.68	16.89	38.84	27.22	19.89

DE (desviación estándar)

Tabla 13. Mediana 2 ⁻ ΔΔCT GAPDH FOLD CHANGE												
	WNT			SHH			G3			G4		
	Med.	Min.	Máx.	Med.	Min.	Máx.	Med.	Min.	Máx.	Med.	Min.	Máx.
<i>ANO2</i>	3.01	1.79	8.39	0.20	0.01	11.08	5.21	0.35	51.98	6.91	0.70	16.44
<i>DISC1</i>	14.69	6.04	28.54	2.13	0.09	32.78	3.9	0.28	21.33	9.95	0.21	87.14
<i>ARHGAP18</i>	1.42	0.06	9.31	1.24	0.04	19.02	3.78	0.15	133.43	3.61	0.52	9.38
<i>GRM8</i>	3.81	0.38	1196.82	1.26	0.01	350.92	4.18	0.22	205.78	27.56	0.70	9248.47
<i>PRDM6</i>	11.93	0.96	21.33	3.12	0.0001	57.88	5.67	0.01	167.15	18.57	5.15	80.72

Mediana (Med.), Mínimo (Mín), Máximo (Máx.)

La figura 15 expone el mapa de calor de la expresión de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GRM8* y *PRDM6* en los meduloblastomas según el grupo molecular.

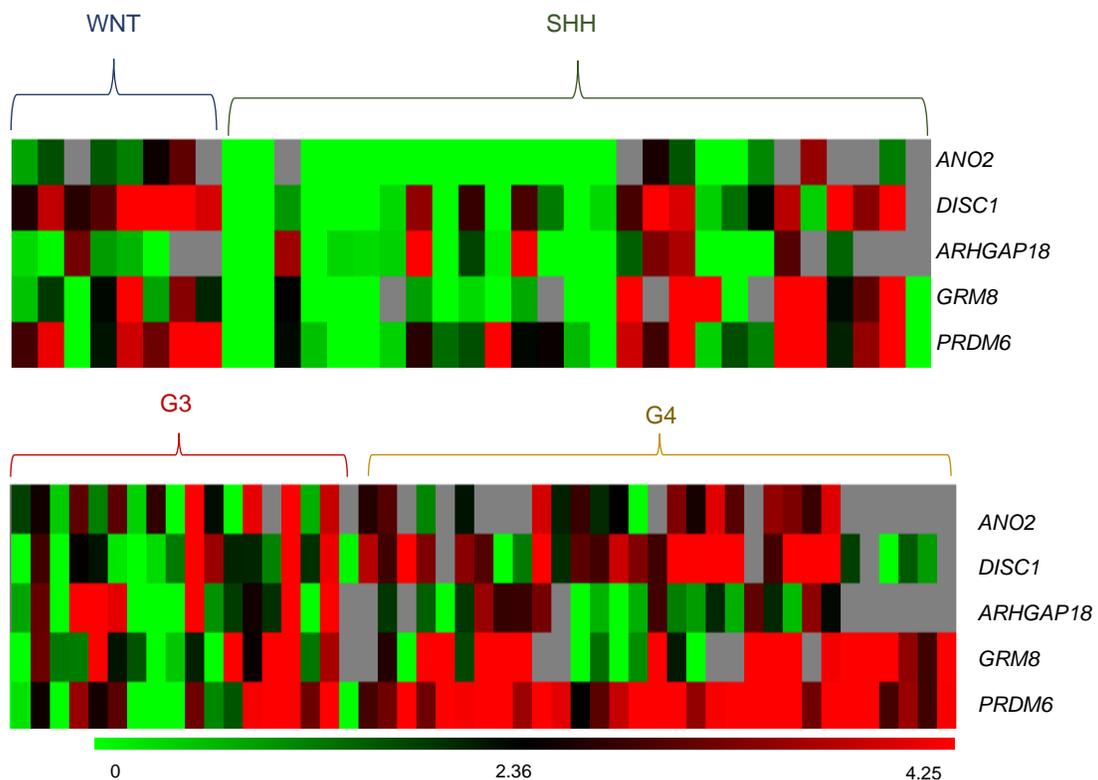


Figura 15. Mapa de calor de la expresión de los genes evaluados según el grupo molecular.

La prueba de Kruskal-Wallis evidenció que la expresión de *ANO2* ($p < 0.0001$), *DISC1* ($p < 0.0016$), *ARHGAP18* ($p < 0.0319$), *GMR8* ($p < 0.0060$) y *PRDM6* ($p < 0.0001$) variaba de forma significativa entre los cuatro grupos moleculares (anexo 3).

Mientras que con la prueba de U de Mann-Whitney, *DISC1*, *GRM8* y *PRDM6* mostraron diferencias estadísticas entre G3 y G4 ($p < 0.05$) (figura 16 y anexo 4).

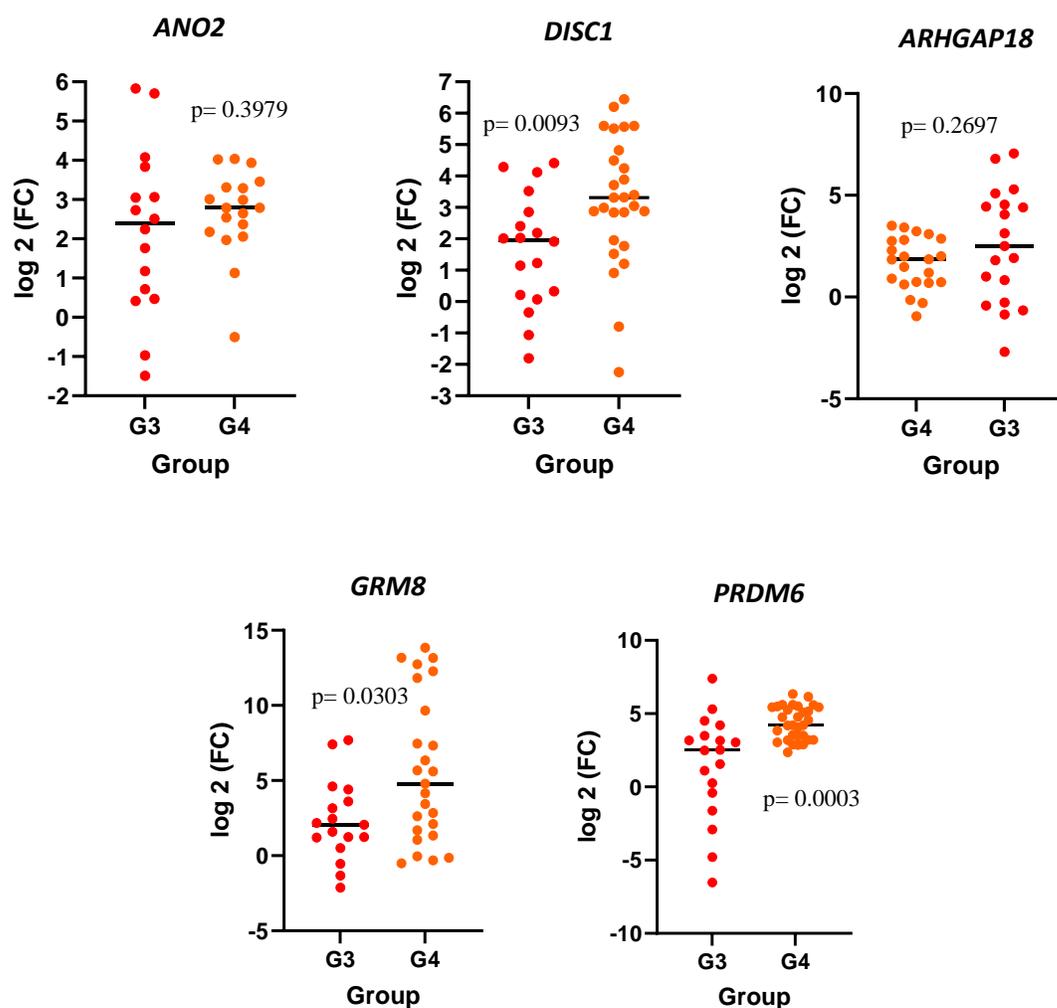


Figura 16. Diferencias de expresión de los cinco genes estudiados (log₂) entre G3 y G4.

12. Discusión

El abordaje clínico efectivo de los meduloblastomas no puede realizarse sin el conocimiento de su biología molecular. Las causas genéticas que dan origen a los meduloblastomas han

sido reconocidas en los grupos WNT y SHH, pero aún hay casos heterogéneos que plantean retos. A pesar de las múltiples propuestas sobre cómo dividir al grupo no WNT/no SHH (en 8 o más subtipos, en un espectro, en dos polos radicales o en tres grupos) sí se reconoce que la distinción, al momento pragmática, G3 y G4 es la opción preferible para desarrollar estudios que pudieran establecer el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes.

Con base en los resultados obtenidos, la sobreexpresión de *PRDM6* en el grupo 4 frente al grupo 3 concuerda con los resultados de Roussel & Stripay 2018, Menyhart et al. 2019 y Kumar et al. 2020.

Northcott y colaboradores (2017), asociaron aumento en la expresión de *PRDM6* en el grupo 4 al *enhancer hijacking* (secuestro de potenciadores). Asimismo, refieren su cercanía con el gen *SNCAIP*, regulado por dos *enhancers* o *superenhancers*, el cual está típicamente asociado con duplicaciones tándem en G4. En dicho contexto, las variantes estructurales de *SNCAIP* ocasionan que el enhancer esté en contacto con *PRDM6*, causando sobreexpresión. En el estudio de Northcott y cols. (2017) refirieron la sobreexpresión de *PRDM6* en G4 con un *fold change* superior a 20. En este trabajo, el *fold change* promedio del grupo 4 fue de 27.22, frente a los promedios de 16.21, 9.62 y 16.89 para WNT, SHH y G3 respectivamente.

Por su parte, Hendrikse y cols. (2022) refieren que alteraciones en el complejo CBFA, a través de *CBFA2T2*, *CBFA2T3*, *PRDM6* o *RUNX1T1*, se asocian al desarrollo de meduloblastomas G4, y específicamente en los grupos G4 α y G4 β , pero no en G4 γ . El rol de dicho complejo en el desarrollo cerebelar no está dilucidado, pero sus mutaciones resultan en fallas en la diferenciación de las células progenitoras de G4 en el labio rómbico subventricular⁴⁷.

En cuanto a la sobreexpresión de *GRM8* en el grupo 4 frente al grupo 3, dicho resultado concuerda con el estudio de Kunder y cols. 2013 y el reporte de expresión de RNAm de Kaur y cols. 2016. En el estudio de Kaur y colaboradores (2016), además intentaron evaluar la expresión de la proteína GRM8 mediante inmunohistoquímica, pero la clasificación fue insatisfactoria, aunque tal resultado pudo deberse a cambios postraduccionales en los niveles de la proteína.

Por último, Qin y cols. 2021 lo consideraron posible marcador del grupo 3, sin embargo, no hicieron comparaciones de su expresión frente al grupo 4.

En este proyecto *GRM8* se sobreexpresó en 76.47% de G3 vs 84% de G4, por lo que podría considerarse erróneo utilizarlo como marcador único para diferenciar entre ambos grupos, sería adecuado utilizarlo en conjunto con el resto de los genes evaluados.

GRM8 ha sido identificado como oncogen o como supresor tumoral, sin embargo, en este proyecto no se puede determinar su función principal porque no se analizaron otros parámetros clínicos, por lo cual es necesario realizar mayores estudios.

Referente a la expresión de *DISC1*, este es el primer trabajo que lo utiliza para la clasificación molecular de los meduloblastomas y su sobreexpresión en el grupo 4 apoya la distinción con el grupo 3 y el grupo SHH.

DISC1 actúa como regulador mitocondrial en axones y dendritas, y sus alteraciones se asocian a desarrollo anormal neuronal⁷³. La sobreexpresión de *DISC1*, con las subsecuentes alteraciones en la dinámica mitocondrial, se ha referido como factor para la progresión de glioblastomas, pero aún no se ha corroborado su papel en la tumorigénesis⁷⁴.

En estudios con pacientes con esquizofrenia, se ha postulado que *DISC1* podría tener un efecto dual: regulador del neurodesarrollo y oncogen en el desarrollo glioblastomas⁷⁵.

Por otro lado, Wu X y cols. (2020) estudiaron el RNA largo no codificante asociado al gen y refieren que la expresión diferencial de *DISC1* se correlaciona con el pronóstico de los pacientes con adenocarcinoma pulmonar⁷⁶, mientras que Wang S y cols. (2017) refieren en pacientes con carcinoma pulmonar de células no pequeñas la sobreexpresión de *DISC1* se asocia a fenotipos invasivos y peor pronóstico⁷⁷. En dicho estudio también se refiere que *DISC1* podría actuar como oncogén en el carcinoma pulmonar mediante la vía WNT mediante la inhibición de GSK3 β y activación de β -catenina⁷⁷.

Además de neoplasias pulmonares, alteraciones en la expresión de *DISC1* se asociaron a progresión en el condrosarcoma⁷⁸.

Debido a su relación con la vía WNT, los meduloblastomas de dicho grupo también presentaron sobreexpresión de *DISC1*, lo cual no apoyó la distinción entre el grupo WNT y G4 (p 0.5963).

Hasta ahora no está dilucidado el método efectivo para distinguir entre los grupos 3 y 4 en la práctica anatomopatológica cotidiana. En este trabajo, la sobreexpresión de *DISC1*, *GRM8* y *PRDM6* en el grupo 4 pudiera correlacionarse con su papel en la diferenciación neuronal, pero es necesario continuar con estudios subsecuentes.

Respecto a la diferencia de expresión de *ANO2*, esta puede apoyar para la distinción entre los cuatro grupos de meduloblastomas, pero, a diferencia del trabajo *in Silico* de Castillo Rodríguez y colaboradores (2018), en este estudio no fue posible distinguir entre los grupos G3 y G4 mediante su expresión.

Por último, la expresión de *ARHGAP18* no fue estadísticamente significativa para diferenciar G3 de G4.

Alteraciones en la expresión de dicho gen en tumores como el carcinoma de mama lo identifican como un gen potenciador de metástasis debido a su efecto en la transición epitelial-mesenquimal, asimismo, su sobreexpresión se ha asociado con menor supervivencia (global y libre de recurrencias); por lo que la sobreexpresión de *ARHGAP18* en G3 podría asociarse con la alta frecuencia de metástasis en dicho grupo (40%) y la baja supervivencia (20-50%). No obstante, es necesario realizar estudios tomando en cuenta las características clínicas y de supervivencia de los pacientes.

13. Conclusiones

La expresión diferencial de cada uno de los genes evaluados, *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6*, es estadísticamente significativa para distinguir entre los cuatro grupos principales de meduloblastomas.

Se sustenta la posibilidad de distinguir entre los grupos 3 y 4 con base en la expresión de *DISC1*, *PRDM6* y *GRM8*.

Es necesario validar la expresión de las proteínas codificadas por los genes evaluados mediante inmunohistoquímica para poder aplicar la clasificación molecular en el diagnóstico rutinario en países con recursos económicos limitados.

14. Alcances del estudio:

Utilizar ensayos PCR para clasificar eficientemente los meduloblastomas es el primer paso para posteriormente identificar la expresión de las proteínas mediante inmunohistoquímica con la intención de promover su aplicación rutinaria para el diagnóstico molecular en países con recursos económicos limitados.

Determinar la expresión de *DISC1*, *GMR8* y *PRDM6* es útil para distinguir entre los grupos 3 y 4 y da pauta a desarrollar trabajos con un panel de genes más efectivo para distinguir los tumores del grupo no WNT/SHH.

Estudiar las funciones de *DISC1* en el neurodesarrollo podría apoyar al mejor conocimiento de las células de origen de los meduloblastomas.

Estudios complementarios podrían enfocarse en la utilidad de *ANO2*, *DISC1*, *ARHGAP18*, *GMR8* y *PRDM6* para la subtipificación de los meduloblastomas.

15. Limitaciones del estudio:

Los estudios de PCR pueden verse limitados de acuerdo con la conservación del tejido y la degradación del RNA.

Trabajar con bloques de parafina puede ser un reto de acuerdo con el tiempo de almacenamiento del tejido (especialmente en muestras mayores a 8 años), el procesamiento inicial, la cantidad de tejido y la calidad del almacenamiento.

Los cerebelos control fueron obtenidos de tejido cadavérico por lo que los cambios de expresión génica posterior a un periodo de hipoxia y autólisis podrían modificar los hallazgos comparado con tejidos *in vivo*. Aunque diferentes estudios refieren que la integridad del ARNm en SNC no se compromete por el intervalo postmortem, las características de agonía sí se han asociado a disminución en la expresión génica.

Debido al recurso económico limitado, en esta fase del proyecto se inició la comprobación de la expresión de los genes evaluados mediante metilación sitio-específica, pero se concluirá en una fase subsecuente.

Trabajar únicamente con lesiones en pacientes pediátricos puede limitar el entendimiento del espectro molecular de los meduloblastomas.

Para un mayor entendimiento del comportamiento biológico de los meduloblastomas es necesario incorporar las variables clínicas.

Referencias

1. Northcott P, Shih H, Peacock J, et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 2012 488:49–56.
2. Ramaswamy V & Taylor M. Medulloblastoma: From Myth to Molecular. *J Clin Oncol* 2017, 356:2355:2363.
3. Juraschka K, & Taylor M. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *J Neurosurg Pediatr* 2019, 24, 353-363.
4. Northcott P, Robinson G, Kratz C, et al. Medulloblastoma. *Nature reviews: Disease primers* 2019, 5:11.
5. Kaur K, et al. Approach to molecular subgrouping of medulloblastomas: comparison for NanoString nCounter assay versus combination of immunohistochemistry and fluorescence in-situ hybridization in resource constrained centres. *Journal of Neuro-Oncology* 2019. Springer Nature.
6. Ellison DW, Giangaspero F, Ebehart CG, Haapasalo H, Pietsch T, Wiestler OD. Medulloblastoma (Chapter 8). In: *WHO Classification of Tumors of the Central Nervous* 2016: 183-200.
7. Yachnis A & Perry A. Embryonal neoplasms of the central nervous system, in Perry A & Brat D J (eds). *Practical Surgical Neuropathology. A diagnostic approach*. 2nd ed. Elsevier, 2018: 233-258.
8. Orr B A. Pathology, Diagnostics, and Classification of Medulloblastoma. *Brain Pathology* 2020. DOI 10.1111/bpa.12837.
9. Quinlan A & Rizzolo D. Understanding Medulloblastoma. *Journal of the American Academy of Physician Assistants* 2017, 30(10):30–36.
10. Millard N & De Braganca K. Medulloblastoma. *J Child Neurol* 2016, 31(12):1341-1353.
11. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2016. DOI 10.1007/s00401-016-1569-6.
12. Alharbi M, Mobark N, Bashawri Y, Safieh L, et al. Methylation Profiling of Medulloblastoma in a Clinical Setting Permits Sub-Classification and Reveals New Outcome Predictions. *Front Neurol* 2020, 11:167.

13. Northcott P, Dubuc A, Pfister S & Taylor M. Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 2012, 12(7): 871-884.
14. Taylor M, Northcott P, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012, 123:465-472.
15. Archer T, Mahoney E & Pomeroy S. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. *Neurotherapeutics* 2017, 14:265-273.
16. Cavalli F, Remke M, Rampasek L, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell* 2017, 31, 737–754.
17. Kuzan-Fischer C, Juraschka K & Taylor M. Medulloblastoma in the molecular era. *J Korean Neurosurg Soc* 2018, 61(3):292-301.
18. Kaur K, Kakkar A, Kumar A, et al. Integrating molecular subclassification of medulloblastoma into routine clinical practice: a simplified approach. *Brain Pathology* 2016, 26:334-343.
19. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones D, et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathologica* 2018, 136:181-210.
20. Torp SH, Solheim O, Skjulsvik AJ. The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know-a minireview. *Acta Neurochir (Wien)*. 2022 Sep;164(9):2453-2464.
21. Kristensen B, Priesterbach-Ackley L, Petersen J & Wesseling P. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Annals of Oncology* 2019, 30: 1265-1278.
22. Skowron P, Ramaswamy V & Taylor M. Genetic and molecular alterations across medulloblastoma subgroups. *Mol Med* 2015, 93:1075–1084. DOI 10.1007/s00109-015-1333-8.
23. Northcott P, Korshunov A, Witt H, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *Journal of Clinical Oncology* 2011, 29(11):1408-1414.
24. Roussel M & Stripay J. Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. *Cerebellum* 2018, 17:28-36.
25. Villavicencio Zepeda FJ y Eguía Aguilar MP. Clasificación molecular de los medulloblastomas en los pacientes del Hospital Infantil de México Federico

- Gómez/tesis que para obtener el grado de Especialista en Medicina (Patología Pediátrica) 2017, Universidad Nacional Autónoma de México.
26. Louis D. N. & cols. The 2021 WHO Classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Neuro-Oncology*. XX(XX), 2021:1-21.
 27. Pietsch T & Haberler C. Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma –a practical diagnostic guideline. *Clinical Neuropathology* 2016, 35(6): 344-352.
 28. Lastowska M, Trubicka J, Niemira M, Paczkowska-Abdulsalam M, Karkucińska-Więckowska A, Kaleta M, Drogosiewicz M, Perek-Polnik M, Krętowski A, Cukrowska B, Grajkowska W, Dembowska-Bagińska B, Matyja E. Medulloblastoma with transitional features between Group 3 and Group 4 is associated with good prognosis. *J Neurooncol*. 2018 Jun;138(2):231-240.
 29. Northcott P, Shih D, Remke M, Cho Y, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 2012, 123: 615-626.
 30. Leal L, Evangelista A, de Paula F, et al. Reproducibility of the Nano String 22-gene molecular subgroup assay for improved prognostic prediction of medulloblastoma. *Neuropathology* 2018, doi:10.1111/neup.12508.
 31. Kunder R, Jalali R, Sridhar E, Moiyadi A, et al. Real time PCR assay based on the differential expression of microRNAs and protein-coding genes for molecular classification of formalin-fixed paraffin embedded medulloblastomas. *Neuro-Oncology* 2013, 15(12):1644-1651.
 32. Veiga Cruzeiro G, Bezerra K, Oliveira C, Baumgartner M, et al. A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma. *Acta Neuropathologica Communications* 2019, 7:33.
 33. Kumar R, Liu A, Orr B, Northcott P & Robinson G. Advances in the classification of pediatric brain tumors through DNA methylation profiling: from research tool to frontline diagnostic. *Cancer* 2018, doi:10.1002/cnr.31583.
 34. Sharma T, Schwalbe E, Williamson D, Sill M et al. Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathologica* 2019, 138:309-326.

35. Cotter J. & Hawkins C. Medulloblastoma: WHO 2021 and beyond. *Pediatric and Developmental Pathology*, 2022, 25(I) 23-33.
36. Kallay L, Keskin H, Ross A, Rupji M, Moody OA, Wang X, Li G, Ahmed T, Rashid F, Stephen MR, Cottrill KA, Nuckols TA, Xu M, Martinson DE, Tranghese F, Pei Y, Cook JM, Kowalski J, Taylor MD, Jenkins A, Pomeranz Krummel DA, Sengupta S. Modulating native GABAA receptors in medulloblastoma with positive allosteric benzodiazepine-derivatives induces cell death. *J Neurooncol*. 2019 May;142(3):411-422.
37. Laneve P, Caffarelli E. The Non-coding Side of Medulloblastoma. *Front Cell Dev Biol*. 2020 May 27;8:275.
38. Eberhart CG. In search of the medulloblast: neural stem cells and embryonal brain tumors. *Neurosurg Clin N Am*. 2007 Jan;18(1):59-69, viii-ix. doi: 10.1016/j.nec.2006.10.005.
39. Phoenix TN. The origins of medulloblastoma tumours in humans. *Nature*. 2022 Sep;609(7929):901-903.
40. Williamson D, Schwalbe EC, Hicks D, Aldinger KA, Lindsey JC, Crosier S, Richardson S, Goddard J, Hill RM, Castle J, Grabovska Y, Hacking J, Pizer B, Wharton SB, Jacques TS, Joshi A, Bailey S, Clifford SC. Medulloblastoma group 3 and 4 tumors comprise a clinically and biologically significant expression continuum reflecting human cerebellar development. *Cell Rep*. 2022 Aug 2;40(5):111162.
41. Gibson P, Tong Y, Robinson G, Thompson MC, Currle DS, Eden C, Kranenburg TA, Hogg T, Poppleton H, Martin J, Finkelstein D, Pounds S, Weiss A, Patay Z, Scoggins M, Ogg R, Pei Y, Yang ZJ, Brun S, Lee Y, Zindy F, Lindsey JC, Taketo MM, Boop FA, Sanford RA, Gajjar A, Clifford SC, Roussel MF, McKinnon PJ, Gutmann DH, Ellison DW, Wechsler-Reya R, Gilbertson RJ. Subtypes of medulloblastoma have distinct developmental origins. *Nature*. 2010 Dec 23;468(7327):1095-9.
42. Smit MJ, Martini TEI, Armandari I, Bočkaj I, Zomerman WW, de Camargo Magalhães ES, Siragna Z, Meeuwssen TGJ, Scherpen FJG, Schoots MH, Ritsema M, den Dunnen WFA, Hoving EW, Paridaen JTML, de Haan G, Guryev V, Bruggeman SWM. The developmental stage of the medulloblastoma cell-of-origin restricts Sonic

- hedgehog pathway usage and drug sensitivity. *J Cell Sci.* 2022 Jun 1;135(11):jeb258608.
43. Lu QR, Qian L, Zhou X. Developmental origins and oncogenic pathways in malignant brain tumors. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2019 Jul;8(4):e342.
 44. Funakoshi Y, Sugihara Y, Uneda A, Nakashima T, Suzuki H. Recent advances in the molecular understanding of medulloblastoma. *Cancer Sci.* 2022 Dec 15. doi: 10.1111/cas.15691. Epub ahead of print. PMID: 36520034.
 45. Jessa S, Blanchet-Cohen A, Krug B, Vladoiu M, Coutelier M, Faury D, Poreau B, De Jay N, Hébert S, Monlong J, Farmer WT, Donovan LK, Hu Y, McConechy MK, Cavalli FMG, Mikael LG, Ellezam B, Richer M, Allaire A, Weil AG, Atkinson J, Farmer JP, Dudley RWR, Larouche V, Crevier L, Albrecht S, Filbin MG, Sartelet H, Lutz PE, Nagy C, Turecki G, Costantino S, Dirks PB, Murai KK, Bourque G, Ragoussis J, Garzia L, Taylor MD, Jabado N, Kleinman CL. Stalled developmental programs at the root of pediatric brain tumors. *Nat Genet.* 2019 Dec;51(12):1702-1713. doi: 10.1038/s41588-019-0531-7.
 46. Hooper CM, Hawes SM, Kees UR, Gottardo NG, Dallas PB. Gene expression analyses of the spatio-temporal relationships of human medulloblastoma subgroups during early human neurogenesis. *PLoS One.* 2014 Nov 20;9(11): e112909.
 47. Hendrikse LD, Haldipur P, Saulnier O, Millman J, Sjoboen AH, Erickson AW, Ong W, Gordon V, Coudière-Morrison L, Mercier AL, Shokouhian M, Suárez RA, Ly M, Borlase S, Scott DS, Vladoiu MC, Farooq H, Sirbu O, Nakashima T, Nambu S, Funakoshi Y, Bahcheli A, Diaz-Mejia JJ, Golser J, Bach K, Phuong-Bao T, Skowron P, Wang EY, Kumar SA, Balin P, Visvanathan A, Lee JJY, Ayoub R, Chen X, Chen X, Mungall KL, Luu B, Bérubé P, Wang YC, Pfister SM, Kim SK, Delattre O, Bourdeaut F, Doz F, Masliah-Planchon J, Grajkowska WA, Loukides J, Dirks P, Fèvre-Montange M, Jouvét A, French PJ, Kros JM, Zitterbart K, Bailey SD, Eberhart CG, Rao AAN, Giannini C, Olson JM, Garami M, Hauser P, Phillips JJ, Ra YS, de Torres C, Mora J, Li KKW, Ng HK, Poon WS, Pollack IF, López-Aguilar E, Gillespie GY, Van Meter TE, Shofuda T, Vibhakar R, Thompson RC, Cooper MK, Rubin JB, Kumabe T, Jung S, Lach B, Iolascon A, Ferrucci V, de Antonellis P, Zollo M, Cinalli G, Robinson S, Stearns DS, Van Meir EG, Porrati P, Finocchiaro G, Massimino M,

- Carlotti CG, Faria CC, Roussel MF, Boop F, Chan JA, Aldinger KA, Razavi F, Silvestri E, McLendon RE, Thompson EM, Ansari M, Garre ML, Chico F, Eguía P, Pérezpeña M, Morrissy AS, Cavalli FMG, Wu X, Daniels C, Rich JN, Jones SJM, Moore RA, Marra MA, Huang X, Reimand J, Sorensen PH, Wechsler-Reya RJ, Weiss WA, Pugh TJ, Garzia L, Kleinman CL, Stein LD, Jabado N, Malkin D, Ayrault O, Golden JA, Ellison DW, Doble B, Ramaswamy V, Werbowetski-Ogilvie TE, Suzuki H, Millen KJ, Taylor MD. Failure of human rhombic lip differentiation underlies medulloblastoma formation. *Nature*. 2022 Sep;609(7929):1021-1028. doi: 10.1038/s41586-022-05215-w. Epub 2022 Sep 21. Erratum in: *Nature*. 2022 Dec;612(7940):E12.
48. Cho YJ, Tsherniak A, Tamayo P, Santagata S, Ligon A, Greulich H, Berhoukim R, Amani V, Goumnerova L, Eberhart CG, Lau CC, Olson JM, Gilbertson RJ, Gajjar A, Delattre O, Kool M, Ligon K, Meyerson M, Mesirov JP, Pomeroy SL. Integrative genomic analysis of medulloblastoma identifies a molecular subgroup that drives poor clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2011 Apr 10;29(11):1424-30.
49. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, Troost D, Meeteren NS, Caron HN, Cloos J, Mrsić A, Ylstra B, Grajkowska W, Hartmann W, Pietsch T, Ellison D, Clifford SC, Versteeg R. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*. 2008 Aug 28;3(8):e3088.
50. Luo Z, Xia M, Shi W, Zhao C, Wang J, Xin D, Dong X, Xiong Y, Zhang F, Berry K, Ogurek S, Liu X, Rao R, Xing R, Wu LMN, Cui S, Xu L, Lin Y, Ma W, Tian S, Xie Q, Zhang L, Xin M, Wang X, Yue F, Zheng H, Liu Y, Stevenson CB, de Blank P, Perentesis JP, Gilbertson RJ, Li H, Ma J, Zhou W, Taylor MD, Lu QR. Human fetal cerebellar cell atlas informs medulloblastoma origin and oncogenesis. *Nature*. 2022 Dec;612(7941):787-794.
51. Zhang W, Schmelzeisen S, Parthier D, Frings S, Möhrlen F. Anoctamin Calcium-Activated Chloride Channels May Modulate Inhibitory Transmission in the Cerebellar Cortex. *PLoS One*. 2015 Nov 11;10(11):e0142160. doi: 10.1371/journal.pone.0142160. PMID: 26558388; PMCID: PMC4641602.

52. Banerjee J, Leung CT, Li A, Peterson-Yantorno K, Ouyang H, Stamer WD, Civan MM. Regulatory Roles of Anoctamin-6 in Human Trabecular Meshwork Cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2017 Jan 1;58(1):492-501. doi: 10.1167/iovs.16-20188. PMID: 28125837; PMCID: PMC5283088.
53. Castillo Rodríguez R. A., Dávila Borja V. M. y Juárez Méndez S. Data mining of pediatric medulloblastoma microarray expression reveals a novel potential subdivision of the group 4 molecular subgroup. *Oncology letters* (15) 2018: 6241-6250.
54. Su P, Zhang H, Wong AHC, Liu F. The DISC1 R264Q variant increases affinity for the dopamine D2 receptor and increases GSK3 activity. *Mol Brain.* 2020 Jun 3;13(1):87. doi: 10.1186/s13041-020-00625-1. PMID: 32493513; PMCID: PMC7271519.
55. Ren J, Zhao T, Xu Y, Ye H. Interaction between DISC1 and CHL1 in regulation of neurite outgrowth. *Brain Res.* 2016 Oct 1;1648(Pt A):290-297. doi: 10.1016/j.brainres.2016.06.033. Epub 2016 Jun 23. PMID: 27346367.
56. Srihari S, Ragan MA. Systematic tracking of dysregulated modules identifies novel genes in cancer. *Bioinformatics.* 2013 Jun 15;29(12):1553-61.
57. Vladoiu MC, El-Hamamy I, Donovan LK, Farooq H, Holgado BL, Sundaravadanam Y, Ramaswamy V, Hendrikse LD, Kumar S, Mack SC, Lee JJY, Fong V, Juraschka K, Przelicki D, Michealraj A, Skowron P, Luu B, Suzuki H, Morrissy AS, Cavalli FMG, Garzia L, Daniels C, Wu X, Qazi MA, Singh SK, Chan JA, Marra MA, Malkin D, Dirks P, Heisler L, Pugh T, Ng K, Notta F, Thompson EM, Kleinman CL, Joyner AL, Jabado N, Stein L, Taylor MD. Childhood cerebellar tumours mirror conserved fetal transcriptional programs. *Nature.* 2019 Aug;572(7767):67-73.
58. Humphries B, Wang Z, Li Y, Jhan JR, Jiang Y, Yang C. ARHGAP18 Downregulation by miR-200b Suppresses Metastasis of Triple-Negative Breast Cancer by Enhancing Activation of RhoA. *Cancer Res.* 2017 Aug 1;77(15):4051-4064.
59. Ishihara E, Nishina H. The Hippo-YAP Pathway Regulates 3D Organ Formation and Homeostasis. *Cancers (Basel).* 2018 Apr 17;10(4):122.
60. Katoh M, Katoh M. Characterization of human ARHGAP10 gene in silico. *Int J Oncol.* 2004 Oct; 25(4):1201-6. PMID: 15375573.

61. Huang SX, Zhao ZY, Weng GH, He XY, Wu CJ, Fu CY, Sui ZY, Zhong XM, Liu T. The correlation of microRNA-181a and target genes with poor prognosis of glioblastoma patients. *Int J Oncol.* 2016 Jul;49(1):217-24.
62. Zhang C, Xie S, Yuan S, Zhang Y, Bai Y, Chu L, Wu Z, Guo N, Wang Q, Zhang J. Metabotropic Glutamate Receptor 8 Is Regulated by miR-33a-5p and Functions as an Oncogene in Breast Cancer. *J Oncol.* 2021 Dec 14;2021: 8002087.
63. Qin C, Pan Y, Li Y et al. Novel Molecular Hallmarks of Group 3 Medulloblastomas by Single-Cell Transcriptomics. *Frontiers in Oncology.* 2021:11.
64. Menyhárt O, Giangaspero F, Gyórfy B. Molecular markers and potential therapeutic targets in non-WNT/non-SHH (group 3 and group 4) medulloblastomas. *J Hematol Oncol.* 2019 Mar 15;12(1):29.
65. Kumar R., Liu A. & Northcott P. Medulloblastoma genomics in the modern molecular era. *Brain Pathology* (30) 2020: 679-690.
66. Northcott P, Buchhalter I, Morrissy A, Hovestadt V et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 2017, 547(7663):311-317. doi:10.1038/nature22973.
67. Vicenteño León AI y Eguía Aguilar MP. Variantes moleculares de medulloblastomas mediante ensayos RT-qPCR en pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez/tesis que para obtener el grado de Especialista en Medicina (Patología Pediátrica) 2022, Universidad Nacional Autónoma de México.
68. Tomita, H., Vawter, M.P., Walsh, D.M., Evans, S.J., Choudary, P.V., Li, J., et al., 2004. Effect of agonal and postmortem factors on gene expression profile: quality control in microarray analyses of postmortem human brain. *Biol. Psychiatr.* 55 (4), 346–352.
69. Zhu Y, Wang L, Yin Y, Yang E. Systematic analysis of gene expression patterns associated with postmortem interval in human tissues. *Sci Rep.* 2017 Jul 14;7(1):5435.
70. Ervin JF, Heinzen EL, Cronin KD, Goldstein D, Szymanski MH, Burke JR, Welsh-Bohmer KA, Hulette CM. Postmortem delay has minimal effect on brain RNA integrity. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2007 Dec;66(12):1093-9.

71. Barrera Velázquez, Carlos Daniel y Eguía Aguilar MP. Clasificación molecular de meduloblastomas por RT-QPCR en el Hospital Infantil de México Federico Gómez / tesis que para obtener el título de Licenciado en Química Farmacéutico-Biológica 2022, Universidad Nacional Autónoma de México.
72. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Junio 2020, sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>.
73. Norkett R, Modi S, Birsa N, Atkin TA, Ivankovic D, Pathania M, Trossbach SV, Korth C, Hirst WD, Kittler JT. DISC1-dependent Regulation of Mitochondrial Dynamics Controls the Morphogenesis of Complex Neuronal Dendrites. *J Biol Chem*. 2016 Jan 8;291(2):613-29.
74. Gao X, Mi Y, Guo N, Hu Z, Hu F, Liu D, Gao L, Gou X, Jin W. Disrupted in schizophrenia 1 (DISC1) inhibits glioblastoma development by regulating mitochondria dynamics. *Oncotarget*. 2016 Dec 27;7(52):85963-85974.
75. Gao X, Mi Y, Guo N, Xu H, Jiang P, Zhang R, Xu L, Gou X. Glioma in Schizophrenia: Is the Risk Higher or Lower? *Front Cell Neurosci*. 2018 Sep 3;12:289.
76. Wu X, Sui Z, Zhang H, Wang Y, Yu Z. Integrated Analysis of lncRNA-Mediated ceRNA Network in Lung Adenocarcinoma. *Front Oncol*. 2020 Sep 15;10:554759.
77. Wang S, Chen YY, Li YP, Gu J, Gu SD, Shi H, Li XS, Lu XN, Li X, Zhang SL, Yu KJ, Liu K, Ji LL. DISC1 overexpression promotes non-small cell lung cancer cell proliferation. *Oncotarget*. 2017 May 22;8(39):65199-65210.
78. He L, Shi X, Chen R, Wu Z, Yang Z, Li Z. Association of Mental Health-Related Proteins DAXX, DRD3, and DISC1 With the Progression and Prognosis of Chondrosarcoma. *Front Mol Biosci*. 2019 Nov 26;6:134.

Anexos

Anexo 1. Panel de genes validado por Northcott y colaboradores 2012^{d,29}.

Gene symbol	Accession	Gene description	Cytohand	Subgroup-specific fold-change
WNT				
<i>WIF1</i>	NM 007191	WNT inhibitory factor 1	12q14.3	236.4
<i>TNC</i>	NM 002160	tenascin C	9q33	65.9
<i>GAD1</i>	NM 000817	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67 kDa)	2q31	63.2
<i>DKK2</i>	NM 014421	dickkopf homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	4q25	55.9
<i>EMX2</i>	NM 004098	empty spiracles homeobox 2	10q26.1	44.7
SHH				
<i>PDLIM3</i>	NM 014476	PDZ and LIM domain 3	4q35	32.1
<i>EYA1</i>	NM 172059	eyes absent homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	8q13.3	20.8
<i>HHIP</i>	NM 022475	hedgehog interacting protein	4q28-q32	19.9
<i>ATOH1</i>	NM 005172	atonal homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	4q22	15.6
<i>SFRP1</i>	NM 003012	secreted frizzled-related protein 1	8p12-p11.1	15.5
Group C				
<i>IMPG2</i>	NM 016247	interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	3q12.2-q12.3	15.1
<i>GABRA5</i>	NM 000810	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor alpha 5	15q11.2-q12	14.6
<i>EGFL11</i>	NM 198283	eyes shut homolog (<i>Drosophila</i>)	6q12	13.4
<i>NRL</i>	NM 006177	neural retina leucine zipper	14q11.1-q11.2	11.5
<i>MAB21L2</i>	NM 006439	mab-21-like 2 (<i>C. elegans</i>)	4q31	10.9
<i>NPR3</i>	NM 000908	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	5p14-p13	8.2
Group D				
<i>KCNA1</i>	NM 000217	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1 (episodic ataxia with myokymia)	12p13.32	16.4
<i>EOMES</i>	NM 005442	eomesodermin	3p21.3-p21.2	13
<i>KHDRBS2</i>	NM 152688	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 2	6q11.1	10.8
<i>RBM24</i>	NM 153020	RNA binding motif protein 24	6p22.3	10.7
<i>UNC5D</i>	NM 080872	unc-5 homolog D (<i>C. elegans</i>)	8p12	10.7
<i>OASI</i>	NM 016816	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa	12q24.1	10.5

^d El grupo C corresponde al grupo 3 y el grupo D al grupo 4.

Anexo 2. Pruebas de Shapiro-Wilk y de Kruskal-Wallis por gen evaluado.

ANO 2

	WNT	SHH	G3	G4
Number of values	6	21	16	18
Shapiro-Wilk test				
W	0.8518	0.5544	0.6338	0.9317
P value	0.1627	<0.0001	<0.0001	0.2082
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	Yes
P value summary	ns	****	****	ns
Kruskal-Wallis test				
P value	<0.0001			
Exact or approximate P value?	Approximate			
P value summary	****			
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes			
Number of groups	4			
Kruskal-Wallis statistic	27.08			
Data summary				
Number of treatments (columns)	4			
Number of values (total)	61			

ARHGAP18

	WNT	SHH	G3	G4
Number of values	6	23	19	22
Shapiro-Wilk test				
W	0.6740	0.7084	0.6293	0.8912
P value	0.0032	<0.0001	<0.0001	0.0199
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No
P value summary	**	****	****	*
Kruskal-Wallis test				
P value	0.0319			
Exact or approximate P value?	Approximate			
P value summary	*			
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes			
Number of groups	4			
Kruskal-Wallis statistic	8.814			
Data summary				
Number of treatments (columns)	4			
Number of values (total)	70			

DISC 1

	WNT	SHH	G3	G4
Number of values	8	26	18	27
Shapiro-Wilk test				
W	0.8905	0.7450	0.7704	0.7669
P value	0.2367	<0.0001	0.0006	<0.0001
Passed normality test (alpha=0.05)?	Yes	No	No	No
P value summary	ns	****	***	****
Kruskal-Wallis test				
P value		0.0016		
Exact or approximate P value?		Approximate		
P value summary		**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?		Yes		
Number of groups		4		
Kruskal-Wallis statistic		15.24		
Data summary				
Number of treatments (columns)		4		
Number of values (total)		79		

GRM 8

	WNT	SHH	G3	G4
Number of values	8	23	17	25
Shapiro-Wilk test				
W	0.4247	0.4604	0.4851	0.5882
P value	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No
P value summary	****	****	****	****
Kruskal-Wallis test				
P value		0.0060		
Exact or approximate P value?		Approximate		
P value summary		**		
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?		Yes		
Number of groups		4		
Kruskal-Wallis statistic		12.45		
Data summary				
Number of treatments (columns)		4		
Number of values (total)		73		

PRDM 6

	WNT	SHH	G3	G4
Number of values	8	27	18	31
Shapiro-Wilk test				
W	0.7942	0.6732	0.4494	0.8817
P value	0.0248	<0.0001	<0.0001	0.0026
Passed normality test (alpha=0.05)?	No	No	No	No
P value summary	*	****	****	**
Kruskal-Wallis test				
P value	<0.0001			
Exact or approximate P value?	Approximate			
P value summary	****			
Do the medians vary signif. (P < 0.05)?	Yes			
Number of groups	4			
Kruskal-Wallis statistic	24.23			
Data summary				
Number of treatments (columns)	4			
Number of values (total)	84			

Anexo 3. Pruebas de U de Mann-Whitney por gen evaluado, comparando parejas entre los 4 grupos.

ANO 2

WNT vs SHH		WNT vs G3	
P value	0.0054	P value	0.7045
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

WNT vs G4		SHH vs G3	
P value	0.0542	P value	<0.0001
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

SHH vs G4		G3 vs G4	
P value	<0.0001	P value	0.3979
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

DISC 1

WNT vs SHH		WNT vs G3	
P value	0.0079	P value	0.0034
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

WNT vs G4		SHH vs G3	
P value	0.5963	P value	0.6663
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

SHH vs G4		G3 vs G4	
P value	0.0033	P value	0.0093
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

ARHGAP18

WNT vs SHH		WNT vs G3	
P value	>0.9999	P value	0.1212
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

WNT vs G4		SHH vs G3	
P value	0.1015	P value	0.0122
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

SHH vs G4		G3 vs G4	
P value	0.0544	P value	0.2697
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

GRM 8

WNT vs SHH		WNT vs G3	
P value	0.2748	P value	0.8419
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

WNT vs G4		SHH vs G3	
P value	0.0891	P value	0.1409
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	No	Significantly different (P < 0.05)?	No
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

SHH vs G4		G3 vs G4	
P value	0.0011	P value	0.0303
Exact or approximate P value?	Exact	Exact or approximate P value?	Exact
Significantly different (P < 0.05)?	Yes	Significantly different (P < 0.05)?	Yes
One- or two-tailed P value?	Two-tailed	One- or two-tailed P value?	Two-tailed

PRDM 6

WNT vs SHH
P value **0.0864**
Exact or approximate P value? Exact
Significantly different (P < 0.05)? No
One- or two-tailed P value? Two-tailed

WNT vs G3
P value **0.1961**
Exact or approximate P value? Exact
Significantly different (P < 0.05)? No
One- or two-tailed P value? Two-tailed

WNT vs G4
P value **0.1087**
Exact or approximate P value? Exact
Significantly different (P < 0.05)? No
One- or two-tailed P value? Two-tailed

SHH vs G3
P value 0.7526
Exact or approximate P value? Exact
Significantly different (P < 0.05)? No
One- or two-tailed P value? Two-tailed

SHH vs G4
P value **<0.0001**
Exact or approximate P value? Exact
Significantly different (P < 0.05)? Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed

G3 vs G4
P value **0.0003**
Exact or approximate P value? Exact
Significantly different (P < 0.05)? Yes
One- or two-tailed P value? Two-tailed

Anexo 4. Aprobación de los comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad del HIMFG.



Hospital Infantil de México Federico Gómez
Instituto Nacional de Salud
Dirección General

Ciudad de México, a 23 de abril de 2019

DG/1000/ 293 /2019

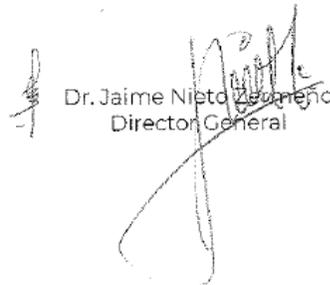
Dra. Pilar Eguía Aguilar
Departamento de Patología Clínica y Experimental
Presente

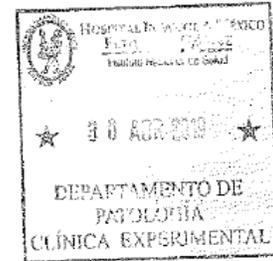
Informo a usted, que los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad, después de haber revisado su proyecto HIM-2018-092 FF "CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE MEDULOBLASTOMAS PEDIÁTRICOS", han emitido el dictamen de:

APROBADO

En los términos y condiciones señalados por dichos Comités. Por lo anterior, se autoriza su desarrollo.

Atentamente


Dr. Jaime Nieto Zeaño
Director General



Con copia:
Lic. Martha Reynoso Robles. Jefa del Departamento Administrativo de Control y Gestión a la Investigación.

JNZ/JGE/MSG/vzn

Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Alcaldía Cuauhtémoc, C.P. 06720, Ciudad de México;
conmutador: (55) 5228-9917, ext. 4322 y 4315 www.himfg.edu.mx

