



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

UNIDAD MÉDICA DE ALTA ESPECIALIDAD HOSPITAL DE PEDIATRÍA

CENTRO MÉDICO NACIONAL SIGLO XXI

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

TÍTULO:

“ PRESENCIA DE NEUROESFERAS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE GLIOMAS
PONTINOS INTRÍNSECOS DIFUSOS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS Y
EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE H3K27M ”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ONCOLOGÍA PEDIÁTRICA

PRESENTA

SARA MARÍA RIVERA VELÁSQUEZ

Tutor de Tesis

DR. JAVIER ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR

Director Médico UMAE HP CMN SXXI

Onco_lab@yahoo.com.mx 56276900 Ext. 22528

DRA ANA PAULINA RIOSCOVIAN SOTO

Jefe del Departamento Clínico Oncología

Ana.rioscoivan@imss.gob.mx 56276900 Ext. 22500

Colaboradores

DRA. ALICIA GEORGINA SIORDIA REYES

Jefe del Departamento de Patología

alicia.siordia@imss.gob.mx 56276900 Ext. 22350

KAREN AMALINALLI AYALA CONTRERAS

Bioquímica Diagnóstica

a.ayalac29@gmail.com 56276900 Ext. 22528

ELIZABETH MORALES CALIXTO

Bióloga

eliza.mc0892@gmail.com 56276900 Ext. 22528

Facultad de Medicina



Ciudad Universitaria, Ciudad de México, Junio 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

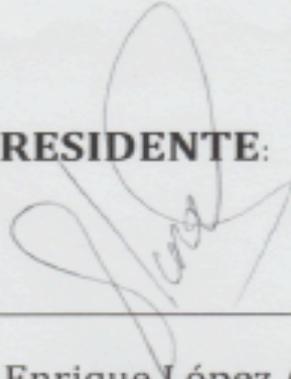
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

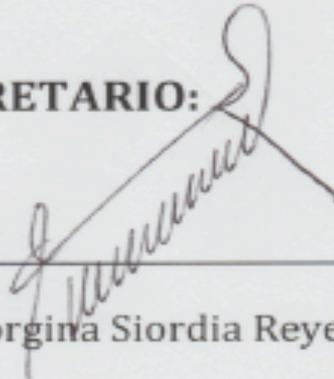
JURADO

PRESIDENTE:



Dr. Javier Enrique López Aguilar

SECRETARIO:



Dra. Alicia Georgina Siordia Reyes

VOCAL:



Dr. Gerardo Sánchez Rodríguez

DICTAMEN DE AUTORIZADO

22/11/2019

SIRELCIS



INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
DIRECCIÓN DE PRESTACIONES MÉDICAS



Dictamen de Aprobado

Comité Local de Investigación en Salud 3603.
HOSPITAL DE PEDIATRIA, CENTRO MEDICO NACIONAL SIGLO XXI

Registro COFEPRIS 17 CI 09 015 042
Registro CONBIOÉTICA CONBIOETICA 09 CEI 032 2017121

FECHA Viernes, 22 de noviembre de 2019

Dra. Javier Enrique López Aguilar

PRESENTE

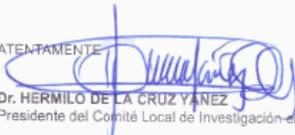
Tengo el agrado de notificarle, que el protocolo de investigación con título **PRESENCIA DE NEUROESFERAS EN CULTIVOS PRIMARIOS DE GLIOMAS DE PACIENTES PEDIÁTRICOS Y EXPRESIÓN INMUNOHISTOQUÍMICA DE H3K27M** que sometió a consideración para evaluación de este Comité, de acuerdo con las recomendaciones de sus integrantes y de los revisores, cumple con la calidad metodológica y los requerimientos de ética y de investigación, por lo que el dictamen es **A P R O B A D O**.

Número de Registro Institucional

R-2019-3603-087

De acuerdo a la normativa vigente, deberá presentar en junio de cada año un informe de seguimiento técnico acerca del desarrollo del protocolo a su cargo. Este dictamen tiene vigencia de un año, por lo que en caso de ser necesario, requerirá solicitar la reaprobación del Comité de Ética en Investigación, al término de la vigencia del mismo.

ATENTAMENTE


Dr. HERMILO DE LA CRUZ YANEZ
Presidente del Comité Local de Investigación en Salud No. 3603

Imprimir

IMSS
SEGURIDAD Y SALUD SOCIAL

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a:

Dios por forjar mi camino y regalarme cada amanecer de mi vida.

Mis padres por transmitirme su espíritu de superación y apoyo incondicional.

Mis hermanas y hermano por su motivación y ánimos.

AGRADECIMIENTOS

A quien hizo todo posible, mi Señor Jesucristo, porque me acompañó en cada día de este camino, porque me levantó de cada uno de mis tropiezos y me dió la valentía para afrontar las situaciones que se presentaron. Gracias por darme la fortaleza para poder terminar, porque sin él nada de esto hubiera sido posible.

A mi padre, Juan Miguel, por mostrarme con su ejemplo la honestidad, superación y confianza en Dios. A mi madre, María Dina, por su paciencia infinita, consejos oportunos, por siempre confiar en mis capacidades y nunca dudar de mí. Por enseñarme el poder que tiene la oración.

A mis hermanas, Dini y Diana, y mi hermano, Miguel, por mantener mis ánimos siempre altos y estar siempre presentes en mi vida, para reír, llorar y celebrar la vida.

Al Dr. Lopez, por su ejemplo de empatía, por darme la confianza y la oportunidad de aprender de sus conocimientos y experiencia, así como su apoyo y consejos en los momentos difíciles.

A la Dra. Anita, por acompañarme en el día a día durante el proceso, por la confianza, por su paciencia en mi educación, por su disposición a apoyarme y siempre motivarme a ser mejor.

A mis maestras, las Dras: Valdés, Betanzos, Lulu, Eli y Mariana, por su tiempo y dedicación en mi aprendizaje y tenerme paciencia durante el proceso.

A la Dra. Herrera, por su tiempo para mi educación, paciencia y su disposición para apoyarme en los proyectos de mi carrera.

A la Dra. Siordia, por su valiosa colaboración, orientación, asistencia, paciencia y aportes a esta investigación.

Al Dr. Villasís, por enseñarme a exigirme a mí misma y aprender de su ejemplo a siempre buscar la excelencia.

A Brenda y Yessenia, que emprendimos este viaje juntas, en las buenas y en las malas, en el llanto y las risas, siempre un motivo para seguir.

A mis amigas, por ser parte de esta trayectoria inolvidable, por hacerme reír en los momentos tristes y darme ánimos en las caídas. Porque se dieron el tiempo de conocerme y ahora son parte de mi familia.

ÍNDICE

I.	RESUMEN	8
II.	ANTECEDENTES	9
III.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	23
IV.	JUSTIFICACIÓN	24
V.	OBJETIVO	24
VI.	MATERIAL Y MÉTODOS	24
VII.	CRITERIOS DE SELECCIÓN	25
VIII.	VARIABLES	27
IX.	DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO	27
X.	ASPECTOS ÉTICOS	28
XI.	RESULTADOS	31
XII.	DISCUSIÓN	34
XIII.	CONCLUSIONES	38
XIV.	RECOMENDACIONES	39
XV.	BIBLIOGRAFÍA	40
XVI.	ANEXOS	45

I. RESUMEN

Antecedentes: Los tumores del Sistema Nervioso Central representan el 25% de las neoplasias infantiles. La última revisión del 2016 integra entidades definidas tanto por histología como por sus características moleculares y define una nueva entidad: Glioma difuso de la línea media H3K27M mutado. Los gliomas difusos de línea media con mutación de H3K27M están asociados con comportamiento clínico agresivo y mal pronóstico, incluyendo aquellos histológicamente de bajo grado. Las células madre tumorales pueden ser cultivadas *in vitro*, donde generan cuerpos esféricos constituídos por varias poblaciones celulares, dentro de las cuales se encuentran precursores de astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, además de las mismas células madres; estas estructuras son conocidas como “neuroesferas”.

Objetivo: Describir la expresión inmunohistoquímica de H3K27M en los cultivos primarios de gliomas pontinos intrínsecos difusos de pacientes pediátricos.

Material y métodos: Se presentan los datos de una serie de casos de pacientes pediátricos con glioma pontino intrínseco difuso con expresión de H3K27M por inmunohistoquímica. Se identificó el cultivo primario y se describió el crecimiento de neuroesferas. El análisis estadístico fue de tipo descriptivo.

Resultados: Se identificó en la base de datos del Servicio de Patología 5 muestras con diagnóstico de glioma pontino intrínseco difuso y que contaron con expresión para H3K27M por inmunohistoquímica. El 60% reportaron diagnóstico histopatológico de astrocitoma difuso y el 40% glioblastoma. El 60% presentó formación de neuroesferas en su cultivo primario y de estos el 100% corresponde a glioblastomas.

Conclusiones: La mayoría de los pacientes que presentaron expresión por inmunohistoquímica de H3K27M desarrollaron neuroesferas por cultivo primario representando el 60% de los casos. No todos los pacientes que presentan la mutación, desarrollan neuroesferas, sin embargo esto puede estar sesgado por la técnica que se utiliza para el cultivo primario, dada que la cantidad de muestra que por ser biopsia y repartirse para varios estudios pudiera no ser suficiente para el desarrollo de celularidad.

II. ANTECEDENTES

La incidencia total de tumores cerebrales primarios corresponde a 21.4 por 100.000 habitantes, siendo de 5.42 por 100.000 habitantes en pacientes de 0-19 años.(1) Los tumores del Sistema Nervioso Central representa el 25% de las neoplasias infantiles. Se reporta incremento en la incidencia de 2.7 a 3.3 casos por 100,000 desde 1994 y en la primera década de la vida. Predominio en raza blanca y en los primeros 2-3 años son más frecuentes de localización supratentorial. El tumor cerebral primario mas común es el glioma que representa en 60-70% de los casos. Histológicamente, los gliomas pueden ser astrocitos, oligodendrocitos o células ependimarias; así en base a su morfología se clasifican como Astrocitomas, Oligodendrogliomas o Ependimomas respectivamente.(2) Existen dos factores que son constantes como factores de riesgo en el incremento de la probabilidad de tumores del sistema nervioso central: *Alteraciones genéticas y exposición a radiación ionizante*. Los factores para el desarrollo de gliomas específicamente no están del todo claros, pero se ha descrito exposición ocupacional a productos solventes o pesticidas. Se ha sugerido también asociación con citomegalovirus basándose en la detección de ARN del mismo. Hay dos picos de incidencia, uno en el grupo de edad de 0 a 8 años y el segundo ya en los adultos con un ligero predominio masculino.(2)

La primera separación en el sistema de clasificación de los tumores del sistema nervioso central en niños, de la de adultos, fue una adaptación a la clasificación del año 1979 y fue publicada en 1985.

La clasificación de tumores de sistema nervioso central de 2016 integra entidades definidas tanto por histología como por sus características moleculares. Esta última revisión se muestra a continuación:

Figura 1. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE LA OMS

2016. (3)

Diffuse astrocytic and oligodendroglial tumours		Neuronal and mixed neuronal-glial tumours	
Diffuse astrocytoma, IDH-mutant	9400/3	Dysembryoplastic neuroepithelial tumour	9413/0
Gemistocytic astrocytoma, IDH-mutant	9411/3	Gangliocytoma	9492/0
<i>Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9400/3	Ganglioglioma	9505/1
Diffuse astrocytoma, NOS	9400/3	Anaplastic ganglioglioma	9505/3
Anaplastic astrocytoma, IDH-mutant	9401/3	Dysplastic cerebellar gangliocytoma (Lhermitte-Duclos disease)	9493/0
<i>Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype</i>	9401/3	Desmoplastic infantile astrocytoma and ganglioglioma	9412/1
Anaplastic astrocytoma, NOS	9401/3	Papillary glioneuronal tumour	9509/1
Glioblastoma, IDH-wildtype	9440/3	Rosette-forming glioneuronal tumour	9509/1
Giant cell glioblastoma	9441/3	<i>Diffuse leptomeningeal glioneuronal tumour</i>	
Gliosarcoma	9442/3	Central neurocytoma	9506/1
<i>Epithelioid glioblastoma</i>	9440/3	Extraventricular neurocytoma	9506/1
Glioblastoma, IDH-mutant	9445/3*	Cerebellar liponeurocytoma	9506/1
Glioblastoma, NOS	9440/3	Paraganglioma	8693/1
Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant	9385/3*	Tumours of the pineal region	
Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9450/3	Pineocytoma	9361/1
Oligodendroglioma, NOS	9450/3	Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation	9362/3
Anaplastic oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted	9451/3	Pineoblastoma	9362/3
<i>Anaplastic oligodendroglioma, NOS</i>	9451/3	Papillary tumour of the pineal region	9395/3
<i>Oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Embryonal tumours	
<i>Anaplastic oligoastrocytoma, NOS</i>	9382/3	Medulloblastomas, genetically defined	
Other astrocytic tumours		Medulloblastoma, WNT-activated	9475/3*
Pilocytic astrocytoma	9421/1	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-mutant	9476/3*
Pilomyxoid astrocytoma	9425/3	Medulloblastoma, SHH-activated and TP53-wildtype	9471/3
Subependymal giant cell astrocytoma	9384/1	Medulloblastoma, non-WNT/non-SHH	9477/3*
Pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 3</i>	
Anaplastic pleomorphic xanthoastrocytoma	9424/3	<i>Medulloblastoma, group 4</i>	
Ependymal tumours		Medulloblastomas, histologically defined	
Subependymoma	9383/1	Medulloblastoma, classic	9470/3
Myxopapillary ependymoma	9394/1	Medulloblastoma, desmoplastic/nodular	9471/3
Ependymoma	9391/3	Medulloblastoma with extensive nodularity	9471/3
Papillary ependymoma	9393/3	Medulloblastoma, large cell / anaplastic	9474/3
Clear cell ependymoma	9391/3	Medulloblastoma, NOS	9470/3
Tanycytic ependymoma	9391/3	Embryonal tumour with multilayered rosettes, C19MC-altered	9478/3*
Ependymoma, <i>RELA</i> fusion-positive	9396/3*	<i>Embryonal tumour with multilayered rosettes, NOS</i>	9478/3
Anaplastic ependymoma	9392/3	Medulloepithelioma	9501/3
Other gliomas		CNS neuroblastoma	9500/3
Chordoid glioma of the third ventricle	9444/1	CNS ganglioneuroblastoma	9490/3
Angiocentric glioma	9431/1	CNS embryonal tumour, NOS	9473/3
Astroblastoma	9430/3	Atypical teratoid/rhabdoid tumour	9508/3
Choroid plexus tumours		<i>CNS embryonal tumour with rhabdoid features</i>	9508/3
Choroid plexus papilloma	9390/0	Tumours of the cranial and paraspinal nerves	
Atypical choroid plexus papilloma	9390/1	Schwannoma	9560/0
Choroid plexus carcinoma	9390/3	Cellular schwannoma	9560/0
		Plexiform schwannoma	9560/0

Melanotic schwannoma	9560/1	Osteochondroma	9210/0
Neurofibroma	9540/0	Osteosarcoma	9180/3
Atypical neurofibroma	9540/0		
Plexiform neurofibroma	9550/0	Melanocytic tumours	
Perineurioma	9571/0	Meningeal melanocytosis	8728/0
Hybrid nerve sheath tumours		Meningeal melanocytoma	8728/1
Malignant peripheral nerve sheath tumour	9540/3	Meningeal melanoma	8720/3
Epithelioid MPNST	9540/3	Meningeal melanomatosis	8728/3
MPNST with perineurial differentiation	9540/3		
Meningiomas		Lymphomas	
Meningioma	9530/0	Diffuse large B-cell lymphoma of the CNS	9680/3
Meningothelial meningioma	9531/0	Immunodeficiency-associated CNS lymphomas	
Fibrous meningioma	9532/0	AIDS-related diffuse large B-cell lymphoma	
Transitional meningioma	9537/0	EBV-positive diffuse large B-cell lymphoma, NOS	
Psammomatous meningioma	9533/0	Lymphomatoid granulomatosis	9766/1
Angiomatous meningioma	9534/0	Intravascular large B-cell lymphoma	9712/3
Microcystic meningioma	9530/0	Low-grade B-cell lymphomas of the CNS	
Secretory meningioma	9530/0	T-cell and NK/T-cell lymphomas of the CNS	
Lymphoplasmacyte-rich meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-positive	9714/3
Metaplastic meningioma	9530/0	Anaplastic large cell lymphoma, ALK-negative	9702/3
Chordoid meningioma	9538/1	MALT lymphoma of the dura	9699/3
Clear cell meningioma	9538/1		
Atypical meningioma	9539/1	Histiocytic tumours	
Papillary meningioma	9538/3	Langerhans cell histiocytosis	9751/3
Rhabdoid meningioma	9538/3	Erdheim-Chester disease	9750/1
Anaplastic (malignant) meningioma	9530/3	Rosai-Dorfman disease	
		Juvenile xanthogranuloma	
		Histiocytic sarcoma	9755/3
Mesenchymal, non-meningothelial tumours		Germ cell tumours	
Solitary fibrous tumour / haemangiopericytoma**		Germinoma	9064/3
Grade 1	8815/0	Embryonal carcinoma	9070/3
Grade 2	8815/1	Yolk sac tumour	9071/3
Grade 3	8815/3	Choriocarcinoma	9100/3
Haemangioblastoma	9161/1	Teratoma	9080/1
Haemangioma	9120/0	Mature teratoma	9080/0
Epithelioid haemangioendothelioma	9133/3	Immature teratoma	9080/3
Angiosarcoma	9120/3	Teratoma with malignant transformation	9084/3
Kaposi sarcoma	9140/3	Mixed germ cell tumour	9085/3
Ewing sarcoma / PNET	9364/3		
Lipoma	8850/0	Tumours of the sellar region	
Angiolipoma	8861/0	Craniopharyngioma	9350/1
Hibernoma	8880/0	Adamantinomatous craniopharyngioma	9351/1
Liposarcoma	8850/3	Papillary craniopharyngioma	9352/1
Desmoid-type fibromatosis	8821/1	Granular cell tumour of the sellar region	9582/0
Myofibroblastoma	8825/0	Pituicytoma	9432/1
Inflammatory myofibroblastic tumour	8825/1	Spindle cell oncocytoma	8290/0
Benign fibrous histiocytoma	8830/0		
Fibrosarcoma	8810/3	Metastatic tumours	
Undifferentiated pleomorphic sarcoma / malignant fibrous histiocytoma	8802/3		
Leiomyoma	8890/0		
Leiomyosarcoma	8890/3		
Rhabdomyoma	8900/0		
Rhabdomyosarcoma	8900/3		
Chondroma	9220/0		
Chondrosarcoma	9220/3		
Osteoma	9180/0		

The morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology (ICD-O) (742A). Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; and /3 for malignant tumours. The classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions. *These new codes were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O. *Italics: Provisional tumour entities. **Grading according to the 2013 WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone.*

Los astrocitomas de alto grado son tumores biológicamente agresivos. Representan el 20% de los tumores cerebrales. Estos pueden localizarse en estructuras de línea media incluyendo el tronco encefálico 15%, tálamo 13%, cerebelo 5% y médula espinal 3%.(4)(5)

Los gliomas del tronco encefálico presentan una edad media de diagnóstico entre 6 y 7 años. La relación hombres y mujeres casi por igual e incrementa la frecuencia en pacientes con NF1. Según localización pueden clasificarse como difusos intrínsecos de puente, focales de puente, medulares y de línea media. Los gliomas difusos son malignos y pueden ser entre 75-80% astrocitomas anaplásicos y 20% glioblastomas. El 65% de los gliomas focales corresponden a astrocitomas de bajo grado y tiene extensión limitada a la medula. En cuanto a la localización cervicomedular, el 72% son astrocitomas de bajo grado y pueden tener componente exofítico.

GLIOMA PONTINO INTRÍNSECO DIFUSO

Son tumores de alto grado localizados en el puente del tronco encefálico y que se caracterizan por ser infiltrativos. Representan entre 10 al 20% de los tumores cerebrales e histológicamente son astrocitomas. La supervivencia media es de 8-12 meses con supervivencia global del 30% al año del diagnóstico. La evolución clínica es menor a 6 meses y se caracteriza por la tríada clásica: alteración de pares craneales, signos cerebelares y signos del tracto largo. La parálisis del nervio craneal abducens como presentación primaria es un alto predictor clínico.(6)(4) El diagnóstico se basa en la presentación clínica, tiempo de evolución e imagen por resonancia magnética. La imagen característica localizada en puente del tronco encefálico se describe hipointensa en ponderaciones T1 e hiperintensa en ponderaciones T2, poco realce al medio de contraste y no es frecuente la presencia de calcificaciones y hemorragias.(7) Se describen subgrupos con el propósito de estudiar terapéuticas dirigidas. Entre estos subgrupos se describen 3 subtipos histológicas y moleculares. El Subgrupo MYCN son histológicamente de alto grado caracterizados por hipermetilación y múltiples

rearrreglos en el cromosoma 2p. El subgrupo Silente presenta escasas mutaciones genómicas. En cuanto el subgrupo H3K27M se encuentra presente la mutación de la histona 3, hipometilación del DNA así como múltiples mutaciones entre ellas: TP53, EGFR, ATRX, PAX3, TERT, PGFRA, NF1, MET.(6)

La biopsia es controversial, sin embargo actualmente ha incrementado la realización de biopsia por estereotaxia ya que se ha demostrado mínima morbilidad con alto rendimiento diagnóstico. La mayor cantidad y calidad de tejido de biopsia ha permitido estudios moleculares como la determinación de la expresión de la mutación H3K27M y estudios para dirigir terapias.(6)

El único tratamiento comprobado, aunque limitado en incrementar supervivencia es la radioterapia. La radioterapia mejora sintomatología de forma transitoria y función neurológica. La dosis recomendada es de 54 Gy durante 6 semanas. La quimioterapia tiene aplicación limitada ya que los estudios no han demostrado obtener resultados superiores a la radioterapia.(6)

HISTONAS

Los organismos eucariontes presentan un núcleo que contiene el ADN condensado lo que conocemos como cromatina. La unidad básica es el nucleosoma el cual está formado por un octámero de proteínas llamadas histonas, proteínas de baja masa molecular, 2 de cada una de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, rodeado por 147 pares de base de ADN y éstas se encuentran más compactas gracias a la incorporación de la histona H1 que es la que va a permitir el agrupamiento para formar la estructura nucleosoma.(8)(9)(10) Figura 2.

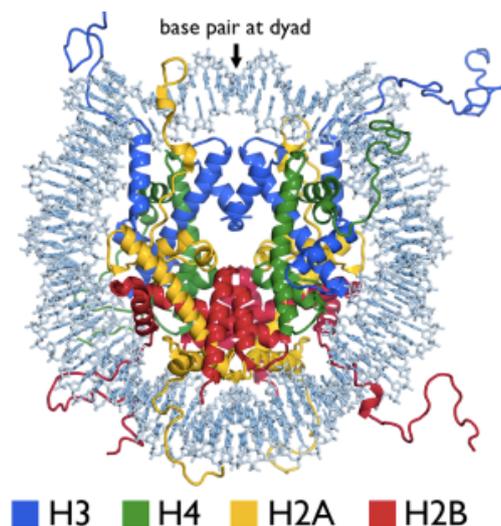


Figura 2. Estructura de partículas del núcleo del nucleosoma y los heterodímeros de pliegue de histona.(11)

Algunos estudios demuestran que el ADN organizado en el nucleosoma no es accesible a la maquinaria transcripcional, este efecto se ve favorecido cuando las lisinas del extremo amino-terminal no sufren modificaciones, de hecho las cargas positivas de estos residuos permiten la interacción electrostática con las cargas negativas de los grupos fosfatos del DNA, generando una organización mas cerrada y compacta.(9)(10) La cromatina puede estar en estado de eucromatina la cual se encuentra laxa y puede ser leída la información del ADN o en estado heterocromatina donde se encuentra compacta e impide la lectura.(8) Existen proteínas modificadoras de histonas como son: HMT – metiltransferasas, HAT – acetiltransferasas, HDAC – desacetilasas y cinasas como MAPK y SAPK.(8)

Muchos tipos de cáncer se asocian a numerosas mutaciones, que podrían derivar de “inestabilidad epigenética” que implica deficiencias en la reparación del ADN o en la integridad cromosómica. La metilación del ADN es un mecanismo involucrado en la regulación durante el crecimiento, si esta es inadecuada lleva a un crecimiento acelerado y la metilación de zonas originalmente no metilables que corresponden

comúnmente a promotores de genes supresores de tumores, genes inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas o a genes de reparación de ADN, esta directamente relacionada con el origen y progresión de tumores.(8) La metilación de la histona consisten en la transferencia de la S-adenosil-L-metionina de uno a tres grupos metílicos, a los residuos de la lisina o la arginina de las proteína de las histonas. La transferencia es catalizada por los metiltransferasas de la histona (HMTs). La metilación de la lisina en H3 y H4 se implica en la activación y la represión de la transcripción, mientras que la metilación de la arginina se implica solamente en la activación de la transcripción. La trimetilación de K9 y K27 en la histona H3 son una señal para la represión de la transcripción.(12)

Otro factor que se ha documentado es la alteración en los mecanismos de acetilación y desacetilación de histonas ya que se encuentran estrechamente relacionados con la presencia de tumores, ya que la actividad anormal de las desacetilasas de histonas reprime la transcripción y conduce a neoplasias, dado que se ven alterados genes directamente involucrados con el control del ciclo celular, la apoptosis, la reparación del ADN y la función del proteosoma.(8)

Las modificaciones que afectan como el material genético se empaqueta y utiliza, sin cambiar la información genética, se denominan modificaciones epigenéticas. La epigenética fué introducida por Conrad H. Waddington, quien la concibió como “el análisis causal del desarrollo” implicando todas las interacciones de los genes con su medio ambiente.(8) Las más importantes son: las modificaciones postraduccionales de las histonas como acetilación, metilación y otras que afectan tanto a la estructura global de la cromatina como a la activación o represión génica, el remodelado de la cromatina por factores dependiente de ATP, que cambian la estructura, composición y

posición de los nucleosomas y la metilación del DNA en el di nucleótido C-G como mecanismo silenciador en la transcripción.

La hipometilación da lugar a elementos repetitivos del DNA produciendo inestabilidad genómica, deleciones o traslocaciones cromosómicas. Durante el desarrollo de un tumor, el grado de hipometilación del DNA va aumentando según la lesión progresa desde la proliferación celular benigna al cáncer invasivo.(13)(14)

Hay 2 variantes de la Histona 3: la H3.1 que se encuentra en areas del genoma asociadas a silenciamiento génico y la H3.3 en genes transcripcionalmente activos. Se realizó un estudio de la distribución de las histonas en 85 pacientes pediátricos encontrándose en linea media y específicamente el 79% en puente. (7) Figura 3.

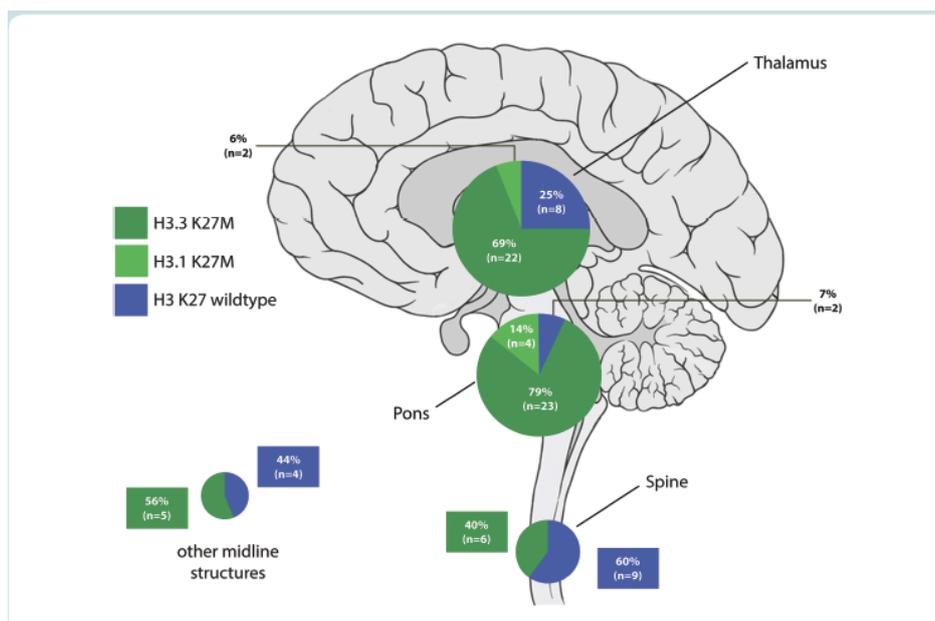


Figura 3. Distribución de la mutación H3K27M en 85 pacientes pediátricos con Glioma Pontino Intrínseco Difuso.(7)

La histona H3.3 es la principalmente involucrada en el desarrollo del cerebro así como en la expresión génica. K27 el residuo más importante en las siete variantes de la histona 3. También se sabe que mutaciones en el TP53 juegan un papel importante independiente de la mutación.(15)

MUTACIÓN H3K27M

En la clasificación de la OMS 2016 ahora llamados Glioma difuso de la línea media con mutación de H3K27M, implica la detección de la mutación sin embargo no es exclusiva y biológicamente la mutación puede ocurrir en varios genes H3 incluidos H3F3A que codifica para las variantes de histona 3, H3.3 y H3.1 respectivamente. (3)

La mutación de la histona H3K27M es la característica molecular definitoria de muchos tumores cerebrales. Se han descrito mutaciones de la histona H3.3 en el cerebro, las cuales impresionan tener localizaciones específicas dentro del encéfalo.(16) La H3K27M, por ejemplo, ha sido localizada a lo largo del tallo, con predominio en el puente. La mutación confiere importancia en la patogénesis de este tumor sin embargo continúa sin estar del todo clara.

Se describe como la sustitución de lisina (K) para metionina (M) en la posición 27, lo que resulta en reprogramación epigenética que se ha demostrado contribuye a la tumorigénesis. Este residuo K27, es vulnerable a los cambios de metilación y acetilación. Esta mutación en sí misma produce pérdida global de la di y tri metilación de histona H3K27M en las proteínas de las histonas.(17)(18)

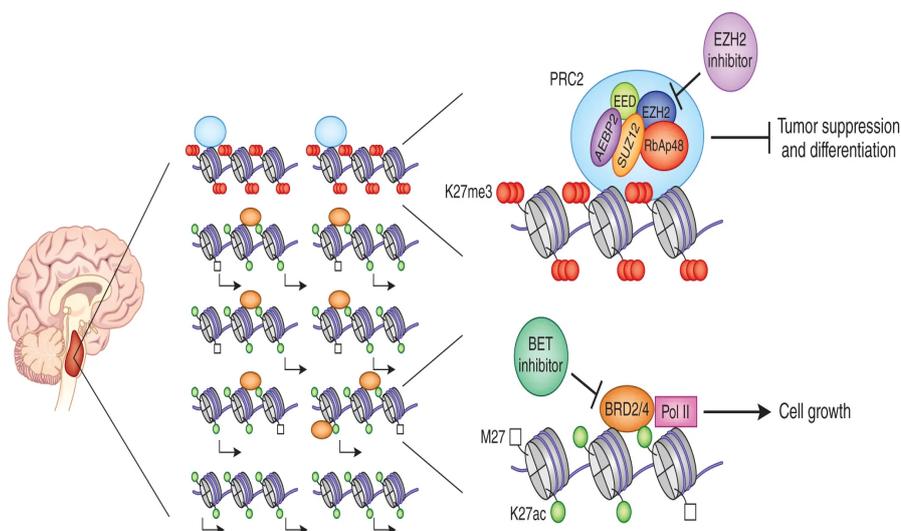


Figura 4. Características epigenéticas de los Gliomas Pontinos Intrínsecos Difusos.(19)

Los tumores que expresan H3K27M mutada presentan disminución en la trimetilación y aumento en la acetilación. La mutación se localiza en sitios de transcripción activa y conlleva a la acumulación de las proteínas BET que son lectores para las histonas trimetiladas y resultan en la dependencia de BRD2 y BRD4 para la proliferación de éstas células. Se sabe que a pesar de la disminución de la trimetilación son dependientes de la actividad de PRC2 para reprimir los genes supresores de tumores y diferenciación. (19)(20) Figura 4.

Se ha demostrado que la pérdida de esta mutación o su eliminación retrasan el crecimiento tumoral. Los perfiles de expresión indican que la ausencia de la mutación H3K27M disminuye la proliferación y aumenta diferenciación dentro de linajes representado en estos tumores. Estos datos sugieren que la pérdida mediada de H3K27M directamente regula un subconjunto de genes liberando promotores equilibrados y contribuye al fenotipo y crecimiento tumoral al limitar su diferenciación; la mutación es un objetivo terapéutico relevante.(20)(21)

La metilación del DNA y las modificaciones de histonas son dianas atractivas para el desarrollo de nuevos agentes terapéuticos, ya que el tratamiento con drogas que inhiben la metilación en citosina y la desacetilación de histonas pueden restablecer la transcripción génica.(22)(23)

La metilación aberrante de histonas causado por la alteración de las enzimas modificadoras de la cromatina ha estado implicado durante mucho tiempo en el cancer. En los casos de H3K27M que se encuentra en los gliomas difusos de puente conduce a una reducción global de la metilación de histonas en el respectivo residuo de lisina.(24)

Los gliomas difusos de línea media con mutación de H3K27M están asociados con comportamiento clínico agresivo y mal pronóstico, incluyendo aquellos histológicamente de bajo grado. Los gliomas con mutación H3K27M demuestran un amplio espectro de variación morfológica que varía de astrocitos monomórficos bien diferenciados al glioblastoma con células gigantes y epitelioides e incluso focos indiferenciados. Es posible detectar la mutación por dos principales técnicas: determinación proteica de la mutación mediante inmunohistoquímica y molecular mediante PCR. La inmunohistoquímica es útil para identificar la mutación y específicamente para su diagnóstico. Mutaciones tanto en las histonas H3.3 como en H3.1 se pueden detectar usando anticuerpo anti-H3K27M.

La especificidad y sensibilidad de H3K27M para las mutaciones K27M en H3.3 es del 100%. Otro anticuerpo que se ha utilizado para guiar el diagnóstico de estos tumores de forma indirecta es H3K27me3 (trimetilado), esta debe usarse siempre en conjunto con la inmunohistoquímica de H3K27M ya que la pérdida de la expresión de H3K27me3 es específica para demostrar presencia de la proteína trimetilada pero no para evidencia de la mutada.(5)(4)(25)

Existen diferencias entre las variantes de histona H3. Los tumores con H3.3K27M se encuentran en 2/3 de los gliomas difusos del puente en donde están asociados con una supervivencia general más corta. Los tumores H3.1K27M, por el contrario están restringidos a la protuberancia, los pacientes son más jóvenes y una supervivencia más larga y presentan más frecuentemente alteraciones en el número por ganancia de brazos completos de cromosomas.(5)(7)

CULTIVO CELULAR Y NEUROESFERAS

El cultivo celular es una técnica que se basa en la obtención de células individuales en suspensión a partir de un tejido, ya sea por método mecánico o enzimático y su posterior incubación en un medio de cultivo líquido o sólido. Esta tecnología fue ideada por Harrison en 1907 como un método para el estudio de la fisiología celular bajo condiciones controladas.(26)(27)

El cultivo de células se lleva a cabo a partir de tejidos cerebrales, en un medio suplementado con los factores necesarios para su desarrollo.(28) Aparte de las condiciones nutricionales, el cultivo debe contar con las condiciones diferenciales de cultivos primarios exclusivos para expansión de neuroesferas y aquellos llevados a cabo en el laboratorio, presencia o ausencia de neuroesferas en medio de diferenciación que contiene suero fetal bovino.(29) Una vez que se obtiene el cultivo tumoral, se debe verificar que correspondan a células madre. Este objetivo se logra por medio de análisis de autoregeneración, marcadores de células madre, diferenciación en distintas líneas celulares y capacidad tumorigénica al ser implantadas en forma subcutánea o intracraneal en ratones.(30) El cultivo de neuroesferas se ha convertido en el ensayo estándar para el análisis del efecto de factores sobre la diferenciación neuronal y entender la biología celular y molecular de las células madre en el sistema nervioso central.(31) Las células madre neuronales poseen el poder de autorenovación, son multipotentes y mantienen una producción continua de neuronas, astrocitos y oligodendrocitos en el sistema nervioso central. La neurogénesis continúa en el cerebro en zonas discretas como la región subependimial que se encuentra entre el ventrículo lateral y en el cuerpo estriado, la zona cerebelosa

periventricular, la zona subgranular del girodentado del hipocampo y en el revestimiento de los ventrículos laterales. (32)(33)(30)(34)(35) Figura 5.

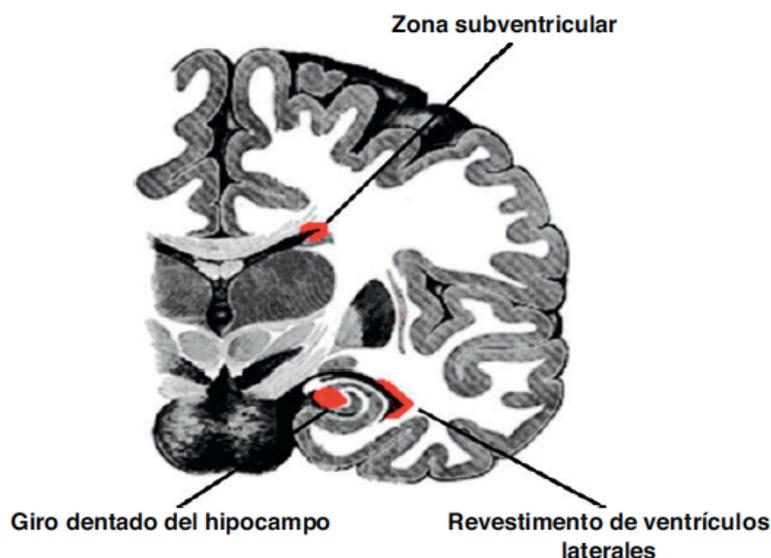


Figura 5. Zonas de localización de fuentes de células madre neuronales.(32)

Estas células madre neuronales se identificaron por la presencia de los siguientes marcadores: CD133⁺, 5E12⁺, CD34⁻, CD45⁻, CD24^{low}.(32)(36)

Las células madre normales son fenotípicamente similares a las cancerígenas y comparten su habilidad de proliferar, de autorrenovarse y de proporcionar células diferenciadas. (35) Las células madre se encuentran en el blastocisto, trofoblasto placentario, células embrionarias, en órganos específicos como ser hígado, páncreas y cerebro.(32)(33) En las células madre no tumorales existen mecanismos que regulan su proliferación y diferenciación, que en las células tumorales estos mecanismos no funcionan adecuadamente. Las neoplasias están constituidas por células tumorales y de estroma no tumoral. Las células madre cancerígenas se aislaron por primera vez en cáncer hematológico en seres humanos que mostraron una capacidad de autorrenovación ilimitada.(37) Las células madre neuronales, cuando proliferan, dan origen a las células progenitoras. Estas células progenitoras se transforman en células

diferenciadas como las neuronas, astrocitos y oligodendrocitos y estas células progenitoras pueden convertirse en células tumorales por alteraciones epigenéticas y genéticas.(33)

Las células madre tumorales pueden ser cultivadas *in vitro*, donde generan cuerpos esféricos constituidos por varias poblaciones celulares, dentro de las cuales se encuentran precursores de astrocitos, neuronas, oligodendrocitos, además de las mismas células madres; estas estructuras son conocidas como “neuroesferas”.(28)

A partir del modelo de neuroesferas descrito por Reynolds y Weiss en el año 1992 para detectar células precursoras en cerebro adulto, demostró que las células con capacidad de sobrevivir en suspensión formando colonias flotantes estaban enriquecidas por células madre tumorales. Estas poblaciones representaban el 2% de la línea celular y contenían la única fracción tumorigénica de la línea celular.(37)

Por otra parte se ha observado que las neuroesferas son agregados celulares complejos que consisten en un minoría de células madre tumorales juntos con células progenitoras y células más diferenciadas documentándose tasas de menos de 1% que logran reproducir una nueva generación de forma repetitiva por lo que autores cuestionan el uso de estos cultivos para interpretar las características moleculares de células madre tumorales.(30)

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los tumores del sistema nervioso central representan el 25% de las neoplasias infantiles, de los cuales los gliomas representan el 50% de estos tumores. En estudios recientes se ha demostrado que la mutación H3K27M se ha asociado a una presentación más agresiva de la enfermedad y a un peor pronóstico; así mismo se han estudiado células madre neuronales tumorales con capacidad proliferativa conocidas como neuroesferas que se obtienen por cultivo primario de donde derivan las células de los gliomas y que se han demostrado ser de mal pronóstico, por la expresión de H3K27M sería esperado que los pacientes que tienen esta mutación tengan mayor desarrollo de neuroesferas, sin embargo no existen estudios que lo demuestren.

Por ello, nos planteamos la siguiente pregunta de investigación:

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿El desarrollo de neuroesferas en los cultivos primarios de pacientes pediátricos con gliomas pontinos intrínsecos difusos es más frecuente en los que expresan H3K27M por inmunohistoquímica?

IV. JUSTIFICACIÓN

Los pacientes con gliomas pontinos intrínsecos difusos que tienen expresión de H3K27M y desarrollo de neuroesferas han demostrado ser factores de mal pronóstico de manera independiente. La población de estas células es resistente a los fármacos convencionales debido a propiedades que incluyen recambio lento, alta expresión de proteínas exportadoras de fármacos, aumento de las proteínas de reparación del ADN, alteraciones de las vías de señalización de la muerte celular y la falta de expresión de las oncoproteínas sensibles a quimioterapia. (32)(36) Se esperaría que dicha mutación se asocie a mayor desarrollo de neuroesferas en los cultivos primarios. El conocimiento del comportamiento biológico de estos tumores y de factores pronósticos correlacionados a esta patología permitirá establecer nuevas direcciones en los tratamientos de estos pacientes.

V. OBJETIVO

Describir la expresión inmunohistoquímica de H3K27M en los cultivos primarios de gliomas pontinos intrínsecos difusos de pacientes pediátricos.

VI. MATERIAL Y MÉTODOS

Lugar de realización del estudio: Servicio de oncología, laboratorio de investigación en oncología “Dr. Diego Julio Arenas Aranda” y servicio de patología de la Unidad Médica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría “Dr. Silvestre Frenk Freund”, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

Diseño del estudio:

- Serie de casos.

Universo de estudio: Muestras de biopsias de pacientes pediátricos con diagnóstico histopatológico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso en el período comprendido entre 1 de Junio 2010 al 30 de Junio 2019.

Análisis Estadístico: El análisis estadístico que se realizó fue de tipo descriptivo, las variables se expresaron como frecuencias simples y porcentajes.

Tamaño de la muestra: Muestreo por conveniencia. Se incluyeron todas las muestras disponibles en el período señalado que cumplieron los criterios de selección.

VII. CRITERIOS DE SELECCIÓN

Criterios de inclusión

1. Diagnóstico histopatológico de Glioma Pontino Intrínseco Difuso establecido en esta UMAE.
2. Diagnosticados durante el periodo del 1 de Junio 2010 al 30 de Junio 2019 sin tratamiento de quimioterapia o radioterapia.

Criterios de eliminación:

1. Muestra sin cultivo primario.

Método:

De la carpeta de registro de las biopsias realizadas en el hospital previo consentimiento informado para su toma, se incluyeron las que contaron con resultado de glioma pontino intrínseco difuso, se buscó cual fue el reporte de histopatología y el resultado de inmunohistoquímica para H3K27M y en el laboratorio de oncología se buscaron los cultivos primarios de los pacientes incluidos.

Población de estudio: Todos los pacientes derechohabientes al Instituto Mexicano del Seguro Social del Hospital de Pediatría, CMN SXXI y casos referidos a nuestro hospital de otros hospitales de provincia y Ciudad de México con diagnóstico de glioma pontino intrínseco difuso que cumplieron los criterios de inclusión. Se estudiaron los casos del 1 de Junio 2010 al 30 de Junio 2019.

Especímenes: Se realizó una revisión de los archivos de patología, recolectándose todos aquellos casos con diagnóstico de glioma pontino intrínseco difuso con expresión de H3K27M del 1 de Junio 2010 al 30 de Junio 2019.

La evaluación de las laminillas fueron valorados por un mismo patólogo así como por el tesista, desconociendo datos clínicos del paciente. Se revisaron todas las muestras de pacientes con cultivo celular de Astrocitomas del mismo periodo y se determinaron lo que desarrollaron neuroesferas.

VIII. VARIABLES

Nombre	Definición conceptual	Definición operacional	Unidad de medición	Escala de medición
Histología del tumor	Diferenciación y tipo predominante celular de un tejido en su evaluación microscópica	Tipo histológico descrito en el reporte de patología.	Astrocitoma Grado I, II, III Glioblastoma	Cualitativa nominal
Neuroesferas en Cultivo Celular	Técnica para la obtención de células individuales a través de un tejido	Obtención de células individuales a través de la biopsia del tumor	SI NO	Cualitativa nominal dicotómica

IX. DESCRIPCIÓN GENERAL DEL ESTUDIO

1. Antes del inicio del estudio, el proyecto fué sometido a evaluación por el Comité Local de Investigación en Salud para su aprobación.
2. En la base de datos se identificaron las muestras con resultado histopatológico de glioma pontino intrínseco difuso.
3. Se solicitaron los resultados de las biopsias para revisar si contaban con inmunohistoquímica para H3K27M .
4. En la base de datos del laboratorio de oncología se revisó si contaban con cultivo primario.
5. De acuerdo con los registros se documentó la expresión de la mutación, localización e histología del tumor y la presencia de cultivo primario.
6. Todos los datos se anotaron en una hoja de recolección de datos (Anexo 1).

X. ASPECTOS ÉTICOS

El estudio se apegó a los lineamientos de la Declaración de Helsinki y al Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud vigente, acerca de investigación en seres humanos.

Este proyecto no requirió de consentimiento informado, los datos se recabaron de la base de datos del laboratorio de oncología y patología y la información se mantuvo confidencial.

Riesgo de la investigación

De acuerdo con lo establecido en el Reglamento y conforme a los aspectos éticos de la investigación en seres humanos, Título II, Capítulo I, artículo 17, fracción I, que la clasifica como investigación sin riesgo. (modificada en Abril de 2014).

Contribuciones y beneficios del estudio para los participantes y la sociedad:

Si bien no existe ningún beneficio directo a los sujetos de investigación, por otro lado, los beneficios para la sociedad que brindará esta investigación con los resultados que obtuvimos corroborando el mal pronóstico que confiere la positividad de la mutación y la asociación con el cultivo primario.

Confidencialidad:

Para conservar la privacidad y confidencialidad de los resultados, la información se manejó en una base de datos, la cual estuvo codificada para evitar que fueran identificadas y solo los investigadores principales tuvimos acceso a esta información. De igual forma, en caso que los resultados del estudio sean publicados, los nombres de los participantes no serán divulgados.

Forma de selección de los pacientes:

Se incluyeron a todas las muestras con el diagnóstico de glioma pontino intrínseco difuso en quienes se les realizó inmunohistoquímica y cultivo primario pertenecientes al Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI, sin distinción de su nivel económico o sus antecedentes culturales o religiosos.

Aprobación del protocolo de investigación:

El protocolo fué sometido a los Comités de Investigación y Ética en Salud del Hospital de Pediatría, CMN Siglo XXI para su revisión con numero de folio de aprobación: R-2019-3603-087.

Recursos Materiales

- Equipo de cómputo equipado con Microsoft Office 2016 y conexión a internet.
- Impresora
- Acceso a los expedientes clínicos y electrónicos de los pacientes

Recursos Humanos

- Investigador principal residente de oncología pediátrica
- Tutores del estudio
- Colaboradores del estudio

Recursos Financieros

- No se requirieron recursos adicionales a los disponibles para la realización del estudio

CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividad	Abril 2019	Mayo 2019	Junio 2019	Julio- Agosto 2019	Sept- Diciembre 2019	Enero 2020	Febrero 2020
Delimitación del tema a estudiar	X						
Revisión y selección de la bibliografía		X	X	X			
Evaluación por el comité local de investigación					X		
Recolección de datos						X	
Análisis de los datos						X	
Elaboración de informe final							X
Presentación de resultados							X

XI. RESULTADOS

Se identificó en la base de datos del Servicio de Patología 5 muestras con diagnóstico de glioma pontino intrínseco difuso y que contaron con expresión para H3K27M por inmunohistoquímica. El 60% reportaron diagnóstico histopatológico de astrocitoma difuso y el 40% glioblastoma, todos con localización en tallo encefálico específicamente puente. De acuerdo a la última revisión en la clasificación del 2016, estas 5 muestras se catalogan como una nueva entidad denominada glioma difuso de la línea media H3K27M mutado.(3)

Tabla 1. Resultados de los pacientes con expresión inmunohistoquímica de H3K27M y su cultivo primario.

No.	PQ	DIAGNÓSTICO HISTOPATOLÓGICO	TRATAMIENTO	SOBREVIDA (MESES)	MOTIVO DE DEFUNCIÓN	H3K27M	NEUROESFERAS	FECHA DE CULTIVO PRIMARIO
1.	16-725-1	ASTROCITOMA DIFUSO	ICE/TMZ (4) RT 54.8 Gy	12	Progresión Tumoral	Mutado	Sin crecimiento	09.06.2016
2.	15-433	GLIOBLASTOMA	ICE/TMZ (10)	13	Choque Séptico	Mutado	Con crecimiento	27.04.2015
3.	15-1045	ASTROCITOMA DIFUSO	ICE/TMZ (6) RT 54.8 Gy	12	Choque Séptico	Mutado	Sin crecimiento	11.09.2015
4.	17-608	ASTROCITOMA DIFUSO	ICE/TMZ (10)	13	Progresión Tumoral	Mutado	Con crecimiento	05.05.2017
5.	15-354-1	GLIOBLASTOMA	PACKER RT 54.8 Gy	4	Progresión Tumoral	Mutado	Con crecimiento	02.04.2015

*ICE: Ifosfamida, Carboplatino y Etopósido. *TMZ: Temozolamida. *RT: Radioterapia.

*PACKER: Vincristina y Carboplatino.

El 80% de los pacientes (n=4) recibieron tratamiento con esquema ICE que corresponde a Ifosfamida, Carboplatino y Etopósido con Temozolamida y el 20% que corresponde a 1 paciente recibió esquema PACKER con Vincristina y Carboplatino. En cuanto a la radioterapia el 60% recibieron tratamiento con un plan total de 54.8 Gy, sin embargo no logró completarse en todos los casos por defunción. Entre las muestras que presentaron expresión de H3K27M, el 60% presentó formación de neuroesferas en cultivo primario y de estos el 100% corresponde a los glioblastomas.

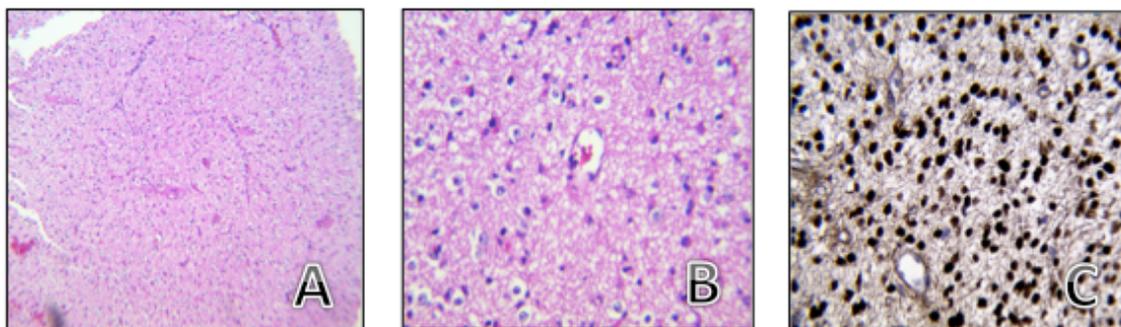


Figura 6. A y B (H&E, 10x y 40x) Microfotografías con la evidencia de neoplasia homogénea con patrón difuso consistente con hallazgos histológicos de un Glioma de bajo grado. **C.** (H3K27M, 40x) Microfotografía con intensa expresión nuclear del anticuerpo con diagnóstico categórico de Glioma Difuso de la Línea Media (Grado IV de la OMS, 2016).

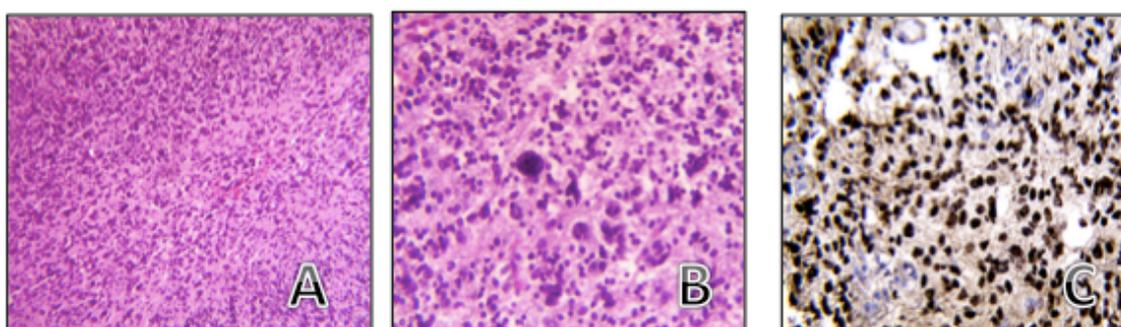


Figura 7. A y B (H&E, 10 y 40 x) Microfotografías en las que se observa hiper celularidad y pleomorfismo caracterizado por células de diferente tamaño e hiper cromacia nuclear consistente con un Glioma de Alto grado. **C** (H3K27M, 40x) Microfotografía con expresión nuclear del anticuerpo consistente con diagnóstico de Glioma Difuso de la Línea Media (Grado IV de la OMS, 2016).

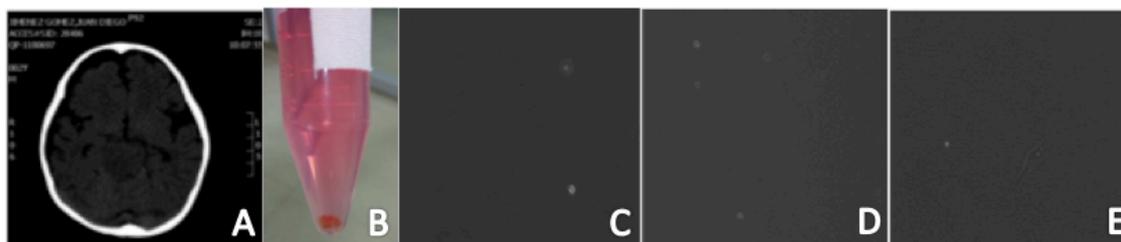


Figura 8. Paciente No. 1 JGJD. **A.** Resonancia Magnética corte axial. **B.** Biopsia de tumor en medio de transporte (DMEM-F12/10% Antibiótico-Antimicótico). **C.** Siembra celular. **D.** Implantación celular (5 días). **E.** Muerte del cultivo (34 días).

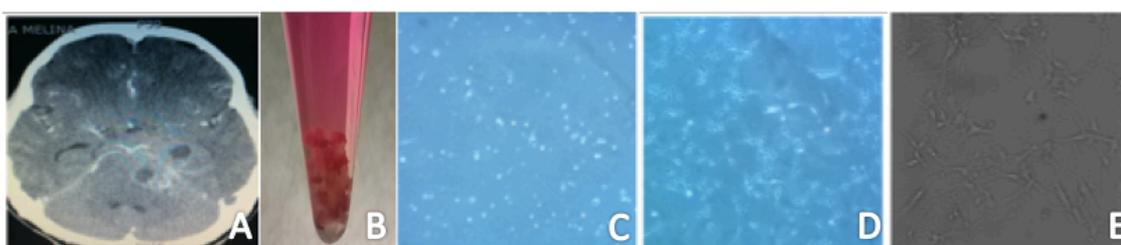


Figura 9. Paciente No. 2 MSJM. **A.** Resonancia Magnética corte axial. **B.** Biopsia de tumor en medio de transporte (DMEM-F12/10% Antibiótico-Antimicótico) **C.** Siembra celular. **D.** Implantación celular (22 días). **E.** Proliferación celular (31 días).

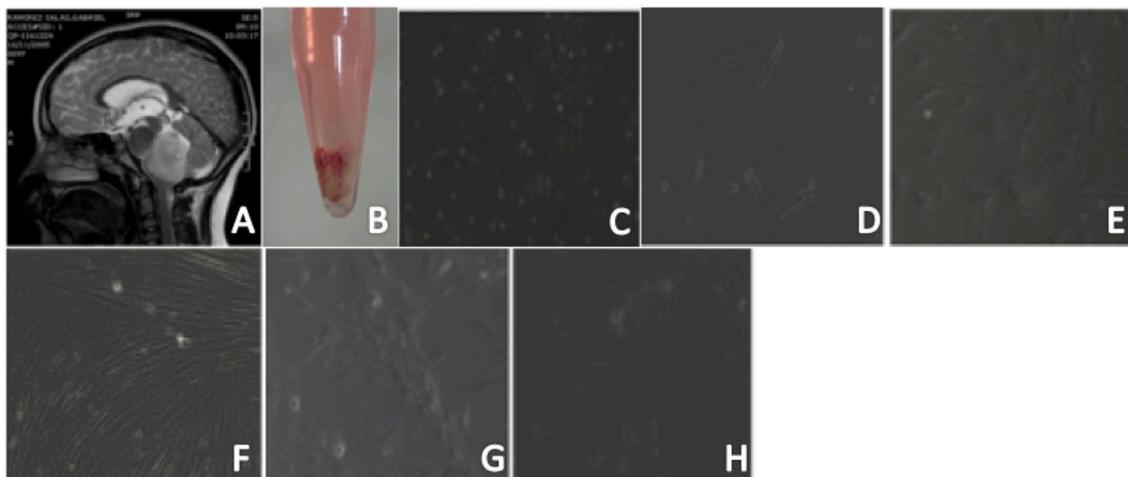


Figura 10. Paciente No. 3 RSG. A. Resonancia Magnética corte sagital. B. Biopsia de tumor en medio de transporte (DMEM-F12/10% Antibiótico-Antimicótico) C. Siembra celular. D. Implantación celular (3 días). E. Proliferación celular (19 días). F. Proliferación celular (32 días). G. Proliferación celular (49 días). H. Muerte celular (85 días)

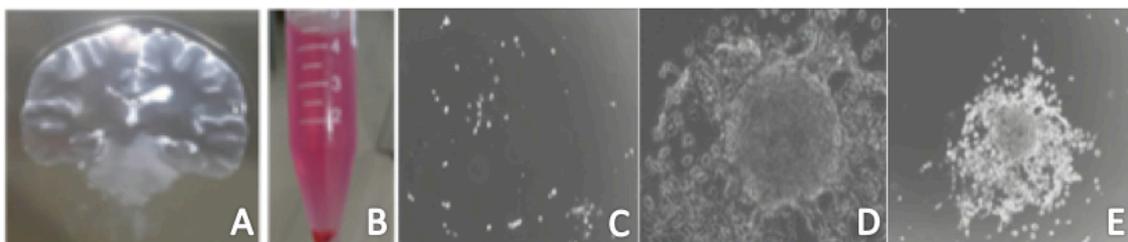


Figura 11. Paciente No. 4 SMM. A. Resonancia Magnética corte coronal. B. Biopsia de tumor en medio de transporte (DMEM-F12/10% Antibiótico-Antimicótico) C. Implantación celular (24 hrs). D. Probable Neuroesfera (2 días). E. Probable Neuroesferas (4 días).

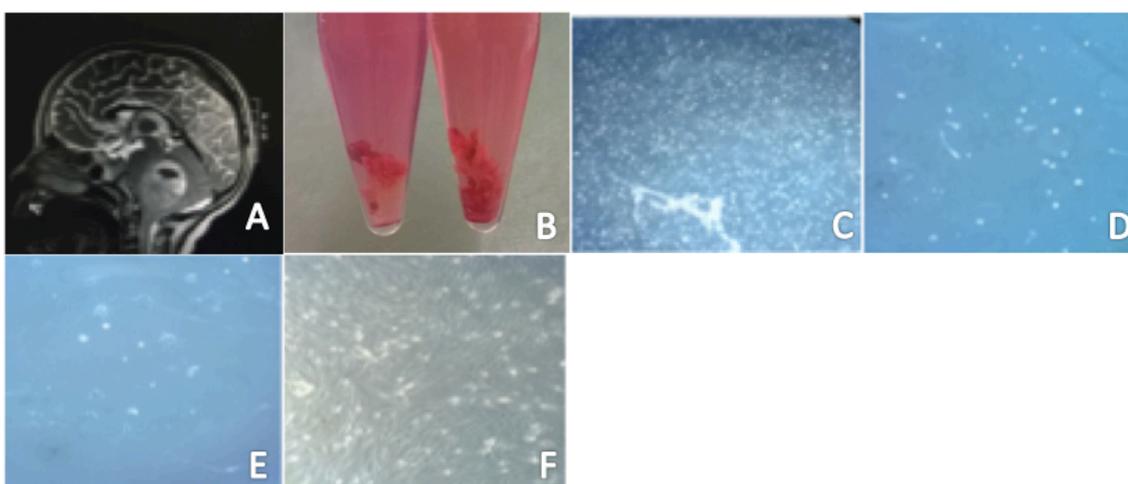


Figura 12. Paciente No. 5 LGRA. A. Resonancia Magnética corte sagital. B. Biopsia de tumor en medio de transporte (DMEM-F12/10% Antibiótico-Antimicótico) C. Siembra celular. D. Implantación celular (4 días). E. Proliferación celular (16 días). F. Proliferación celular (47 días).

XII. DISCUSIÓN

Estudios moleculares recientes han revolucionado el estudio de gliomas de alto grado a los que en la clasificación actual al contar con la expresión de H3K27M se conocen como glioma difuso de la línea media H3K27M mutado.(7) La mutación no se encuentra en el total de casos, sin embargo a partir de su origen celular, se observa su prevalencia en estructuras de la línea media y específicamente en puente. La mutación K27M en la histona H3.3 es un hallazgo frecuente entre los gliomas de puente en edad pediátrica y es la histona mas frecuente para estudio entre los glioblastomas así como la mutación H3K27M es la más afectada entre los gliomas de puente.(4)

Entre los hallazgos significativos se reporta que los pacientes con presencia de la mutación H3K27M comparado con los que no la tienen presentan menor sobrevida, la cual es independiente de la edad o la histología del tumor y de esta forma se justifica su definición en la clasificación de OMS como grado IV independiente de su histología. (38)(7). El cancer en Pediatría difiere en muchas maneras con respecto a los adultos como por ejemplo su incidencia, biología, respuesta y sobrevida.(34)

Existe una población de células llamadas células madre neuronales tumorales las cuales tienen propiedades de autoregeneración, proliferación y mantenimiento de células clonales confiriendo resistencia a la quimioterapia convencional y la radioterapia. (37) Uno de los retos es poder diferenciar entre las células tumorales y células madre neuronales tumorales utilizando biomarcadores específicos, que dentro de los avances de laboratorio mas notables en neurooncología se encuentran los estudios realizados utilizando cultivos de celulas tumorales, bajo condiciones especiales demostrando ser un método eficaz para obtener mayores cantidades de células madre tumorales capaces de ser utilizadas para estudios de biología tumoral.

Entre los pacientes que presentaron mutación de H3H27M los cuales contaban con realización de cultivo primario, el 60% presentó formación de neuroesferas y de estos corresponde al 100% de los glioblastomas. Se sugiere que las neuroesferas son de mal pronóstico, pero sería cuestionable si solo se tienen tumores malignos *per se* que tienen dicho pronóstico.

Se ha descrito que las neuroesferas favorecen un comportamiento biológico de mayor regeneración de células tumorales y por lo tanto una mayor proporción de crecimiento tumoral generando un panorama más sombrío para nuestros pacientes.

Las células madre neuronales tumorales juegan un papel importante en la resistencia al tratamiento así como el desenlace del paciente, por lo tanto dirigir tratamientos a estas células podría proporcionar una herramienta importante sobre la progresión y recurrencia del tumor cerebral. Se evalúa la hipótesis de que estas células derivan de poblaciones madre neuronales endógenas y no de la dediferenciación de las células gliales maduras. (35) Por décadas pasadas la teoría de tumorigénesis cerebral se fundamentaba en la existencia de células derivadas de un único linaje, sin embargo se ha demostrado la presencia de un espectro de distintos tipos celulares que componen los tumores presentando células con mayor potencial para la replicación y capacidad de desarrollar nuevos tumores, conocidas como células madre tumorales.

Nuestro primer caso es un paciente masculino de 2 años con diagnóstico histopatológico de Astrocitoma Difuso, recibió tratamiento con esquema ICE/TMZ por 4 cursos más radioterapia sin completar tratamiento ya que falleció por progresión tumoral. Es un paciente que contaba con resultado histopatológico de glioma de bajo grado antes que se considerara la nueva clasificación, no hubo crecimiento de neuroesferas, sin embargo ante localización se dirigía tratamiento con esquemas para

alto grado por la experiencia obtenida en nuestro hospital del comportamiento de los tumores en esta localización.

El segundo paciente, femenino con diagnóstico de glioma de alto grado que corresponde a un glioblastoma, con crecimiento de neuroesferas en su cultivo primario, fue tratado con ICE/TMZ completando 10 cursos, falleciendo en 13 meses y motivo de defunción choque séptico secundario a quimiotoxicidad.

Entre los pacientes estudiados, el tercer paciente, masculino con diagnóstico histopatológico de astrocitoma difuso, no presentó crecimiento de neuroesferas y fue tratado con un esquema altamente quimiotóxico. Debemos revalorar en un estudio subsecuente si ameritaba dar una quimioterapia tan agresiva considerando que el reporte de patología fue de un astrocitoma difuso más allá que la localización sea en tallo cerebral. Esto quiere decir que debe darse el valor a los hallazgos en los cultivos celulares asociado con el reporte de patología dado que el cuestionamiento sería que el paciente falleció por toxicidad secundaria a un esquema de quimioterapia más agresivo de lo que en realidad ameritaba y dar una quimioterapia menos intensa como en el caso de astrocitomas de bajo grado sin crecimiento de neuroesferas que corresponde el esquema Packer.

El paciente No.4 con diagnóstico histopatológico de astrocitoma difuso, con crecimiento de neuroesferas, fue tratado con quimioterapia de alta intensidad y sin embargo falleció por progresión tumoral debido al comportamiento ya comentado de estos tumores.

Nuestro 5to paciente contaba con diagnóstico histopatológico de glioblastoma, sin embargo llama la atención que siendo de histología agresiva y presentando cultivo primario con crecimiento de neuroesferas, el esquema de quimioterapia administrado fué el correspondiente para un tumor de bajo grado con esquema Packer lo que pudiera justificar porque el paciente falleciera por progresión tumoral.

Debido a la ubicación de estos tumores a menudo impiden su biopsia y cirugía para su estudio, sin embargo el contar con ellas proporciona material para realizar estudios moleculares que nos permitan dirigir el tratamiento.(6)

Entre las limitaciones de las neuroesferas, se ha postulado la posibilidad de que sean el resultado de la manipulación del ambiente experimental y reflejen un artefacto mas que un evento. Otra parte importante, es la ausencia actualmente de un protocolo estandarizado para comparar resultados ya que se han utilizado diferentes componentes y diferentes concentraciones de los mismos.(39) Se ha documentado en varios estudios realizados una relación estadísticamente significativa entre la formación de las neuroesferas y un deterioro mayor en la evolución en un tumor del neuroepitelio primario, tanto niños como adultos.(30)(40) Los estudios realizados sobre análisis del riesgo de muerte y progresión de acuerdo a formación o no de neuroesferas en los diferentes subgrupos histológicos demuestran que los pacientes con tumores de estirpe embrionaria si presentan relación significativa con muerte y progresión. En el caso de los tumores gliales como los de nuestro estudio muestran evidencia para la relación con progresión, no asi con el riesgo de muerte.(40)

XIII. CONCLUSIONES

La mayoría de los pacientes que presentaron expresión por inmunohistoquímica de H3K27M desarrollaron neuroesferas por cultivo primario representando el 60% de los casos. No todos los pacientes que presentan la mutación, desarrollan neuroesferas, sin embargo esto puede estar sesgado por la técnica que se utiliza para el cultivo primario, dada que la cantidad de muestra que por ser biopsia y repartirse para varios estudios pudiera no ser suficiente para el desarrollo de celularidad.

Es importante en base a lo comentado en los casos 3 y 5 que el tratamiento sea dirigido a la histología y presentación de neuroesferas para evitar progresión tumoral en tumores de alto grado y toxicidad en tumores de bajo grado.

XIV. RECOMENDACIÓN

- En los pacientes con diagnóstico histopatológico de glioma, referido en la actual clasificación de la OMS como glioma difuso de línea media al presentar por inmunohistoquímica la expresión de H3K27M, recomendamos se estudie por cultivo primario la formación de neuroesferas, además de la realización de estudio moleculares como la secuenciación y análisis de perfiles transcriptómicos que aporten conocimientos sobre el comportamiento biológico del tumor y permitirnos tomar consideraciones en su tratamiento de forma oportuna.

XV. BIBLIOGRAFÍA

1. Contreras LE. Epidemiología de Tumores Cerebrales. Rev Clínica Las Condes. 2017;28(3):332–8.
2. Gladson CL, Prayson RA. The Pathobiology of Glioma Tumors. Annu Rev Pathol. 2010;5(1):33–50.
3. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, Deimling A Von, Figarella D, Webster B, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System : a summary. Acta Neuropathol. 2016;131(6):803–20.
4. Buczkowicz DKP, Rakopoulos P. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. Acta Neuropathol. 2012;124(1):439–47.
5. Gianno F, Antonelli M, Ferretti E, Massimino M, Arcella A, Giangaspero F. Pediatric high-grade glioma: A heterogeneous group of neoplasms with different molecular drivers. Glioma. 2018;1(4):100–10.
6. Mathew RK, Rutka JT, Ph D. Diffuse Intrinsic Pontine Glioma : Clinical Features, Molecular Genetics and Novel Targeted Therapeutics. J Korean Neurosurg Soc. 2018;61(3):343–51.
7. Karremann M, Gielen GH, Hoffmann M, Wiese M, Colditz N, Warmuth-metz M, et al. Diffuse high-grade gliomas with H3K27M mutations carry a dismal prognosis independent of tumor location. Neuro Oncol. 2018;20(August 2017):123–31.

8. Delgado-coello BA. ¿Qué es la Epigenetica? Cienc - Acad Mex Ciencias. 2011;62(1):73–82.
9. Arenas-huertero F, Recillas-targa F. Modificaciones epigenéticas de la cromatina en la generación de cáncer. Gac Med Mex. 2002;138(6):230–60.
10. Cient C. Enfermedades Epigeneticas: desde el cancer hasta la sordera. Rev RAcad Cienc Exact Fis Nat. 2009;103(2008):79–96.
11. Mcginty RK, Tan S. Nucleosome Structure and Function. Chem Rev. 2015;115(1):2255–73.
12. Histone H, Variant MA, Yuen BTK, Knoepfler PS. Histone H3.3 Mutations: A Variant Path to Cancer. Cancer Cell. 2013;24(5):567–74.
13. Benson LJ, Gu Y, Yakovleva T, Tong K, Barrows C, Strack CL, et al. Modifications of H3 and H4 during Chromatin Replication, Nucleosome Assembly and Histone Exchange. J Biol Chem. 2011;281(14):9287–96.
14. Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications. Nat Publ Gr. 2011;21(3):381–95.
15. Shi L, Wen H, Shi X. The Histone variant H3.3 in transcriptional regulation and human disease. J Mol Biol. 2018;429(13):1934–45.
16. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Jones DTW, Sill M, Bender S, et al. Hotspot Mutations in H3F3A and IDH1 Define Distinct Epigenetic and Biological Subgroups of Glioblastoma. Cancer Cell. 2012;22(1):425–37.

17. Lu VM, Alvi MA, McDonald KL, Daniels DJ. Impact of the H3K27M mutation on survival in pediatric high-grade glioma: a systematic review and meta-analysis. *JNS Pediatr.* 2018;1(1).
18. Romani M, Pistillo MP, Banelli B. Epigenetic Targeting of Glioblastoma. *Front Oncol.* 2018;8(October):1–9.
19. Creasy CL. Untangling the role of mutant histone H3 in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nat Publ Gr.* 2017;23(4):413–4.
20. Silveira AB, Kasper LH, Fan Y, Jin H, Wu G, Shaw TI, et al. H3.3 K27M depletion increases differentiation and extends latency of diffuse intrinsic pontine glioma growth in vivo. *Acta Neuropathol.* 2019;1(123456789):10–8.
21. Liu X, Mceachron TA, Schwartzentruber J. Histone H3 Mutations in Pediatric Brain Tumors. *Cold Spring Harb Lab Press.* 2014;6(a018689):78–90.
22. Lidia OM, Laura RRS, Zambrano A, Aranda A. Histone deacetylase inhibitors : mechanism of action and therapeutic use in cancer. *Clin Transl Oncol.* 2008;10(1):395–8.
23. Villar DD. Modificaciones de la cromatina , regulación génica y cáncer. *Acad Mex ciencias.* 2011;62(1):139–83.
24. Ching Y, Wan E, Liu J, Chan KM. Histone H3 Mutations in Cancer. *Curr Pharmacol Reports.* 2018;4(1):292–300.
25. Expression BG, Larson JD, Kasper LH, Paugh BS, Ellison DW, Zhang J, et al. Histone H3 . 3 K27M Accelerates Spontaneous Brainstem Glioma and Drives

- Restricted Changes in Bivalent Gene Expression. *Cancer Cell Rev.* 2019;35(1):1–16.
26. Angel E, González H, Aguilar EJ. Evolución del medio de cultivo en el estudio de las células madre neuronales. *REV MED UV.* 2009;1(228):100–20.
27. Chong Y-K, Toh T-B. Cryopreservation of Neurospheres Derived from Human Glioblastoma Multiforme. *Cancer Cell.* 2009;27(1):29–39.
28. Suslov ON, Kukekov VG, Ignatova TN, Steindler DA. Neural stem cell heterogeneity demonstrated by molecular phenotyping of clonal neurospheres. *Neurosci Neurosurg.* 2002;99(22):100–20.
29. Campos LS. Neurospheres: Insights Into Neural Stem Cell Biology. *J Neurosci Res.* 2004;78(1):761–9.
30. Valenciano EV, Fisiología D De, Medicina E De, Universidad D, Rica DC, Costarricense C, et al. Importancia de Células Madre TumORAles y Cultivos de Neuroesferas en Neurooncología. *Neuro Oncol.* 2012;1(1):55–60.
31. Hulspas R, Quesenberry PJ. Characterization of Neurosphere Cell Phenotypes by Flow Cytometry. *Cancer Cent Cell Biol.* 2000;250(1):245–50.
32. Rojas IAM, Bertholdo D, Castillo M. Células madre: implicaciones en el desarrollo de tumores cerebrales. *Radiologia.* 2012;54(3):221–30.
33. Ae RM, D OS. Cellular Differentiation in the nervous system: The case of Neuroglial precursor cells. *Rev Bio ciencias.* 2011;1(55):3–17.

34. Friedman G, Gillespie GY. Cancer Stem Cells and Pediatric Solid Tumors. *Cancer Cent Cell Biol.* 2011;3(1):298–318.
35. Germano I. Primary brain tumors, neural stem cell and brain tumor cancer cells: where is the link? *Neurosci Neurosurg.* 2011;58(6):903–10.
36. Lázcoz P, Balbuena J, Enguita M, Js C. Detection and isolation of immature neural cells from tumoral cell lines of the nervous system. *Fund MAPRE.* 2008;19(1):120–7.
37. Eguiara A, Elorriaga K, Rezola R, García Á, Wxpruhv OR V, Frpr D, et al. Células madre tumorales : una diana terapéutica en el cáncer de mama. *Rev Senol y Patol Mamar.* 2012;25(3):107–15.
38. Gielen GH, Gessi M, Hammes J, Kramm CM. H3F3A K27M Mutation in Pediatric CNS Tumors. A Marker for Diffuse High-Grade Astrocytomas. *Am Soc Clin Pathol.* 2013;139(1):345–9.
39. Guerrero-cázares H, Chaichana KL, Quiñones-hinojosa A. Neurosphere Culture and Human Organotypic Model to Evaluate Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Stem Cells.* 2009;568(1):73–83.
40. Panosyan EH, Laks DR, Masterman-smith M, Mottahedeh J, Yong WH, Cloughesy TF, et al. Clinical Outcome in Pediatric Glial and Embryonal Brain Tumors Correlates With In Vitro Multi-Passageable Neurosphere Formation. *Pediatr Blood Cancer.* 2010;55(April):644–51.

XVI. ANEXO

Hoja de Recolección de datos

**“ PRESENCIA DE NEUROESFERAS EN CULTIVOS PRIMARIOS
DE GLIOMAS PONTINOS INTRÍNSECOS DIFUSOS DE
PACIENTES PEDIÁTRICOS Y EXPRESIÓN
INMUNOHISTOQUÍMICA DE H3K27M ”**

Paciente No. _____

Reporte de Biopsia: _____

Fecha de Inmunohistoquímica de H3K27M: _____

Fecha de Cultivo primario: _____

Reporte Cultivo primario: _____