



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LAS  
PROTEÍNAS B-CATENINA, YAP1, GAB1 Y P53  
COMO MARCADORES MOLECULARES EN  
MICROARREGLOS DE TEJIDOS DE PACIENTES  
PEDIÁTRICOS CON MEDULOBLASTOMA.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**



**PRESENTA:  
DIEGO ANAYA ESTRADA**

**DIRECTORA DE TESIS: D. en C. GUILLERMINA JULIANA  
BAAY GUZMÁN  
ASESORES: M. en C. ROSA ELBA GALVÁN DUARTE  
QFB. IXEL VENECIA GONZÁLEZ HERRERA**



**CIUDAD DE MÉXICO, 2021**



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.

## **Agradecimientos**

A la Dra. Pilar Eguía del Laboratorio de Investigación en Patología Experimental.

A la Dra. María de Lourdes Cabrera del Departamento de Patología Clínica y Experimental.

A la Dra. Alicia Rodríguez Velasco del Departamento de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.

Al Biol. Exp. Daniel Dimitri Hernández Cueto de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

Al Dr. Rosendo Luria Pérez de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

A la directora de tesis, la Dra. Guillermina J. Baay Guzmán de la Unidad de Investigación en Enfermedades Oncológicas.

A las asesoras internas, la Mtra. Rosa Elba Galván Duarte y la QFB Ixel Venecia González Herrera.

A los miembros de mi sínodo.

- Mtra. Araeli García del Valle
- Dra. Guillermina J. Baay Guzmán
- QFB Enrique Escalera Zuñiga
- QFB Ixel Venecia González Herrera
- Mtra. Rosa Elba Galván Duarte.

HIM/2018/092

Fondos Federales del HIMFG

Este proyecto fue aprobado por el comité de investigación, ética y bioseguridad.

## **Dedicatorias**

A mi hermano Daniel, por compartir conmigo grandes momentos de nuestras vidas y ser mi mejor amigo.

A mis padres, por todo el amor que me han dado, toda la comprensión, enseñanzas y valores que ahora forman parte de mí.

A mi tía Rocío por abrirme las puertas de su casa, ser atenta conmigo y darme compañía durante todo mi periodo universitario.

A mis abuelos, quienes son las bases y pilares de sus familias, y que gracias a ellos soy la persona que actualmente soy.

A mis tíos, tías y primos de las familias Anaya y Estrada, por ser siempre atentos conmigo, darme su confianza y brindarme su cariño.

A todos mis amigos que han estado ahí para mí, y gracias a los cuales he disfrutado todas las etapas de mi vida de una manera grata.

# ÍNDICE

Página

<b>Resumen</b> .....	<b>5</b>
<b>Marco Teórico</b> .....	<b>6</b>
Cáncer.....	6
Epidemiología del Cáncer .....	6
Meduloblastoma.....	7
Clasificación .....	8
Clasificación Histopatológica .....	9
Clásico.....	9
Desmoplásico Nodular .....	9
Nodularidad Extensa .....	9
Células Grandes/Anaplásico .....	9
Subclasificación Molecular .....	11
Meduloblastoma Vía WNT Activada .....	11
Meduloblastoma SHH Activado .....	12
Meduloblastoma SHH Activado, TP53 mutado .....	13
Meduloblastoma no-WNT/no-SHH.....	14
Manifestaciones Clínicas .....	16
Diagnóstico .....	17
Estratificación de Riesgo Actual .....	18
Tratamiento .....	19
<b>Planteamiento de Problema</b> .....	<b>21</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>21</b>
<b>Objetivos</b> .....	<b>22</b>
General .....	22
Específico.....	22
<b>Material y Métodos</b> .....	<b>23</b>
Procedimientos.....	25
Construcción de Microarreglo de Tejidos .....	25
Inmunohistoquímica .....	25
Patología Digital .....	26

Análisis Estadístico .....	26
<b>Resultados.....</b>	<b>27</b>
Inmunorreactividad Diferencial .....	27
Análisis y Clasificación .....	39
Comparación de Clasificaciones.....	46
Correlación con datos demográficos.....	48
<b>Discusión .....</b>	<b>57</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>62</b>
<b>Perspectivas .....</b>	<b>63</b>
<b>Referencias.....</b>	<b>65</b>

## Abreviaturas

<b>ABREVIATURA</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>CTNNB</b>	Catenin- $\beta$ ( $\beta$ -Catenina)
<b>FISH</b>	Fluorescence in situ hybridization
<b>GAB1</b>	Proteína 1 de unión Asociada a GRB2
<b>IHQ</b>	Inmunohistoquímica
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PNET</b>	Primitive neuroectodermal tumor
<b>PTCH</b>	Patched
<b>SHH</b>	Sonic Hedgehog
<b>SMO</b>	Smoothened
<b>SNC</b>	Sistema Nervioso Central
<b>TMA</b>	Microarreglo de Tejidos
<b>TP53</b>	Tumor de Proteína 53
<b>WNT</b>	Wingless-related integration site
<b>YAP1</b>	Yes-associated Protein-1

## Resumen

Las neoplasias del Sistema Nervioso Central son la tercera causa de cáncer infantil, siendo el meduloblastoma (MB) el más común, con aproximadamente el 20% de prevalencia. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasifica dentro del grupo de los tumores embrionarios, grado IV y tradicionalmente el diagnóstico ha sido establecido por evaluación histopatológica. Sin embargo, en el 2016, se realizó una actualización, en donde se requiere la combinación de las variantes histológicas y genéticas definidas como un estándar en su identificación y clasificación.

Esta reclasificación está basada en el reconocimiento de 4 subgrupos moleculares de MB genéticamente definidos: WNT (Wingless-related integration site), SHH (Sonic Hedgehog), grupo 3 y grupo 4. Donde el subgrupo más raro es WNT, este tiene un pronóstico favorable y raramente presenta metástasis, se identifica por una reacción de inmunohistoquímica (IHQ) de  $\beta$ -catenina núcleo positiva y la presencia de una monosomía en el cromosoma 6. Los tumores SHH representan el 30% de los MB, se determinan por IHQ la expresión de YAP1 y GAB1, y a su vez los tumores SHH se pueden distinguir entre sí, por la presencia o ausencia de P53. Los Grupo 3 y Grupo 4 (no-WNT/no-SHH) representan la mayoría de los MB y están relacionados, son molecular y clínicamente heterogéneos con desenlaces diversas, siendo los menos comprendidos.

Esta clasificación es empleada en países desarrollados, sin embargo, en México se continúa usando la clasificación por histología debido a los altos costos de las técnicas e infraestructura necesarias. Por lo que el objetivo del presente trabajo es clasificar en los diferentes grupos moleculares a una corte de pacientes pediátricos con meduloblastoma por la determinación de proteínas por tinciones de inmunohistoquímica, y evaluar la correlación con los datos demográficos. Sentando las bases para realizar el diagnóstico establecido por la OMS y por consiguiente apoyará el pronóstico y tratamiento más adecuado de los pacientes pediátricos con meduloblastoma en nuestro país.

## **Marco Teórico**

### **Cáncer**

El cáncer es un conjunto de diversas enfermedades las cuales se caracterizan por sufrir un crecimiento descontrolado de células con el potencial de convertirse en malignas a través de la adquisición de características aberrantes (potencial replicativo sin límite, autosuficiencia en señales de crecimiento, evasión de apoptosis, angiogénesis sustentable, evasión del sistema inmune) durante su desarrollo como resultado de factores ambientales o genéticos (1).

Puede aparecer en cualquier tejido del cuerpo, además de que la adquisición de características malignas puede llevar al tumor a invadir tejidos circundantes o distantes, lo que se conoce como metástasis. Un porcentaje importante de neoplasias pueden tratarse mediante cirugía, radioterapia o quimioterapia, especialmente si se detectan en una fase temprana (1,2).

### **Epidemiología del cáncer**

En 2020 el Globocan (Global Cancer Observatory) reportó a nivel mundial una prevalencia de 50,550,287 casos de cáncer, una incidencia de 19,292,789 nuevos casos, así como 9,958,133 defunciones por cáncer (3). Específicamente en México, se reportó una prevalencia de 530,602 casos, una incidencia de 195,499 nuevos casos, así como 90,222 defunciones (4).

En México el cáncer infantil representa la principal causa de muerte por enfermedad entre los 5 y 14 años edad, cobrando más de 2,000 vidas anuales.

De acuerdo con los registros del Centro Nacional para la Salud de la Infancia y la Adolescencia (CeNSIA), la supervivencia global estimada a 5 años de todos los tipos de cáncer en menores de edad es del 56% (5). El cáncer en el Sistema Nervioso Central (SNC) representa el 1.6% de los nuevos casos de cáncer a nivel mundial, mientras que en México es del 1.6% (3,4).

Uno de los tipos de tumores que afecta al SNC son los meduloblastomas (MB), que representan el 63% de tumores embrionarios intracraneales y tiene una incidencia anual de 5 casos por cada millón de individuos. Las cúspides de incidencia se presentan en los grupos por edad de 1-4 años y de 5-9 años, con una edad media de diagnóstico de 6 años, raramente el meduloblastoma es diagnosticado en adultos. En general, el MB es más común en hombres que en mujeres, con una proporción de 1.8:1 (hombres: mujeres), aunque la predominancia de sexo varía entre los subgrupos de meduloblastoma. Aproximadamente en 18% de pacientes desarrollan neoplasias subsecuentes durante los 30 años posteriores al diagnóstico, lo cual puede parcialmente ser explicado por predisposición hereditaria. No se han reportado alguna diferencia sustancial en la incidencia del meduloblastoma a través de las regiones étnicas o geográficas (6).

### **Meduloblastoma**

El meduloblastoma o PNET (tumor neuroectodérmico primitivo cerebeloso) es el tumor cerebelar maligno más común en niños, en nuestro país representa aproximadamente el 20% de tumores cerebrales pediátricos (7–9). Siendo diagnosticado principalmente entre los 6-8 años de edad y antes de los 19 años, tiene una predominancia por los varones con una proporción 1.8:1 (6,9,10). Mientras que en adultos entre la tercera y cuarta décadas de la vida se presenta con mucha menor frecuencia, constituyendo el 1% de las neoplasias del sistema nervioso central (11).

Se define como un tumor embrionario neuroepitelial que se localiza preferentemente en la fosa posterior, de color gris a púrpura, consiste en un cúmulo de células indiferenciadas densamente compactadas con pleomorfismo nuclear ligero a moderado y un alto índice mitótico (10,11). Actualmente se acepta que este tumor se origina de los precursores de las células granulares del cerebelo, de la zona ventricular y de los precursores neuronales de la porción dorsal del puente (11).

## Clasificación

Los meduloblastomas históricamente fueron subdivididos por grupo de riesgo estándar y alto, basado en el porcentaje de tumor residual postoperatorio, presencia de metástasis y la edad del paciente (12).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) lo clasifica dentro del grupo de los tumores embrionarios del Sistema Nervioso Central grado IV (11). Los tumores grado IV se caracterizan por su rápido crecimiento con alta tasa mitótica, pudiendo presentar vasos de neoformación y áreas de necrosis.

Tradicionalmente, el diagnóstico ha sido establecido por evaluación histopatológica, reconociendo la OMS cinco variantes histológicas de acuerdo con su morfología: 1.- Clásico, 2.-Desmoplásico/Nodular (DN), 3.- Meduloblastoma con Nodularidad Extensa (MBNE), 4.- Células Grandes (CG) y 5.- Anaplásico (A) “estos dos últimos se combinaron después en una categoría histopatológica como CG/A”.

Sin embargo, estas variantes histológicas reflejan parcialmente una heterogeneidad subyacente molecular, y no es posible por morfología establecer a que grupo genético corresponden, la actualización más reciente de la clasificación de tumores del SNC de la OMS dicta que para hacer el diagnóstico de los MB se incluyan las siguientes determinaciones; diagnóstico histológico de meduloblastomas, además de una clasificación por técnicas de inmunohistoquímica, biología molecular y definido genéticamente. La combinación de estudios se denomina diagnóstico integral y se recomienda como estándar para el diagnóstico debiendo de realizar el mayor número de técnicas posibles (6,10).

## Clasificación Histopatológica

Cinco subtipos histológicos han sido individualizados, y todos ellos están categorizados como neoplasias de grado IV.

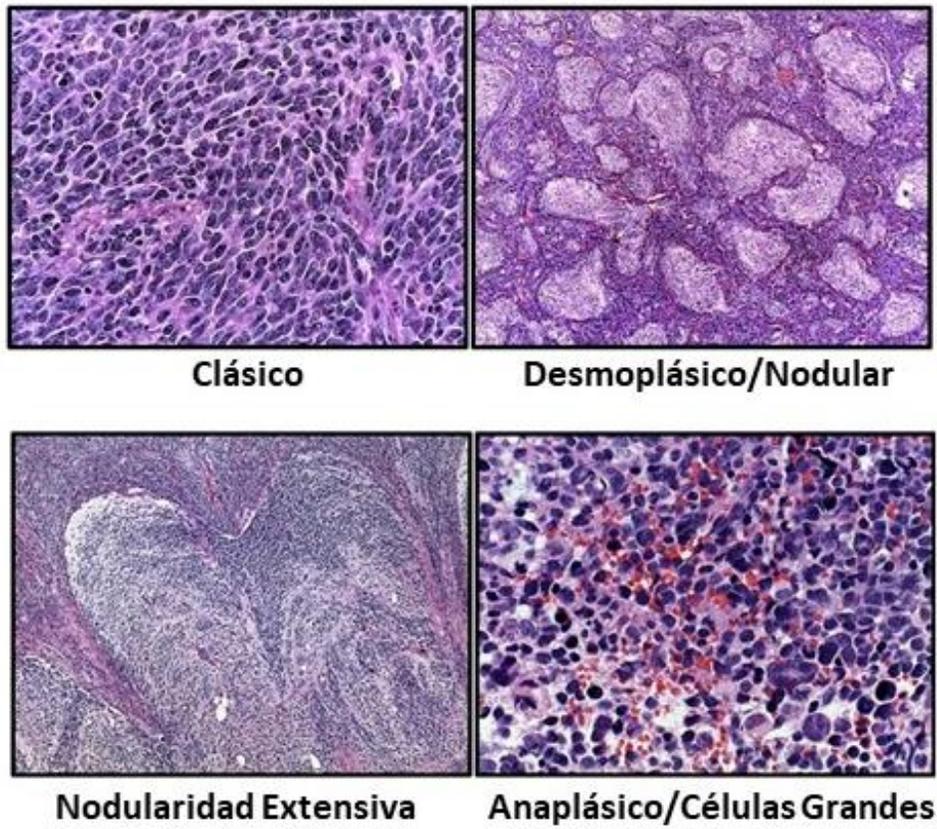
Clásico: La variante clásica es la que se encuentra más frecuentemente y se caracteriza por alta celularidad y elevados índices proliferativos. Las células de los meduloblastomas clásicos tienen un tamaño pequeño o mediano, núcleos hipercromáticos redondos u ovalados y un citoplasma mínimo, rosetas de Homer-Wright están entremezcladas y su presencia se asocia con alta actividad mitótica y pleomorfismo nuclear incrementado.

Desmoplásico/nodular: La desmoplasia es el fenómeno de producción excesiva de tejido conectivo, pobre en células y rico en fibras de colágeno, puede presentarse focalmente en muchos meduloblastomas. La extensa desmoplasia es una característica de la variante desmoplásico/nodular, la cual se distingue de la variante clásica por la presencia de nódulos, “islas pálidas” con poca reticulina de diferenciación neurocítica rodeada densamente compactada, con células mitóticas activas.

Nodularidad extensa: Comparado con el meduloblastoma desmoplásico/nodular, la variante relacionada de nodularidad extensa tiene una arquitectura lobular expandida con zonas libres de reticulina más prominentes que son más elongadas. Tanto la variante desmoplásico/nodular como nodularidad extensa están asociadas con un mejor pronóstico a comparación de los MB clásicos.

Células grandes / anaplásico: Las variantes histológicas de anaplásico y células grandes coinciden en un número considerable de características citológicas, por lo tanto, estas variantes a menudo se consideran juntas y se engloban como “células grandes/anaplásico” los cuales se asocian a un mal pronóstico. La histología anaplásica se caracteriza por un pleomorfismo citológico marcado a

difuso en asociación con un índice mitótico alto y apoptosis. El MB de células grandes se define por grupos de células grandes y redondas con un solo nucleolo, el cual también tiene índices mitóticos y apoptóticos elevados en comparación con otras variantes histológicas (6,13–15).



**Figura 1.** Diversidad Histológica de los meduloblastomas. (Servicio de Patología, Hospital Infantil de México Federico Gómez)

Sin embargo, estas variantes histológicas reflejan parcialmente una heterogeneidad subyacente molecular, la última actualización de la OMS requiere la combinación de variantes histológicas y genéticas definidas en un diagnóstico integral como un estándar, como sea técnicamente posible (6,10).

Con el conjunto de parámetros moleculares para la clasificación de tumores del sistema nervioso central, se han reconocido 4 subgrupos moleculares de meduloblastomas genéticamente definidos: WNT (Wingless), SHH (Sonic Hedgehog), grupo 3 y grupo 4 (7,16,17).

En 2016 la OMS reclasificó a los MB de acuerdo con sus características moleculares en adición a la histopatología. La clasificación molecular se relaciona con la agrupación de estos en base a su transcriptoma o su perfil de metilación, y ha sido introducida debido al incremento de su utilidad clínica. Sin embargo, las técnicas empleadas son laboriosas, caras y requieren de infraestructura, lo que hace difícil su incorporación en la evaluación patológica de rutina de este cáncer. Pocos estudios han intentado clasificar a los meduloblastomas en subgrupos moleculares usando técnicas más económicas como la inmunohistoquímica (IHQ) e hibridación fluorescente *in situ* (FISH), las cuales proveen resultados rápidos y reproducibles en los tejidos parafinados. Estos métodos están disponibles en muchos laboratorios de patología diagnóstica alrededor del mundo (7,10), sin embargo en México aún no está implementado el uso de estos estudios para el diagnóstico de esta neoplasia.

### **Subclasificación Molecular**

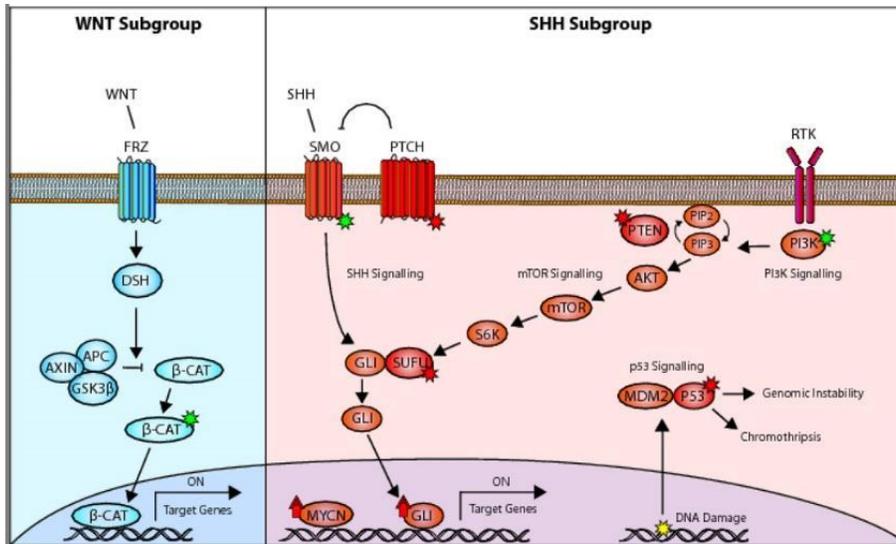
Meduloblastoma vía WNT activada: Este representa el subgrupo más raro constituyendo aproximadamente el 10% de todos los meduloblastomas. Tiene un resultado favorable comparado con los otros subgrupos, afecta principalmente a los niños y adolescentes, y muestra una ligera predominancia en niñas. Se considera que los meduloblastomas WNT surgen de las células progenitoras del tallo cerebral dorsal (18), y son localizados normalmente en la línea media del cerebro, y ocupan el cuarto ventrículo. Raramente presentan metástasis (13).

Los tumores con la vía WNT activa son identificados por la presencia de al menos dos características: una mutación en el gen CTNNB1 (Catenin beta-1 o  $\beta$ -Catenina en español) la cual puede ser identificada mediante una reacción de inmunohistoquímica nuclear positiva de  $\beta$ -catenina y la presencia de monosomía del cromosoma 6 (17,19–21). Es frecuente encontrar mutaciones sin sentido en TP53 (Tumor Protein 53, también denominada como "el guardián del genoma" debido a su papel en la conservación de la estabilidad al prevenir la mutación genómica, previniendo así el cáncer por ser un gen supresor tumoral). A pesar de ser un marcador de alto riesgo en el subgrupo SHH y en otros tipos de cáncer, las mutaciones en TP53 no confieren diferencia alguna en la supervivencia de los pacientes diagnosticados con meduloblastomas WNT activado (22,23).

*Meduloblastoma SHH activado:* Cerca del 30% de todos los MB se clasifican como tumores SHH los cuales se localizan a menudo lateralmente en el hemisferio cerebelar, hay evidencia de que se originan de las células precursoras de la capa granular externa del cerebelo (18). Generalmente se presenta en niños de 4 años o menos. La hiperactivación de la vía de señalización Sonic Hedgehog es característica en este subgrupo y es frecuente debido a mutaciones en los genes supresores de tumores PTCH, SMO, y SUFU (18,22,24). Además, se asocian a menudo a la pérdida del cromosoma 9q, y con menos frecuencia con la pérdida del 17p o 10q, o la ganancia de 3q (13).

La vía SHH juega un rol crítico en el desarrollo cerebelar normal. El ligando SHH es secretado por las neuronas de Purkinje, el cual promueve la mitogénesis en células progenitoras de capas granulares externas. La respuesta a la señal SHH es controlada por PTCH y SMO, las cuales son proteínas transmembranales. PTCH suprime la actividad de SMO en la ausencia del ligando SHH (24).

Los tumores con SHH activo son determinados por la presencia de una reacción de inmunohistoquímica de YAP1 y GAB1 (19,20).



**Esquema 1.** Vías desreguladas en los meduloblastomas WNT y SHH (22).

Meduloblastoma SHH activado, TP53 mutante: Los meduloblastomas SHH activado pueden ser divididos en cuatro subgrupos (SHH- $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ) los cuales reflejan distintas aberraciones somáticas, vías activadas y sobrevida. Las mutaciones de TP53 son significativas en el pronóstico (9,16).

Los meduloblastomas SHH y TP53 mutante son tumores raros con un mal pronóstico que compromete pacientes entre los 4 y 17 años, raramente se observa en infantes y adultos. Es definido como un tumor del cerebelo con evidencia de activación de la vía SHH, así como mutación de línea germinal o somática de TP53. La activación de la vía SHH en tumores TP53 mutantes se relaciona con pérdida de 17p, y amplificaciones de los genes GLI2, MYCN, o SHH, y las mutaciones en PTCH, SUFU, y SMO son no tan comunes. Estos tumores usualmente presentan la histología de anaplásico/células grandes (10,23,24).

La mayoría de las fallas al tratamiento en meduloblastomas SHH activado está relacionado con mutaciones en TP53. Este grupo es de muy alto riesgo. Una explicación potencial para el mal pronóstico en tumores SHH y TP53 mutado se

relaciona con resistencia a la radiación, así como la recaída local como la mayoría de los tumores SHH (23).

Meduloblastoma no-WNT/no-SHH: Los MB del grupo 3 y grupo 4 están más relacionados entre ellos que con los WNT y SHH y aparecen en la edición 2016 de la OMS como no-WNT/no-SHH, aun así, son molecular y clínicamente heterogéneos con consecuencias diversas. Estos tumores representan cerca de dos terceras partes de los meduloblastomas (10,25).

El perfil de transcriptoma del grupo 3 se caracteriza por relativamente alta expresión de MYC, un protooncogén que actúa como factor de transcripción y está involucrado en la regulación del ciclo celular, así como en la inmortalización, apoptosis, proliferación y diferenciación celular. Los tumores del grupo 4 se caracterizan por alteraciones recurrentes en KDM6A y SNCAIP, el primero es un gen que regula la expresión genética a través de histonas y el segundo una proteína relacionada con neurodegeneración, además de otros genes. Con un panel de tres anticuerpos ( $\beta$ -catenina, GAB1 y YAP1) se pueden definir estos grupos, los tumores no-WNT/no-SHH expresan inmunoreactividad citoplasmática a  $\beta$ -catenina (no nuclear) y las células tumorales son inmunonegativas a GAB1 y YAP1 (10,26,27).

Los meduloblastomas del grupo 3 cuentan aproximadamente con el 25% de los casos, predominantemente entre infantes y niños, con su rango máximo de diagnóstico entre 3 a 5 años y casi nunca en adultos (25). Su origen celular es poco claro.

El Grupo 4 es el subgrupo más común, presentando cerca del 35% al 40% de los casos de meduloblastoma, no obstante, es el más desconocido de todos, con su biología subyacente que es la menos comprendida (25). Muchos MB del grupo 4 expresan marcadores de neuronas glutamatérgicos, las cuales pueden ser las células de origen. Estos tumores están localizados entre el 4to ventrículo. Tienen alteraciones citogenéticas recurrentes, incluyendo amplificaciones de MYCN y

CDK6, pérdida del cromosoma 11, y duplicación de la región donde el gen SNCAIP se localiza en el cromosoma 5. El isocromosoma 17q es la alteración genética más común en el Grupo 4, pero a diferencia de los tumores Grupo 3 con MYC intensificado, este no es predictivo de la supervivencia (28). Mutaciones somáticas de TP53 no se han observado en el diagnóstico de los MB Grupo 3 y Grupo 4, se puede observar en la recaída, y por lo general se asocia con amplificación de MYC (23).

Los meduloblastomas Grupo 3 y Grupo 4 han sido reportados con perfiles de riesgo bajos e intermedios (28).

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 <sup>-</sup>		9q <sup>-</sup> , 10q <sup>-</sup> , 17p <sup>-</sup>		Balanced genome		7 <sup>+</sup> , 8 <sup>+</sup> , 10 <sup>-</sup> , 11 <sup>-</sup> , i17q			7q <sup>+</sup> , 8p <sup>-</sup> , i17q		7q <sup>+</sup> , 8p <sup>-</sup> , i17q (less)	
	Focal			MYCN amp, GLI2 amp, YAP1 amp		PTEN loss		10q22 <sup>-</sup> , 11q23.3 <sup>-</sup>			MYCN amp, CDK6 amp		SNCAIP dup	
Other events				TP53 mutations				TERT promoter mutations			High GF11/1B expression			

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

**Esquema 2.** Resumen gráfico de los Subgrupos de Meduloblastoma. (16)

Por lo anterior, esta nueva clasificación brinda una categorización apropiada de los pacientes lo que se verá reflejado en la elección del tratamiento y esta necesidad se puede observar debido a que todas las morfologías histológicas se encuentran en los tumores SHH. Es decir, el clásico ha sido reportado entre el 40-45% de los tumores, los desmoplásicos/nodulares en un 30-35% de los tumores, los de nodularidad extensa en un 10% y los CG/A en un 15-20% de los tumores. El subgrupo molecular SHH es además dividido en tumores SHH-TP53 tipo-salvaje, los cuales son comúnmente asociados a la histología desmoplásico/nodular, y tumores SHH-TP53 mutantes, los cuales se asocian a menudo con la morfología células grandes/anaplásico.

A la inversa, los MB-WNT son casi todos de histología clásica. Los Grupo 3 tienen morfología tanto clásica como células grandes/anaplásico, así mismo, muchos meduloblastomas Grupo 4 son de morfología clásica, aunque del 10-15% presentan morfología de células grandes/anaplásico (6,9,24,29).

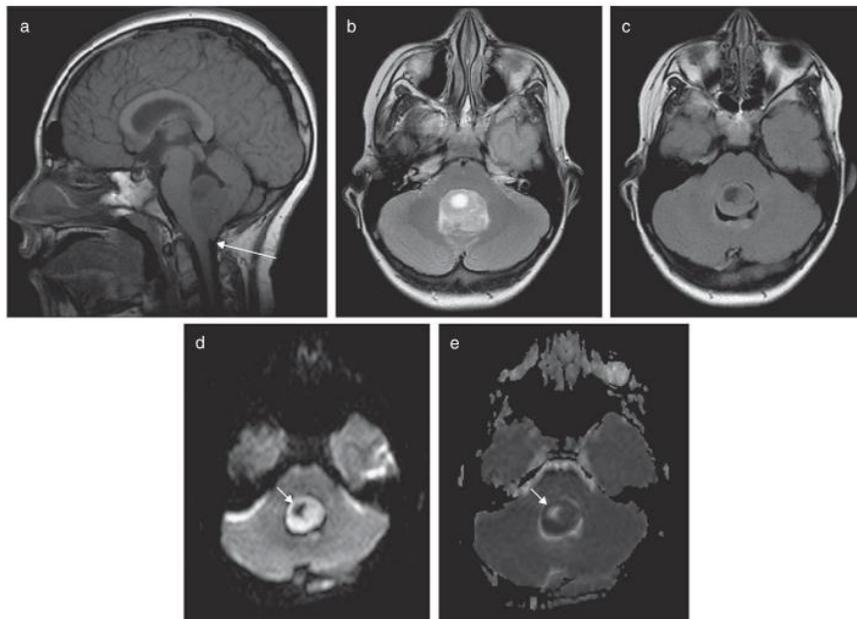
Los tumores con nodularidad extensa y SHH son usualmente tumores con un excelente pronóstico, con tasas de sobrevida del 95% (24).

### **Manifestaciones clínicas**

En concordancia con su alta tasa de crecimiento, los pacientes con meduloblastoma presentan comúnmente síntomas que evolucionan sobre un periodo de semanas a meses. Frecuentemente se encuentran una combinación de signos y síntomas de disfunción cerebelar y aumento de la presión intracraneal. Los síntomas clásicos de aumento de la presión intracraneal incluyen irritabilidad, letargia, náusea y vómito, dolor de cabeza matinal, anorexia, y cambios de comportamiento (15,30). Síntomas más específicos de meduloblastoma incluyen ataxia, dificultades con la escritura u otras habilidades motoras, así como problemas de visión o estrabismo (6).

## Diagnóstico

El MB tiene características de imagen distintivas en tomografía computarizada (TC) e Imagen por resonancia magnética (IRM). La TC inicial determina complicaciones tumorales como el grado de hidrocefalia secundaria a la obstrucción y signos de hipertensión endocraneal. En la RM el tumor es predominantemente homogéneo, con un escaso componente necrótico, hemorrágico o cálcico (15,30).



**Esquema 3.** Imágenes en RM características del meduloblastoma. a) RM sagital T1. b) RM axial T2. c) RM axial Flair. d) RM difusión. e) Mapa ADC. Flecha larga representa la masa tumoral.

El diagnóstico actual del meduloblastoma requiere la resección quirúrgica del tumor para proceder a un análisis integral histopatológico y molecular. Pruebas de IHQ y moleculares pueden utilizarse para distinguir seguramente los meduloblastomas de otros tumores cerebrales embrionarios y neuronales con histopatología similar, tales como tumor rabdoide/teratoide atípico (TT/RA), tumores embrionarios con rosetas de capas múltiples, glioblastoma de células pequeñas, y ependimoma de la fosa posterior (6).

Todo paciente con meduloblastoma deberá ser evaluado mediante un examen de imágenes del neuroeje (medula espinal, encéfalo), un análisis del líquido cefalorraquídeo (siempre que no exista hipertensión endocraneana) para detectar células tumorales libres en el espacio subaracnoideo (31).

### **Estratificación de riesgo actual**

Los pacientes con MB actualmente se estratifican en dos grupos de riesgo con base a los siguientes criterios: grado de resección, edad al diagnóstico, y estado de metástasis (13).

Los pacientes con tumores residuales ( $>1.5 \text{ cm}^2$ ), edad menor a 3 años, y/o muestran metástasis son clasificados como pacientes de riesgo alto, mientras que los restantes se clasifican como pacientes de riesgo intermedio. Después del tratamiento trimodal que consiste de máxima resección quirúrgica, irradiación craneoespinal, y quimioterapia adyuvante, las tasas de supervivencia de los pacientes de riesgo intermedio y alto es de 85 y 70% respectivamente (13–15,18,32).

Durante un consenso en Heidelberg en 2015, un nuevo protocolo de estratificación de riesgo basado en criterios de pronóstico molecular ha sido propuesto para pacientes entre 3 y 17 años. La clasificación redefinida tiene cuatro grupos de riesgo, definidos principalmente por supervivencia, y toma en cuenta la información de subgrupos moleculares y la heterogeneidad del padecimiento. El protocolo define a los pacientes como “Muy Alto Riesgo” ( $<50\%$  supervivencia), “Alto Riesgo” (50-75% supervivencia), “Riesgo moderado” (75-90% supervivencia), y “Bajo Riesgo” ( $>90\%$  supervivencia) (14,18,33).

	<b>Sobrevida total a 5 años</b>	<b>Perfil Molecular</b>
<b>Muy alto Riesgo</b>	<50%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo 3 con Metástasis</li> <li>● Grupo SHH con mutación en TP53</li> </ul>
<b>Alto Riesgo</b>	50%-70%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo SHH con MYCN amplificado o con Metástasis</li> <li>● Grupo 4 con Metástasis</li> </ul>
<b>Riesgo Estándar</b>	76%-90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo SHH sin mutación en TP53 o sin amplificación MYCN</li> <li>● Grupo 3 sin amplificación de MYC</li> <li>● Grupo 4 sin pérdida del cromosoma 11</li> </ul>
<b>Bajo Riesgo</b>	>90%	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Grupo WNT</li> <li>● Grupo 4 con pérdida del cromosoma 11</li> </ul>

**Tabla 1.** Clasificación del pronóstico para meduloblastomas pediátricos conforme a los subgrupos moleculares. (14)

## Tratamiento

Los tratamientos actuales en nuestro país están basados en su gran mayoría en la estratificación de riesgo tradicional y en la edad del paciente al momento del diagnóstico. Los pacientes son sometidos inicialmente a la resección del tumor al momento del diagnóstico, a pesar del grupo de riesgo (18). Los tratamientos son multimodales: combinan la resección quirúrgica máxima segura, radioterapia conformal (fotones y más reciente protones), y quimioterapia sistémica a altas dosis utilizando múltiples agentes (28). Estas terapias tienen efectos adversos a corto y largo plazo, incluyendo mutismo cerebeloso postoperatorio, déficits

neurocognitivos, endocrinopatías, esterilidad, y el riesgo a una segunda neoplásia (34).

En tanto que, si se toma en cuenta la clasificación por subgrupo, el grupo WNT tiene el mejor pronóstico de todos ellos; casi todos los pacientes sobreviven después de la cirugía, radioterapia y quimioterapia. Para este subgrupo hay esfuerzos de disminuir la terapia para reducir los déficits cognitivos a largo plazo comunes en niños después de recibir radioterapia (22), los pacientes con tumores WNT que mueren sucumben más a menudo por complicaciones de la terapia o neoplasias secundarias (17).

Para el caso de SHH, hay varias terapias propuestas para estos pacientes, todas con el propósito de disminuir la actividad aberrante de la vía SHH. Uno de los fármacos más prometedores son los inhibidores SMO, los cuales están en fase clínica II para un grupo de diversos tumores incluyendo el meduloblastoma (22,34). Además, por cribado farmacológico de alto rendimiento se ha identificado que el Pemetrexed (antineoplásico antifolato) y la gemcitabina (análogos de nucleósidos) son posiblemente efectivos contra los MB grupo 3 y están actualmente a prueba. También los inhibidores BRD, que interfieren con actividad transcripcional asociada a MYC, parecen una opción prometedora. Así mismo los inhibidores HDAC inhiben potentemente el crecimiento celular de meduloblastomas impulsados por MYC in vitro y en sinergia con inhibidores de PI3K para inhibir el crecimiento tumoral in vivo. Actualmente los esfuerzos se centran en la utilización de las metilasas de histonas EZH2 y KDM6A para ser empleados como posible tratamiento en un futuro (9,35,36).

## Planteamiento de Problema

En México, los tumores del sistema nervioso central ocupan el tercer lugar de las neoplasias malignas, con una incidencia de 2.5 casos por cada 100 mil niños menores de 15 años al año, siendo el meduloblastoma el más común, con aproximadamente el 20% de frecuencia entre los tumores cerebrales (7).

Así mismo, el diagnóstico de estas neoplasias se realiza mediante el análisis histopatológico de la biopsia y resección tumoral, en algunos hospitales por inmunohistoquímica con paneles incompletos, pero en países desarrollados se complementa con análisis moleculares para clasificarlos en los diferentes subgrupos de acuerdo con la actual clasificación de la OMS del 2016.

Esta clasificación en subgrupos moleculares es de gran utilidad ya que le brinda al clínico la información para tomar una adecuada decisión para el tratamiento y de esta forma asegurar que el paciente pueda tener un mejor pronóstico y sobrevida.

Sin embargo, estas técnicas son costosas, y de difícil implementación en nuestro país, por lo que introducir el análisis de marcadores moleculares como  $\beta$ -catenina, YAP1, GAB1 y P53 por tinciones de inmunohistoquímica ayudará a poder clasificar a los pacientes, brindando un tratamiento específico y personalizado, evitando tratamientos innecesarios y perjudiciales.

## **Hipótesis**

La determinación de la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en microarreglos de tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma, ayudará en la clasificación de los subgrupos moleculares de estas muestras.

## **Objetivos**

### **General**

Determinar la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 como marcadores moleculares en microarreglos de tejidos de pacientes pediátricos diagnosticados con meduloblastoma.

### **Específicos**

1. Evaluar la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en microarreglos de tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma mediante la técnica de inmunohistoquímica.
2. Analizar y clasificar la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en los microarreglos de tejidos de meduloblastoma pediátrico.
3. Realizar la comparación de la clasificación molecular con el diagnóstico histopatológico.
4. Correlacionar la clasificación molecular y la histológica con los datos demográficos.

## Material y Métodos

**Tipo de estudio:** Retrospectivo, Comparativo.

**Población:** Pacientes pediátricos de 0 a 18 años con diagnóstico de meduloblastoma realizados por los departamentos de Patología, del Hospital Infantil de México Federico Gómez y del Hospital de Pediatría del Centro Médico Siglo XXI. En el periodo de 1990 al 2018.

**Criterios de exclusión:** Casos diagnosticados como recidiva, que no cuenten con el material suficiente o necrosis mayor al 30 %.

**Criterios de inclusión:** Todos los casos con diagnóstico de meduloblastoma con tejido suficiente y viable (con necrosis menor al 30 %).

**Tamaño de muestra:** Se incluyeron 140 muestras pediátricas de meduloblastoma y 7 cerebelos sanos como controles.

### Muestras

Se construyeron 7 microarreglos de tejidos (MAT) con 140 muestras de meduloblastoma pediátrico y 7 cerebelos sanos como controles.

## Materiales y Reactivos

- Parafina: Thermo Fisher
- Laminillas electrocargadas: Shandon Superfrost Plus (Thermo scientific, Ref 6776214)
- Recuperador antigénico: VECTOR Antigen Solution Citrated Base (VECTOR, No. H-3300)
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: JT Baker
- MetOH: JT Baker
- Suero Normal de Caballo: Incluido en el kit (VECTOR, MP-7401-5) o (VECTOR, PK-7800).
- Diluyente de anticuerpos primarios: Da Vinci Green Diluent (BioCare Medical, SKU. PD900)
  - Anticuerpos primarios específicos:
    - Anti  $\beta$ -Catenina (Abcam, ab22656)
    - YAP1 (Abcam, ab56701)
    - GAB1 (Thermo Fisher, PA5-38415)
    - P53 (DAKO, M3629)
- Anticuerpo secundario para GAB1: Kit Vector ImmPRESS HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection Kit (VECTOR, No. Cat. MP-7401-15)
- Anticuerpo secundario para  $\beta$ -Catenina, YAP1 y P53: VECTASTAIN Universal Quick HRP Kit (Peroxidase), R.T.U. (VECTOR, No. Cat. PK-7800)
- ImmPACT® DAB Peroxidase (HRP) Substrate (VECTOR, No. Cat. SK-4105)
- Hematoxilina: Thermo Fisher
- Medio de montaje: Entellan (Merck)

## **Procedimientos**

### Construcción del Microarreglo de Tejidos

Tejidos de meduloblastomas de pacientes pediátricos fijadas en formol y embebidas en parafina se arreglaron en microarreglos de tejidos, previamente se realizó una selección de los casos y se realizaron tinciones de hematoxilina/eosina (H&E) para la selección de tres áreas representativas del tumor por un patólogo experto (Figura 1.), esas áreas seleccionadas en la laminilla, fueron ubicadas en cada uno de los “bloques donadores” las cuales fueron extraídas y transferidas al bloque limpio o “bloque receptor” para así ir arreglando por triplicado cada uno de las muestras de los diferentes casos, esto se realizó en un Microarreglador de tejidos (Chemicon Advanced Tissue Arrayer “ATA 100”). Una vez que se contó con los diferentes bloques arreglados (MATs) se hicieron cortes seriados de 4 micras en laminillas electrocargadas con un micrótomo rotatorio (Leica RM 2125RT) para su posterior análisis (37).

### Inmunohistoquímica

Se realizaron tinciones de inmunohistoquímica (IHQ) en cortes seriados de los MATs de 4  $\mu\text{m}$  de espesor, brevemente se desparafinaron e hidrataron en un tren de disolventes en el que incluye xilol (100%), etanol/xilol (50%), etanol al (100, 90 y 70%) y agua. Posteriormente, se realizó la recuperación de antígenos, utilizando una solución de VECTOR Antigen Solution Citrated Base, con pH 6 durante 20 minutos, en olla de presión a 135°C. La actividad de la peroxidasa endógena se bloqueó con una disolución al 3% de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , en metanol 2 veces por 15 minutos. La unión inespecífica de los anticuerpos se redujo al incubar con Suero Normal de Caballo durante 60 minutos. Las laminillas se incubaron a temperatura ambiente con los anticuerpos específicos para  $\beta$ -Catenina (durante 60 min), YAP1 (durante 17 horas), GAB1 (durante 17 horas) y P53 (durante 60 min). Se realizaron lavados con solución buffer de fosfatos (PBS) 1X pH 7.4 durante 5 minutos. Después de los lavados, los tejidos se incubaron con un segundo anticuerpo anti-conejo con el kit ImmPRESS HRP Anti-Rabbit IgG (Peroxidase) Polymer Detection

(para el anticuerpo GAB1) y en el caso de los anticuerpos hechos en ratón se utilizó un kit Universal (anti-cabra, anti-conejo y anti-ratón) VECTASTAIN Universal Quick HRP Kit (Peroxidase), R.T.U. (para los anticuerpos  $\beta$ -Catenina, YAP1 y P53) durante 30 minutos a temperatura ambiente. En el caso de los anticuerpos  $\beta$ -Catenina, YAP1 y P53, se continuó con una incubación con estreptavidina conjugada a peroxidasa de rábano (HRP), durante 5 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se desarrolló el color visible, mediante el 3'3' tetra-hidrocloruro diaminobenzidina (ImmPACT® DAB Peroxidase (HRP) Substrate) de 2 a 5 minutos. La reacción se detuvo con agua destilada y se contratiñó con hematoxilina. Finalmente, los tejidos se deshidrataron mediante el tren de disolventes, y se colocó un cubreobjetos con medio de montaje Entellan (Merck) (37,38).

### Patología Digital

Las diferentes tinciones se digitalizaron y analizaron utilizando un digitalizador automático de laminillas (Aperio®) que adicionalmente cuenta con un software de análisis de microarreglos de tejido. Los datos servirán para clasificar a los tejidos de los pacientes en subgrupos moleculares de acuerdo con los marcadores moleculares por IHQ (37).

### Análisis estadístico

Se utilizó el Software SPSS versión 21 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Se realizaron estadísticos descriptivos, distribuciones de frecuencia y tablas de contingencia se calcularon para cada uno de los parámetros. Se realizó la prueba de ajuste de bondad de chi-cuadrado para realizar comparaciones de proporciones, de igual manera se realizó la prueba de chi-cuadrada de independencia para ver si la clasificación por subgrupos moleculares y la clasificación por histología están relacionadas.

## Resultados

### Sección 1.

***Evaluar la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en microarreglos de tejidos (MATs) de pacientes pediátricos con meduloblastoma mediante la técnica de inmunohistoquímica.***

#### **Inmunorreactividad diferencial de las proteínas $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en microarreglos de tejidos de pacientes pediátricos con meduloblastoma.**

Con el propósito de evaluar la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAP1 y P53 en muestras de pacientes pediátricos con MB se incluyeron 140 biopsias (118 provenientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez) y (22 provenientes del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI). De los cuales se realizó la búsqueda de los bloques y del expediente clínico, y así proceder a la construcción de 7 microarreglos de tejidos. Brevemente, de cada uno de los bloques de los pacientes se realizaron cortes de 4 $\mu$ m de espesor en un microtomo semiautomatizado y estos se colocaron en laminillas silanizadas para realizar la tinción de Hematoxilina y Eosina (H&E). Posteriormente, un Patólogo experto selecciono en las laminillas tres áreas representativas del tumor (Figura 1A), consecutivamente se generó una lista de los bloques que se incluirían en el microarreglo y se diseñó un mapa virtual (Figura 1B) y así se procedió a la creación de los nuevos bloques en el equipo micrarreglador de tejidos (Figura 1C). Una vez que se contaron con todos los MATs (Figura 1D) se realizaron cortes seriados de 4 micras de espesor de los 8 bloques, *7 con las muestras y uno más (miniMAT) para la estandarización de las tinciones y definición de tiempo de revelado, con 6 muestras que se incluyeron en algún otro MAT*. Posteriormente se efectuaron las diferentes tinciones de hematoxilina/eosina (H&E) y de inmunohistoquímica (IHQ), en la (Figura 1E) podemos observar las micrografías de las laminillas con los cortes seriados del mismo microarreglo (MAT3), en las que se muestran las distintas tinciones a) H&E, b)  $\beta$ -catenina, c) GAB-1, d) YAP1 y e) P53.



**Figura 1A. Material biológico utilizado para la construcción de los microarreglos de tejidos.** En la imagen se muestran algunos bloques con muestras de meduloblastoma pediátricos parafinados, en la parte superior de cada bloque se observa su respectiva laminilla con tinción de H&E, las cuales fueron punteadas de color negro (resaltadas con flechas rojas) las 3 áreas representativas, en cada muestra.

a)



## HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

HOJA DE CONTROL PARA MICROARREGLOS DE TEJIDOS

Micro arreglo: Meduloblastoma pediátrico  
Numero de microarreglo: 3  
Hospital Infantil de México Federico Gómez.  
Responsable del proyecto: Dra. Guillermina Baay, Dra Pilar Eguía  
Hospital de Infantil de México Federico Gómez.

### Lista de bloques en el mapa de Meduloblastoma 3

1	Q99-569-3	12	Q04-714-2
2	Q01-1523-4	13	Q04-45-1
3	Q01-790-4	14	Q05-2035-5
4	Q02-1578-1	15	Q05-1921-1
5	Q02-1365-3	16	Q05-705-5
6	Q03-108-1	17	Q06-1061-1
7	Q03-68-1	18	Q09-1362-2
8	Q03-1918-2	19	Q10-1643-1
9	Q03-472-3	20	Q11-271-1
10	Q03-2140-2	21	Q11-111-3
11	Q04-1720-1		



01/06/2019.

Dirección: Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06720, México, D.F.  
Computador 52 28 99 17  
www.himfg.edu.mx



1

Construido por: T.H. Daniel H. Cueto.

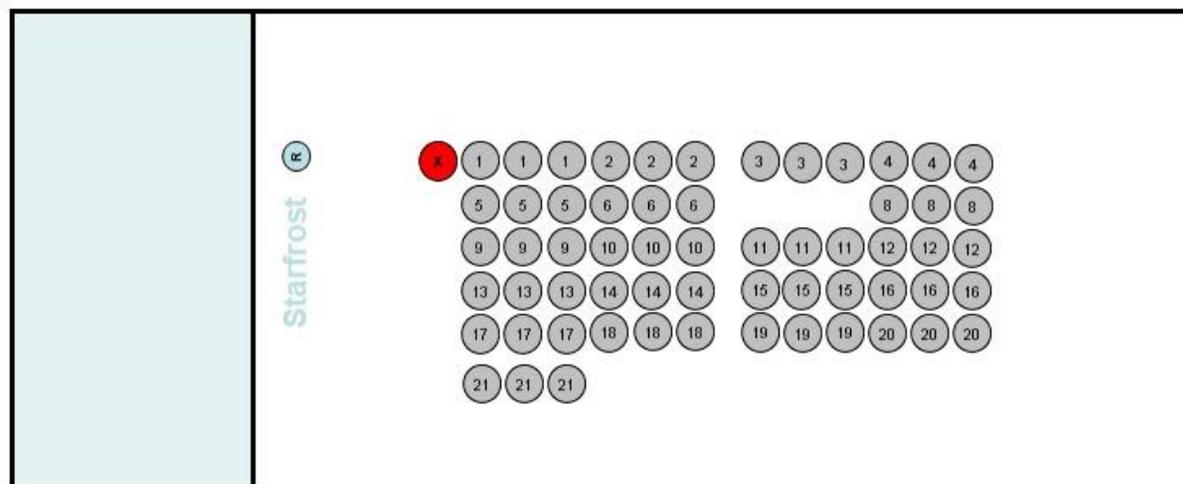
b)



# HOSPITAL INFANTIL de MÉXICO FEDERICO GÓMEZ

Instituto Nacional de Salud

## Mapa de Meduloblastoma No.3



Código {  Inicio  
 Meduloblastoma



Dirección: Dr. Márquez 162, Col. Doctores, Delegación Cuauhtémoc, 06720, México, D.F.  
Conmutador: 52 28 99 17  
www.himfg.edu.mx

Construido por: Daniel H. Cueto.

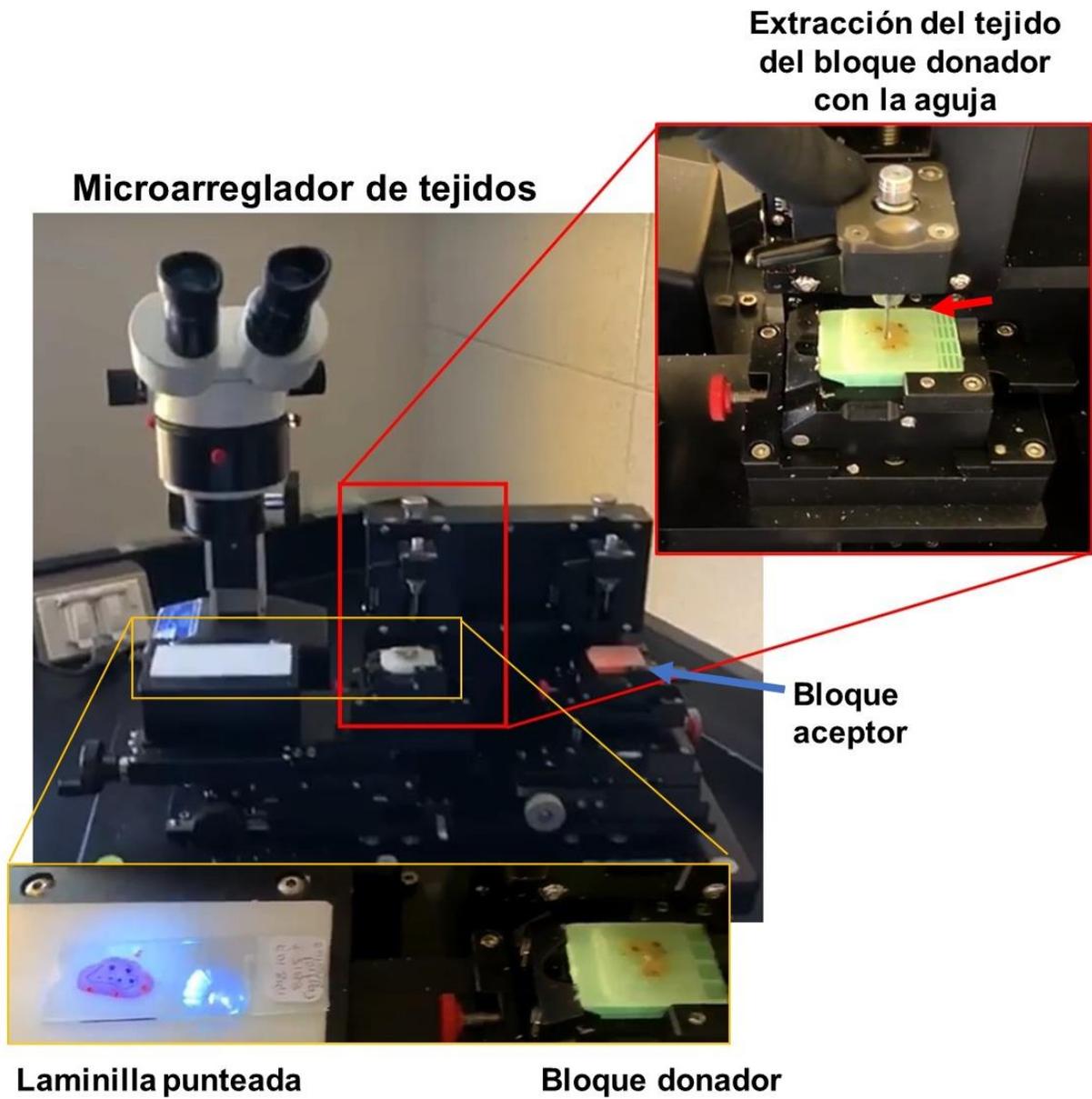
01/06/2019.



**Figura 1B. Listado de los bloques a incluir y diseño del mapa virtual.**

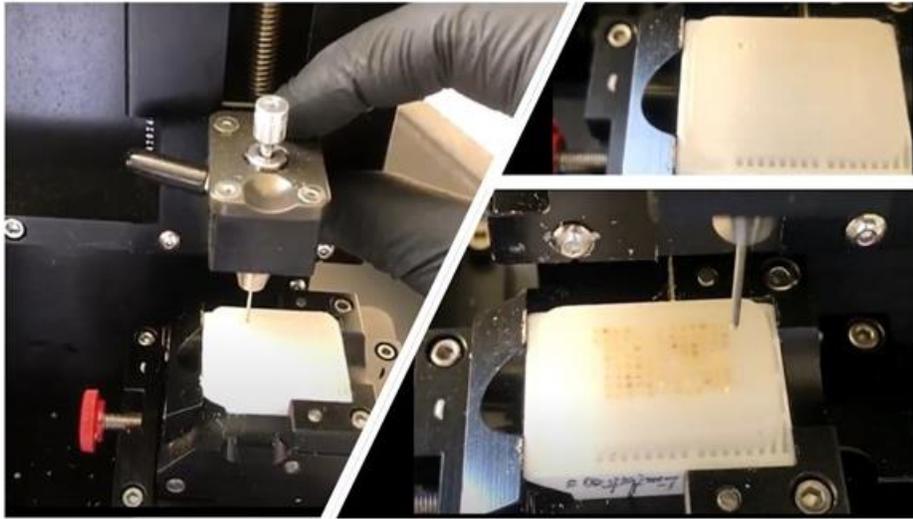
Una vez que se define cuáles son los bloques que serán incluidos, se realiza un listado y se diseñan los mapas virtuales, los cuales servirán de patrón para ir arreglando los tejidos en del bloque del microarreglo. En la figura se muestra un ejemplo a) de un listado de los pacientes que se incluirán en un microarreglo, b) el mapa virtual en el que se diseña como se van a ir arreglando cada una de las muestras, en este se puede apreciar cómo se incluyen tres spots por paciente de forma horizontal, por lo que se repite tres veces cada número, el ejemplo corresponde al mapa No. 3 de meduloblastoma pediátrico.

a)



b)

**Bloque aceptor**



**Inserción del tejido donador al bloque aceptor**

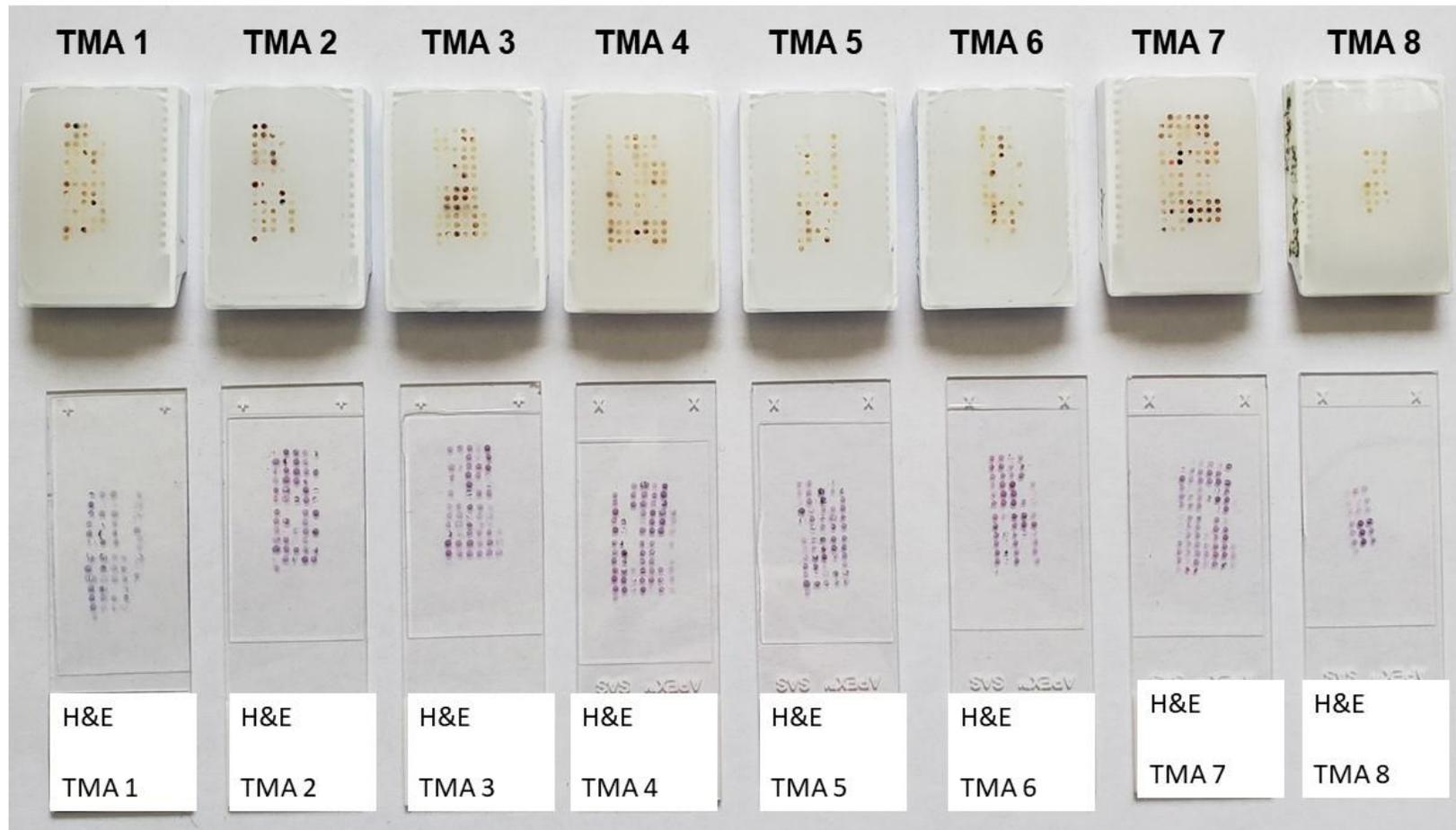
**Bloque MAT finalizado**

c)

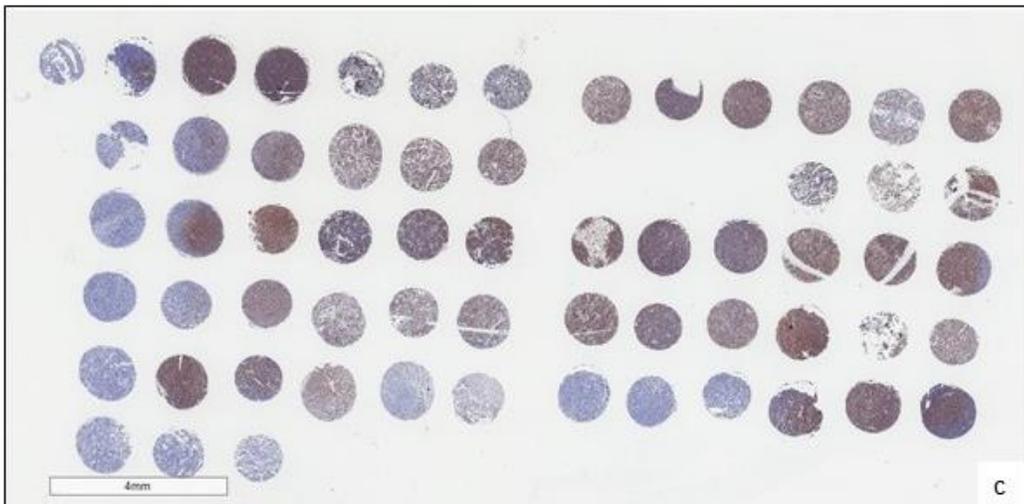
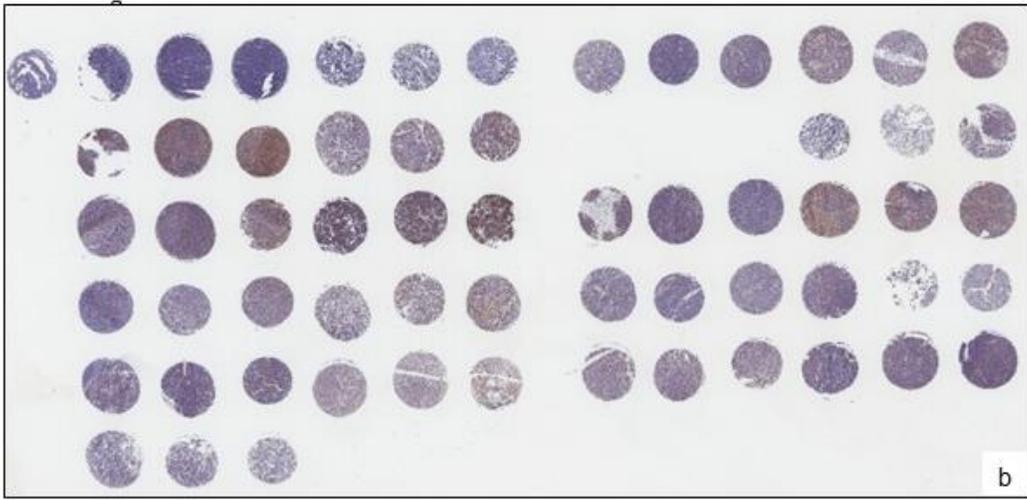
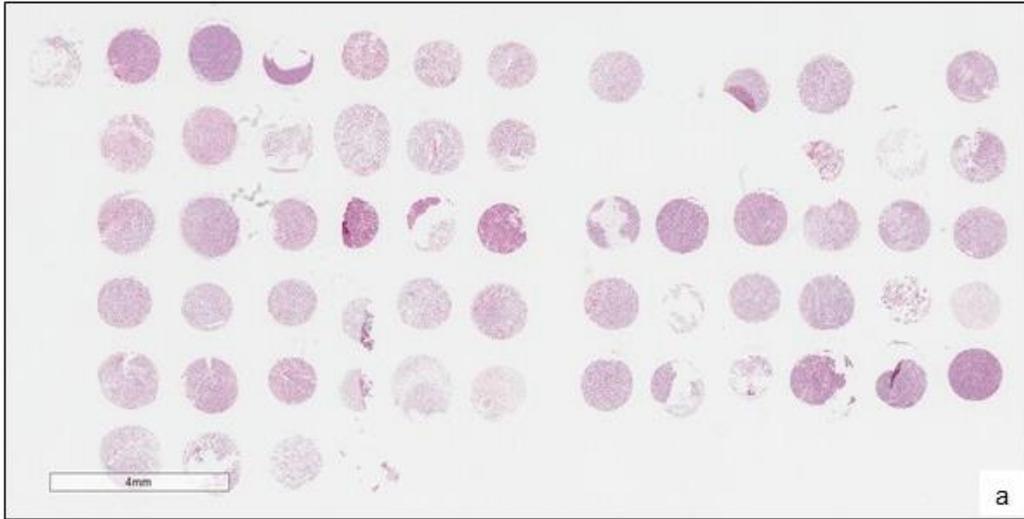


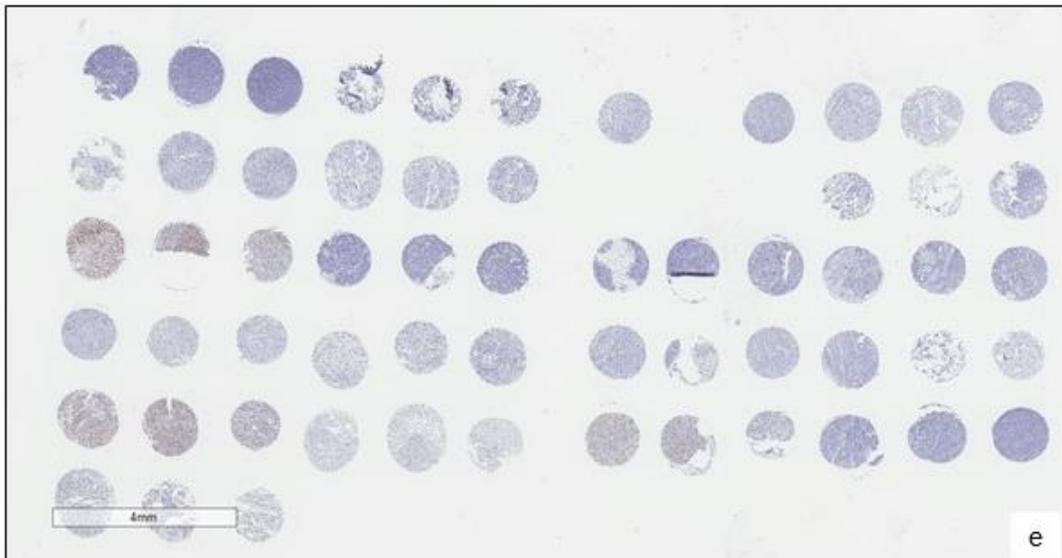
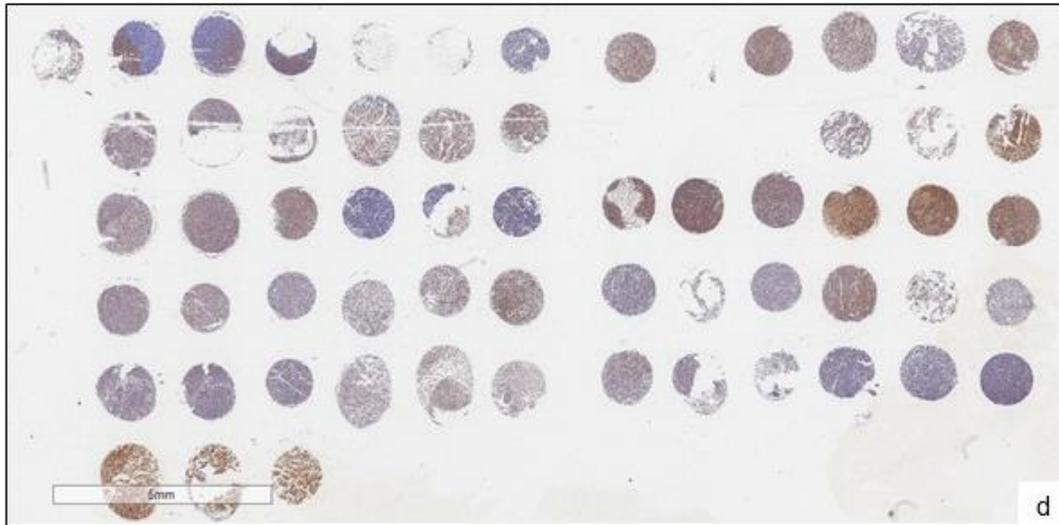
**Figura 1C. Creación del microarreglo de tejidos.** a) En la imagen central se muestra el equipo Microarreglador de tejidos, en el que se puede observar en la parte inferior, una amplificación del bloque donador (verde) y del área en donde se coloca su correspondiente laminilla ya punteada, la cual se observa con la ayuda del estereoscopio, ubicando así el área de interés en el bloque donador, el cual también se observa en el estereoscopio, del que se extrajeron los cilindros de interés mediante una aguja de 0.6 mm de diámetro, como se muestra en el recuadro superior derecho flecha roja. De igual manera se extraen los cilindros del bloque en blanco o aceptor (naranja) y se van arreglando los tejidos acordes al mapa virtual. b) Se muestra en la imagen izquierda como la aguja inserta el tejido y en la imagen superior derecha podemos ver el primer spot de inicio, en tanto la imagen inferior derecha muestra un microarreglo finalizado. c) Podemos observar los bloques donadores ya horadados y el nuevo bloque arreglado con los mismos.

## Bloques y laminillas con la tinción de Hematoxilina & Eosina de los diferentes microarreglos de tejidos de Meduloblastoma



**Figura 1D. Construcción de los microarreglos de tejidos de muestras de meduloblastoma.** Se muestran los 7 TMAs con su laminilla con tinción de H&E, en los que se incluyeron las 140 muestras de pacientes con meduloblastoma y un 8vo en el que se incluyeron 6 muestras repetidas para realizar las estandarizaciones de las tinciones.





**Figura 1E. Inmunorreactividad de las proteínas de interés en muestras de meduloblastoma pediátrico.** Micrografías representativas de las diferentes tinciones en el microarreglo 3 de las tinciones de a) H&E, y las determinaciones por tinciones de IHQ de b)  $\beta$ -catenina, c) GAB-1, d) YAP1 y e) P53, en los que se puede apreciar la diferencia en la expresión de las tinciones y entre los diferentes pacientes (triplicado de forma horizontal).

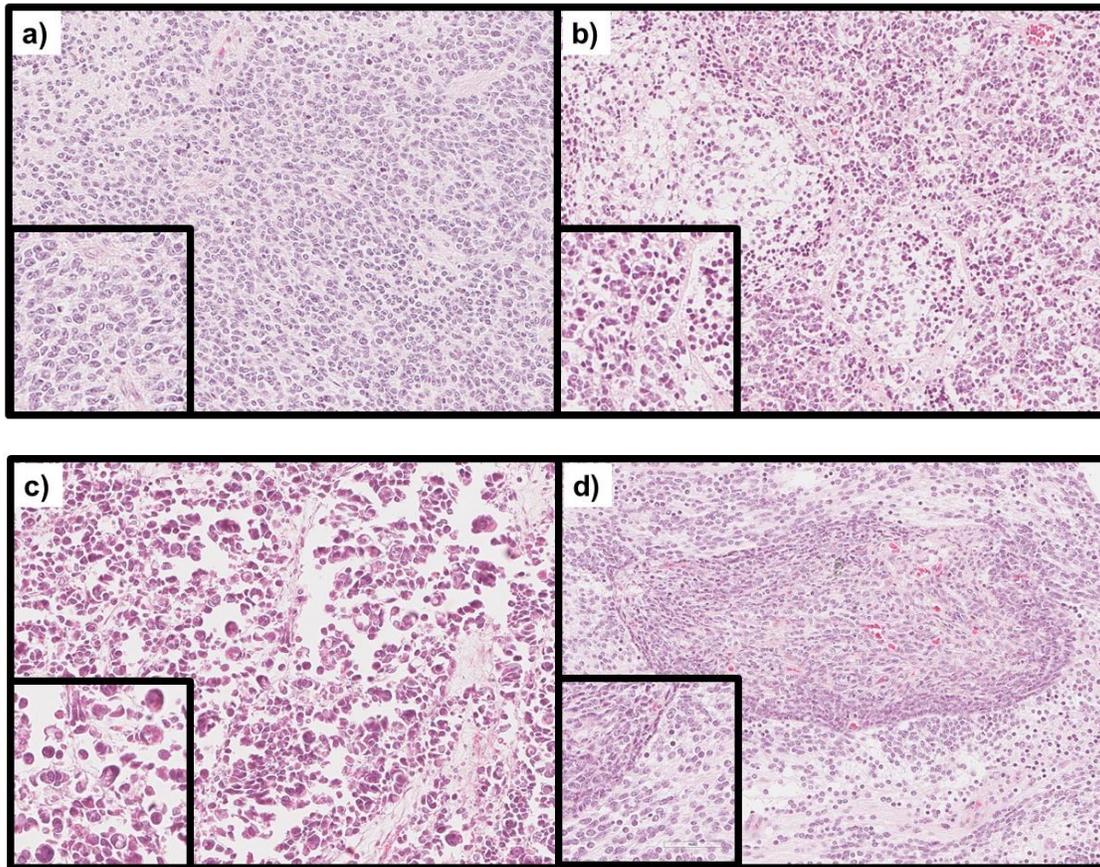
## Sección 2

### ***Analizar y clasificar la expresión de las proteínas $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en los TMAs de meduloblastoma pediátrico.***

Con el propósito de realizar la clasificación histopatológica y analizar la expresión de las diferentes proteínas determinadas por tinciones de inmunohistoquímica, se realizó la digitalización de las laminillas en un Escaneador de laminillas APERIO®.

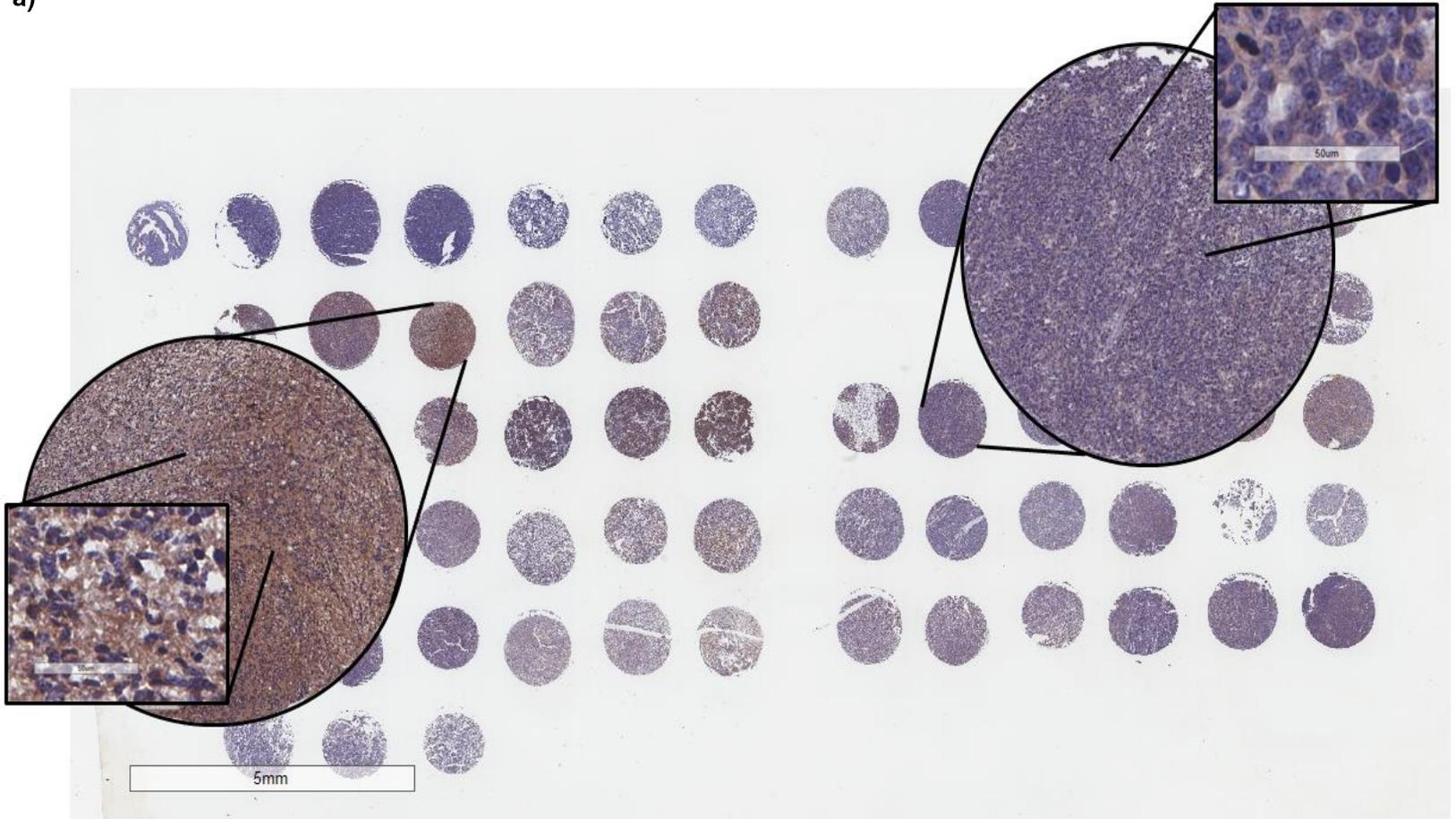
Y se realizó el análisis cualitativo con la ayuda de dos patólogas expertas. En primera instancia, se realizó el diagnóstico histopatológico mediante el análisis de los tejidos teñidos con H&E (Figura 2A), clasificando así en (Clásico, Desmoplásico/Nodular, Anaplásico/Células Grandes y Nodularidad extensa).

Posteriormente se analizaron las diferentes tinciones por inmunohistoquímica de las proteínas  $\beta$ -catenina, GAB-1, YAP1 y P53, (Figura 2B) y con ello se agruparon las diferentes muestras por subgrupo molecular (WNT, SHH y No-WNT/SHH) (Figura 2C), adicionalmente se muestra (Tabla 1) las determinaciones necesarias para poder realizar la subclasificación molecular.

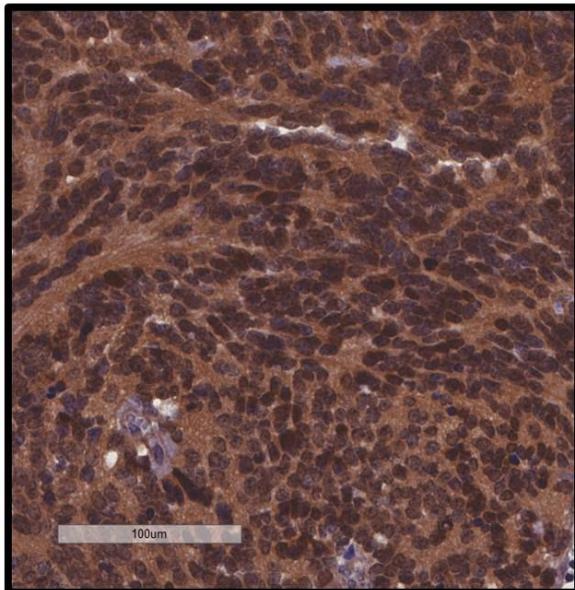


**Figura 2A. Clasificación histopatológica de los meduloblastomas.** De acuerdo a la histología se realizó la clasificación de las diferentes muestras de meduloblastoma pediátrico en a) se muestra un ejemplo de un MB clásico en el que se pueden apreciar las células pequeñas de citoplasma escaso, con núcleos redondos u ovales hiper cromáticos, en b) observamos un MB desmoplásico/nodular caracterizado por esas islas pálidas, rodeadas por tejido conectivo, en c) observamos un ejemplo de MB de células grandes/anaplásico, en el que se puede apreciar la variabilidad en la forma y tamaño de las células o pleomorfismo citológico, asociado a una elevada mitosis y apoptosis y en d) un MB de nodularidad extensa. Aumento 10X recuadro 40X.

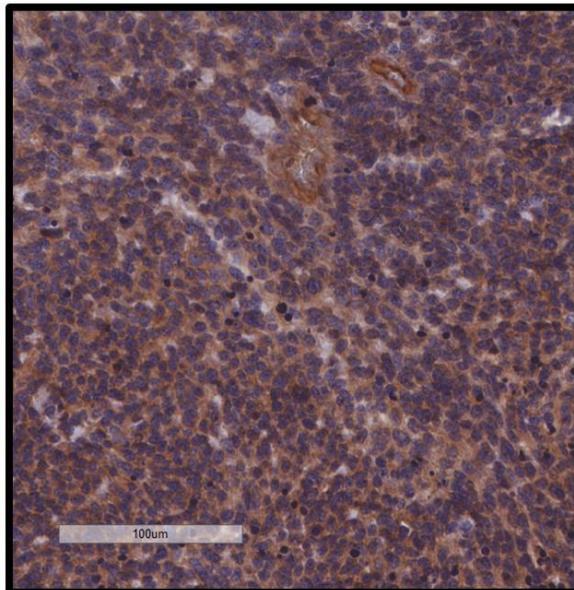
a)



b)

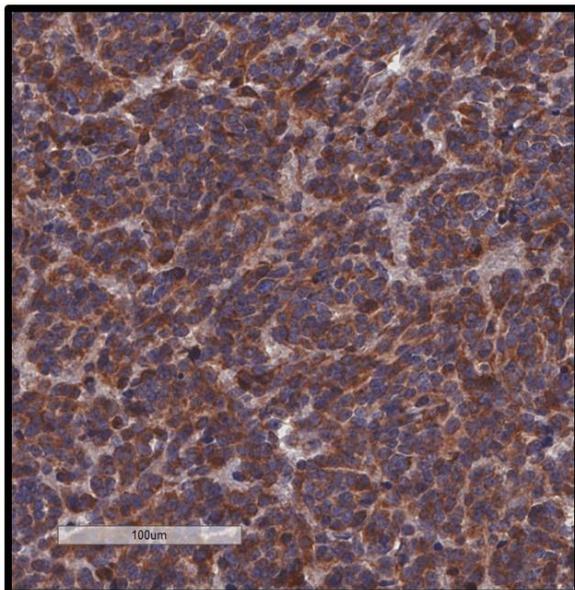


Beta Catenina Nuclear

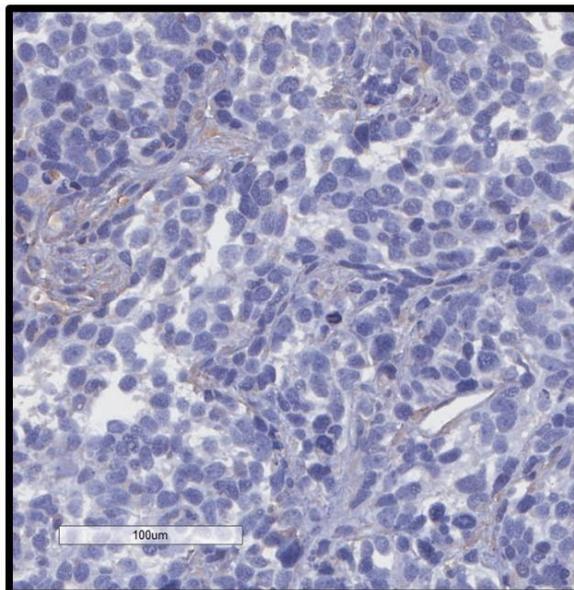


Beta Catenina Citoplasmática

c)

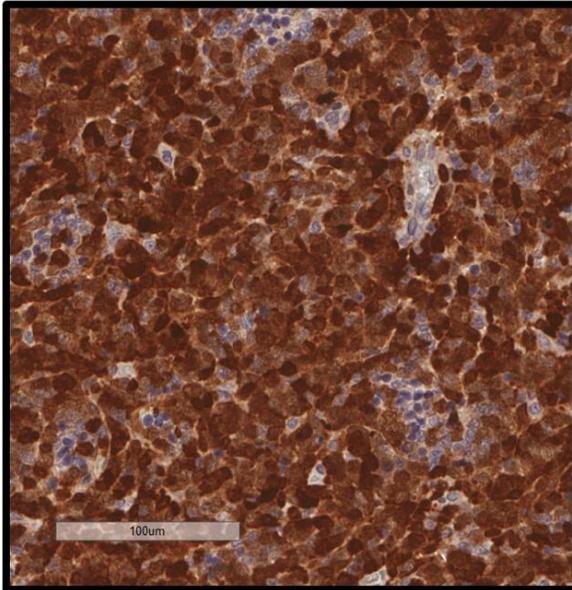


GAB-1 Positivo

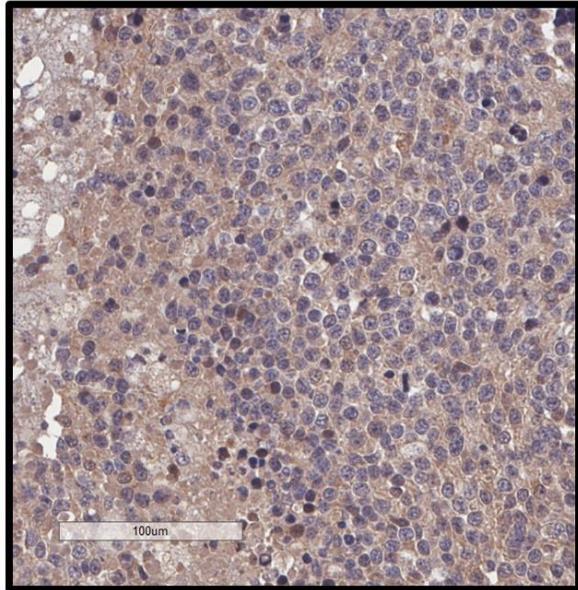


GAB-1 Negativo

d)

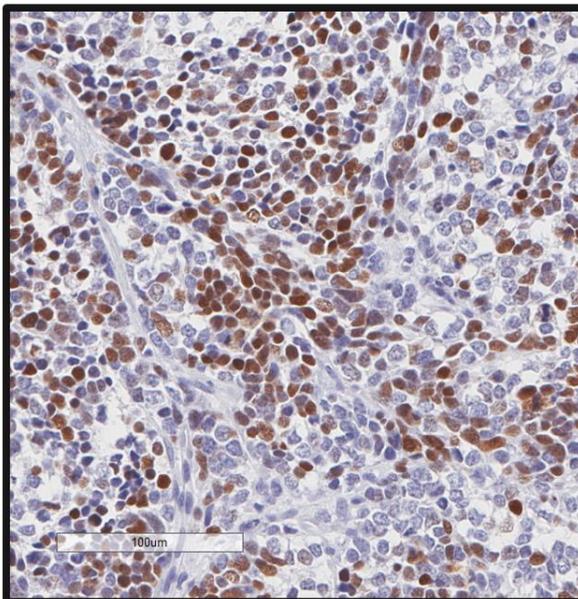


YAP-1 Positivo

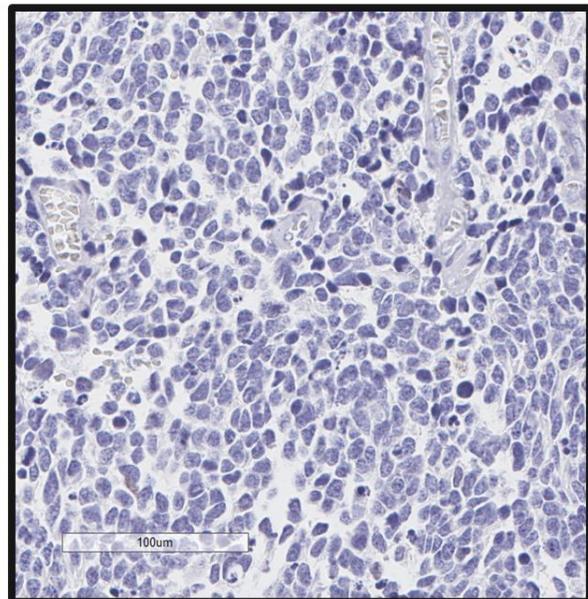


YAP-1 Negativo

e)



P53 Positivo/SHH-TP53 Mutado

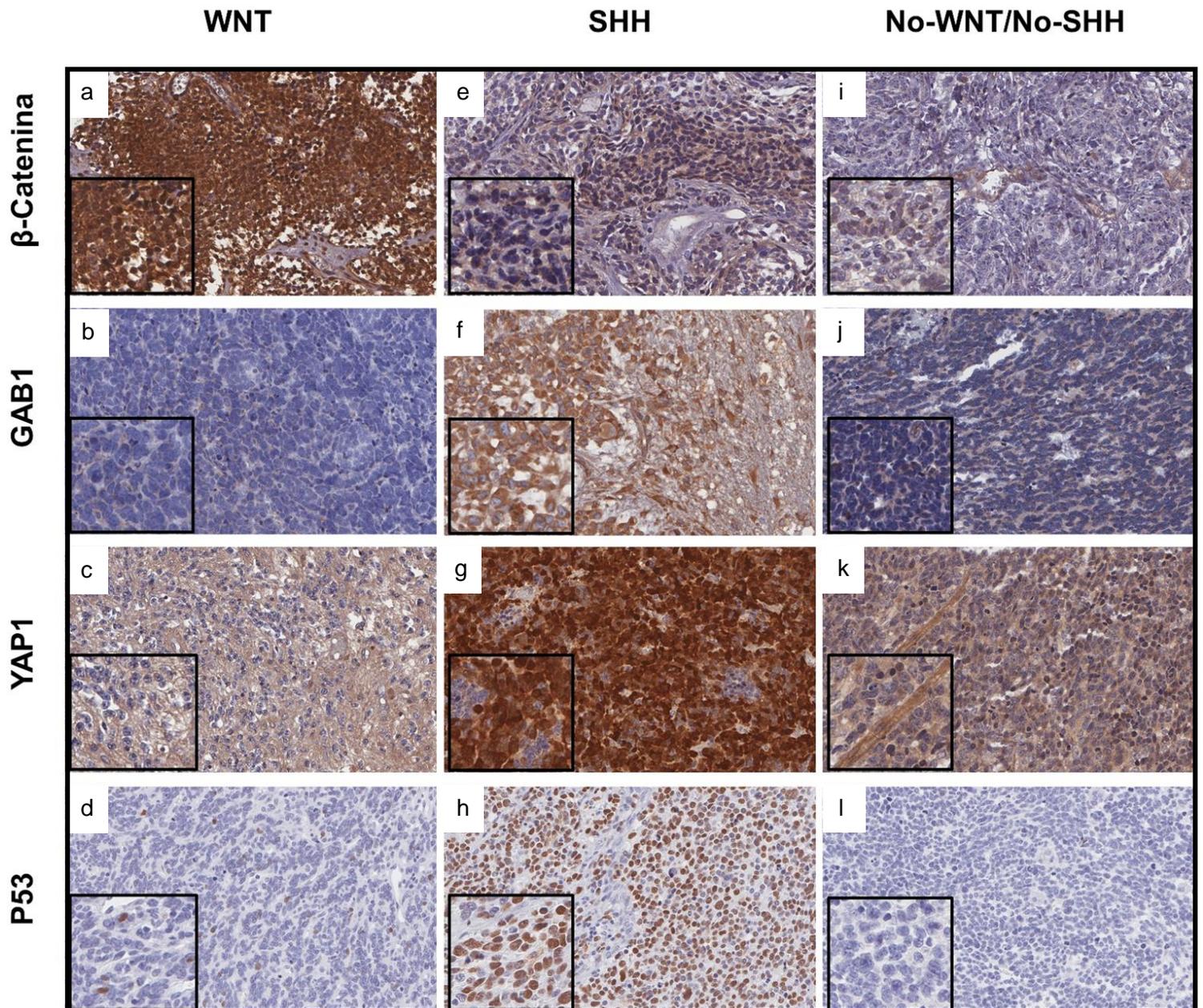


P53 Negativo/SHH-TP53 Salvaje

**Figura 2B. Determinación de la expresión de las proteínas en los tejidos de meduloblastoma pediátrico.**

a) Una vez escaneadas las laminillas de todos los microarreglos y las distintas tinciones, se realizó el análisis de la expresión de cada uno de los spots o cilindros, agrupando a estos por triplicado, lo que corresponde a un paciente. Ya que se cuenta con el escaneo de la laminilla de MAT, esta se puede visualizar desde una panorámica hasta un aumento de 40X, lo que facilita la visualización y análisis, en a) se muestra un ejemplo de cómo se pueden observar los acercamientos en el tejido a 40X, en la imagen central se muestra una panorámica del microarreglo, la escala milimétrica en la esquina inferior izquierda nos muestra el equivalente a 5mm, la amplificación del spot, está a un aumento de 7X, mostrando en la escala 300µm, finalmente en el mayor acercamiento se observan 50µm en la barra, a un aumento de 40X.

Observamos a mayor detalle la diferencia entre cada una de las tinciones lo que nos permitió realizar la subclasificación molecular por determinación de las proteínas en los tejidos de cada uno de los pacientes. b) muestra la diferencia entre la expresión de  $\beta$ -catenina nuclear o citoplasmática, c) como se observa una tinción positiva o negativa para GAB-1, en d) como se aprecia la expresión de YAP-1 positiva y negativa y por último e) la expresión de un P53 mutado con una positividad nuclear contra el silvestre que es negativo (40X), escala milimétrica 100µm.



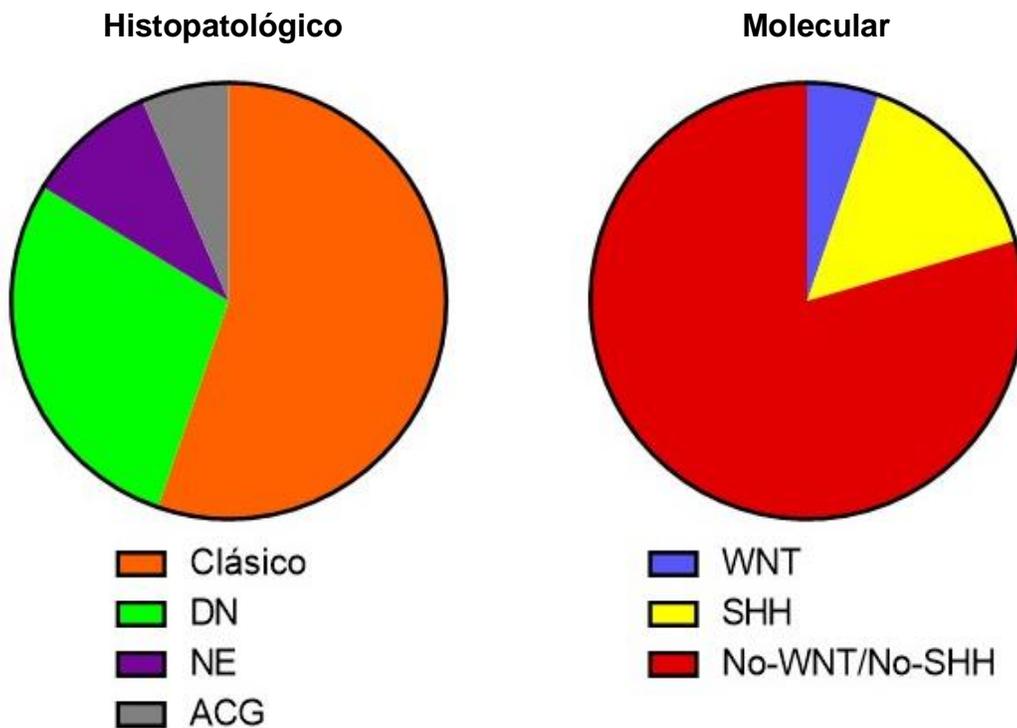
**Figura 2C. Agrupación por subgrupo molecular acorde a la inmunorreactividad de las diferentes proteínas.** Micrografías representativas de la determinación de las proteínas  $\beta$ -catenina (a, e, i), GAB-1 (b, f, j), YAP-1 (c, g, k) y P53 (d, h, l) por tinciones de IHQ, se muestra un ejemplo de la clasificación realizada por el patrón de tinciones acorde al Subgrupo Molecular (20X y 40X).

### Sección 3

#### ***Comparación de la clasificación molecular con el diagnóstico histopatológico.***

Con el propósito de poder comparar las clasificaciones histopatológicas y la subclasificación molecular, una vez que se analizaron las tinciones de H&E de los diferentes pacientes, y se clasificaron histopatológicamente, se tomó en cuenta que de las 140 muestras incluidas en los MATs se excluyeron 28 muestras, a razón de la pérdida del tejido en alguna de las tinciones por el procesamiento durante las tinciones, falta de consenso al momento del diagnóstico histológico o bien la falta de alguno de los datos demográficos, quedándonos con 112 pacientes con datos. De estos se determinó que la mayoría de los tumores son de tipo Clásico (63 pacientes, 56.25%), seguidos por los Desmoplásicos/Nodulares (31 pacientes, 27.67%), un pequeño porcentaje presenta Nodularidad Extensa (11 pacientes, 9.82%), y el menos frecuente es el Anaplásico/Células Grandes (7 pacientes, 6.25%).

Posteriormente se realizó la determinación submolecular mediante el análisis cualitativo de los diferentes marcadores moleculares por el conjunto de marcadores determinados por IHQ, de estos se observó que el 5.35% (6 pacientes) pertenecen al grupo WNT, el 15.17% (17 pacientes) son del grupo SHH, así como el 79.46% (89 pacientes) pertenecen al grupo no-WNT/no-SHH, conformando el subgrupo más grande (Figura 3A).



**Figura 3A. Comparación de las clasificaciones de los pacientes con meduloblastoma.** En el panel izquierdo se puede observar la clasificación de los pacientes acorde con el diagnóstico histopatológico, con un 56.25% en los Clásicos, el 27.67% en Desmoplásicos/Nodulares, el 9.82% en Nodularidad Extensa y solo el 6.25% como Anaplásico/Células Grandes, se obtuvo una  $p < 0.05$ . Mientras que en el panel derecho observamos la clasificación realizada por la determinación de la combinación de marcadores por IHQ, agrupando a los pacientes de la siguiente forma, para el grupo WNT tenemos un 5.35%, el 15.17% corresponde al grupo SHH, y el 79.46% para el grupo no-WNT/no-SHH, se obtuvo una  $p < 0.05$ .

## Sección 4

### ***Correlacionar la clasificación molecular y la histológica con los datos demográficos.***

Con el propósito de poder evaluar la existencia de correlaciones con los datos demográficos, se analizaron los 112 pacientes con datos completos. De estos se determinó que el 62.5% (70 pacientes) son varones, mientras que el 37.5% (42 pacientes) son mujeres, siendo una proporción de 1.7:1 (Figura 4A).

Posteriormente se realizaron las correlaciones del sexo de los pacientes respecto a la clasificación histopatológica, teniendo como resultado que el Clásico presenta 65.07% (41 pacientes) de varones, a su vez que el 34.9% (22 pacientes) son mujeres, con una proporción 1.9:1. Por otra parte, los Desmoplásico/Nodular tienen el 61.29% (19 pacientes) con sexo masculino, y el 38.7% (12 pacientes) con sexo femenino, la proporción presentada es de 1.6:1. Para los Nodulares Extensos hay un porcentaje de 45.45% (5 pacientes) varones y el 54.54% (6 pacientes) de sexo femenino con una proporción 1:1.2 Para el grupo menos frecuente, que es el Anaplásico/Células Grandes, 71.42% (5 varones) y 28.57% (2 mujeres), la proporción es de 2.5:1 (Figura 4B).

También se analizó la proporción del sexo de los pacientes con la subclasificación molecular, obteniendo que para el subgrupo WNT-Activado el 66.67% (4 pacientes) son del sexo femenino, mientras que el 33.33% (2 pacientes) son del sexo masculino esto equivale a una proporción hombre:mujer de 1:2. Para el grupo SHH-Activado el 64.7% (11 pacientes) corresponde a varones, así como el 35.29% (6 pacientes) corresponde a mujeres, se presenta una proporción 1.8:1. Por último, para el grupo no-WNT/no-SHH el 64.04% (57 pacientes) corresponde a pacientes del sexo masculino, y el 35.95% (32 pacientes) al sexo femenino, con una proporción 1.8:1, (Figura 4C).

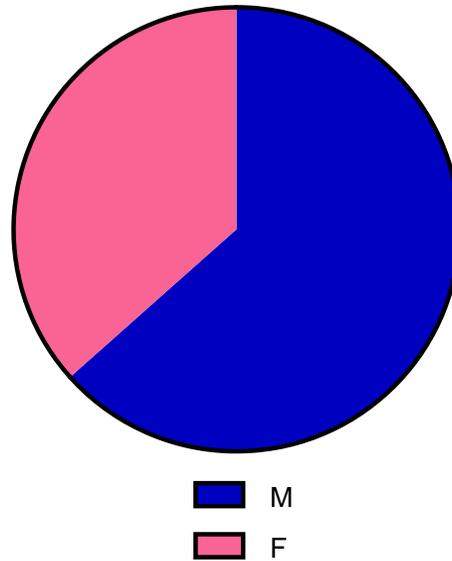
Adicionalmente se agruparon las edades de los pacientes en 5 grupos (0-2, 3-5, 6-10, 11-15 y 16-18 años). El conjunto que presentó más pacientes con meduloblastoma por clasificación histológica fue de 6-10 al contar con 37 pacientes (33.03%), seguido por el grupo de edad de 3-5 con 33 pacientes (29.46%), mientras que el conjunto de 0-2 sumo 20 pacientes (17.85%), de 11-15 se presentaron 21 pacientes (18.75%) y el menos frecuente de 16-18 solo comprende 1 paciente (0.89%), además se determinó para cada grupo de edad cual es el más frecuente de acuerdo con la clasificación histológica.

Para los diagnósticos histológicos en particular en el clásico, observamos que se presenta en todos los grupos de edad. Con la mayor cantidad de pacientes en el grupo 6-10 años con 22 pacientes (34.92%) y uno solo paciente en el grupo 16-18 años (1.58%). La histología Desmoplásico/Nodular está presente en todos los conjuntos de edad excepto 16-18 años, se manifiesta en mayor proporción en el conjunto de 3-5 años al contar con 10 pacientes (32.25%) y muestra una menor cantidad de 11-15 años con solo 4 pacientes (12.90%). La histología de Anaplásico/Células Grandes no presentó pacientes en los grupos de 0-2 y 16-18 años, presente de igual manera en los grupos de 6-10 y 11-15 con 3 pacientes (42.85%) y en el grupo de 3-5 con un solo paciente (14.28%). Finalmente, en la histología de Nodularidad Extensa hay mayor frecuencia en el conjunto de 3-5 años con 5 pacientes (45.45%), observamos 3 pacientes tanto para el grupo de 0-2 como de 6-10 (27.27%) y ninguno para los grupos de 11-15 y 16-18 (Figura 4D).

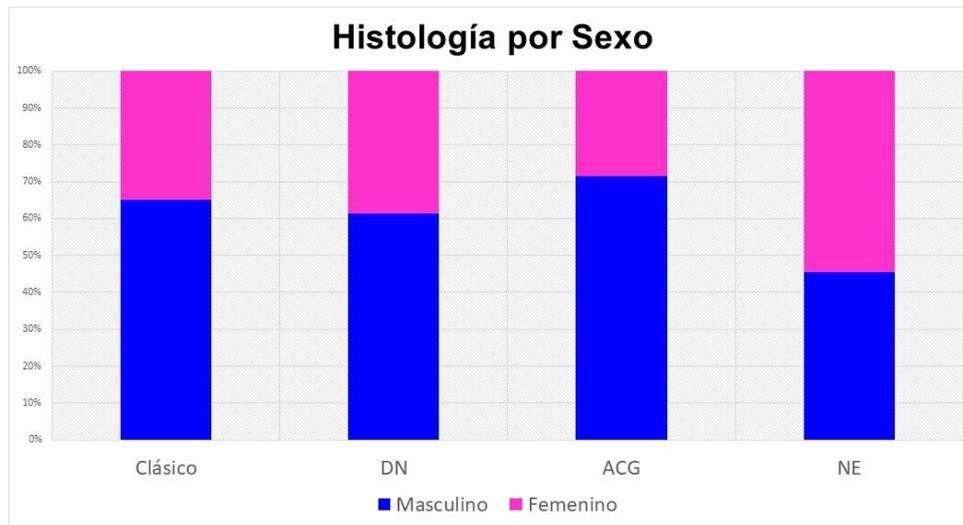
Se realizó el mismo análisis por grupos de edad, pero para el caso de la subclasificación molecular, en los cuales observamos que para WNT el grupo de 6-10 años presentó 5 pacientes (83.3%), y un solo paciente en el grupo 0-2 (16.7%), y ninguno en los demás grupos. En SHH se contó con tres pacientes para los grupos de 0-2, 3-5 y 11-15 con (16.66%), ninguno para el grupo de 16-18, mientras que de 6-10 se presentó el mayor número de casos con 8 pacientes (44.44%). Finalmente, para el subgrupo No-WNT/No-SHH el cual cuenta con el mayor número de casos, observamos que el grupo de edad más frecuente es de 3-5 con 30 pacientes (28.03%), seguido por el grupo de 6-10 con 24 pacientes (22.42%), después con 18

pacientes el grupo de 11-15 (16.82%), con 16 casos el de 0-2 (14.95%) y con solo 1 caso el grupo de 16-18 (0.93%) (Figura 4E).

Finalmente se comparó el número de casos por clasificación histológica con los subgrupos moleculares, observando que el subgrupo molecular no-WNT/no-SHH está compuesto por todos los grupos histológicos, predominando el clásico con 52 pacientes (58.42%), seguido por el Desmoplásico/Nodular con 26 pacientes (28.08%) y con 6 casos los de Anaplásico/Células Grandes y Nodularidad Extensa (6.74%), el subgrupo SHH también estuvo presente en todos los subgrupos moleculares, con tan solo 1 caso en el Anaplásico/Células Grandes (5.88%), seguido del de Nodularidad Extensa con 4 pacientes (23.52%), 5 pacientes en el Desmoplásico/Nodular (29.41%) y con 7 casos el clásico (41.17%), en el caso del subgrupo WNT no contamos con ningún caso para los meduloblastomas Anaplásicos/Células Grandes, mientras que tanto para los de Nodularidad Extensa como los Desmoplásicos/Nodulares solo presentaron 1 caso (16.66%) siendo el clásico nuevamente el más prevalente con 4 casos (66.66%) (Figura 4F).

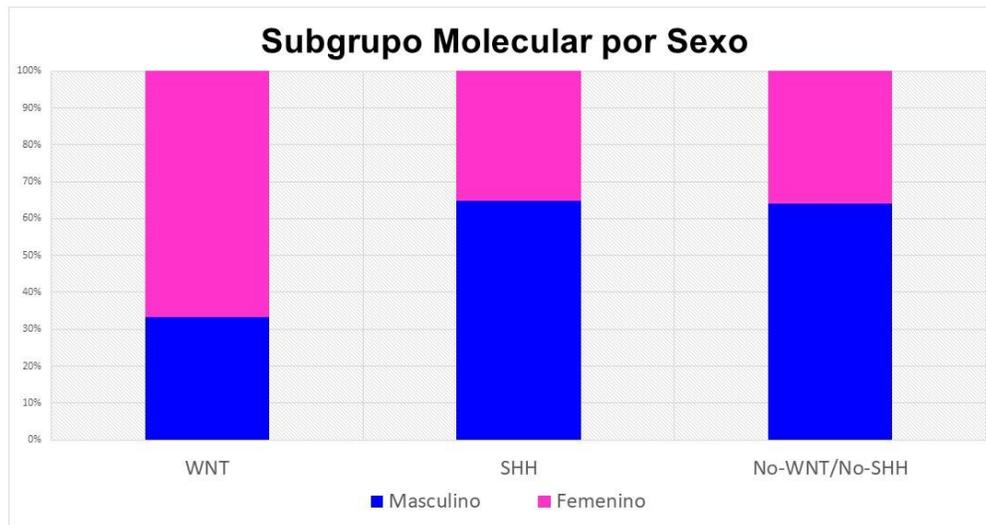


**Figura 4A. Distribución del meduloblastoma por sexo.** De los 112 pacientes se determinó la prevalencia por sexo. Se determinó que el 62.5% (70 pacientes) son varones, mientras que el 37.5% (42 pacientes) son mujeres, con una proporción de 1.7:1, obteniendo una  $p > 0.05$  por lo tanto, la población tiene una proporción similar a 1.8:1 reportada por la OMS.



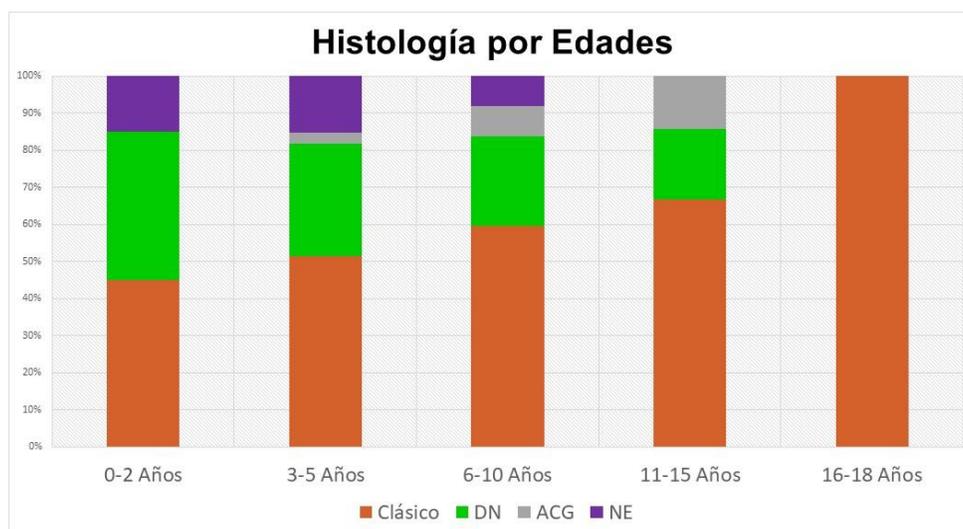
		Diagnóstico Histológico				Total
		Clásico	DN	ACG	NE	
Sexo	Masculino	41	19	5	5	70
	Femenino	22	12	2	6	42
Total		63	31	7	11	112

**Figura 4B. Diagnóstico Histopatológico contra Sexo.** Podemos observar en la parte superior la representación gráfica en porcentaje del sexo de los pacientes, acorde al diagnóstico histológico, mientras que en la tabla se presentan el número de pacientes que componen cada uno, no se realizó una correlación con lo establecido con la literatura al no existir reportes respecto a cómo se presentan estos.



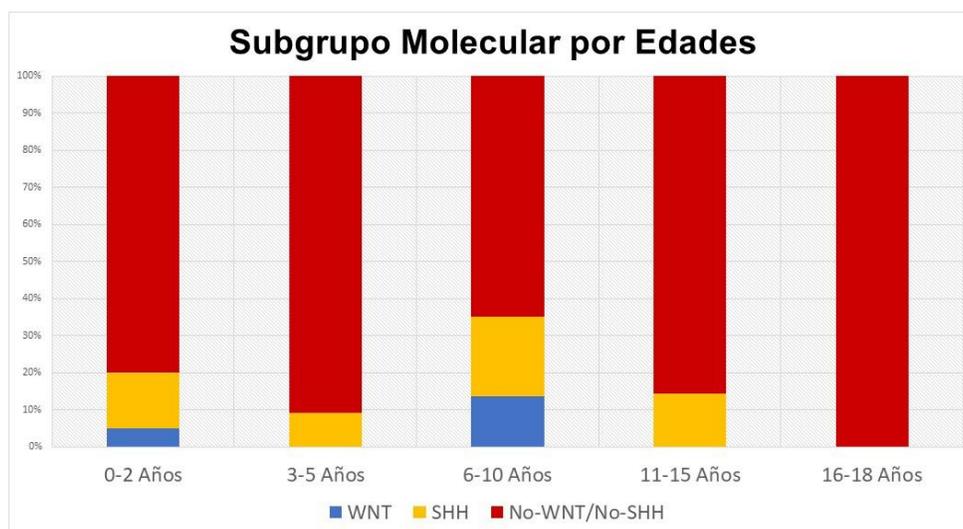
		Subgrupo Molecular			Total
		WNT	SHH	No-WNT/No-SHH	
Sexo	Masculino	2	11	57	70
	Femenino	4	6	32	42
Total		6	17	89	112

**Figura 4C. Subgrupo Molecular contra Sexo.** Se muestra en la parte superior la representación gráfica en porcentaje del sexo de los pacientes, de acuerdo con la subclasificación molecular, en la tabla observamos el número de pacientes que componen cada % de estos, la proporción de frecuencia respecto a sexo de WNT tiene una  $p > 0.05$ , al igual que SHH presenta una  $p > 0.05$ , y por último No-WNT/No-SHH presenta una  $p > 0.05$ .



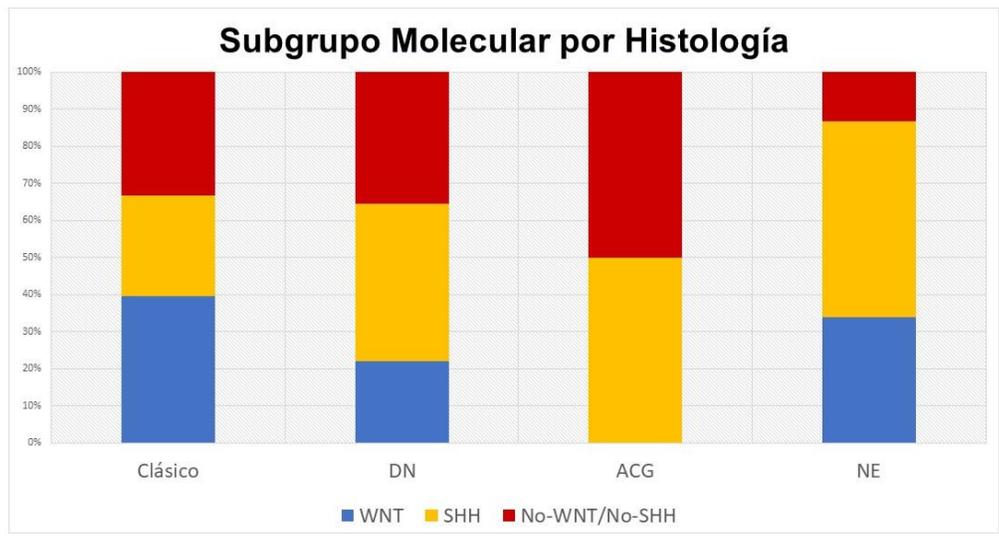
		Diagnóstico Histológico				Total
		Clásico	DN	ACG	NE	
Edades	0-2 Años	9	8	0	3	20
	3-5 Años	17	10	1	5	33
	6-10 Años	22	9	3	3	37
	11-15 Años	14	4	3	0	21
	16-18 Años	1	0	0	0	1
Total		63	31	7	11	112

**Figura 4D. Diagnóstico Histológico contra Edad.** En la parte superior observamos de forma gráfica el porcentaje de los grupos de edad (en años) clasificados por el diagnóstico histológico, mientras que en la tabla se muestra a detalle el número de pacientes que comprende cada grupo, no se realizó una correlación con lo establecido con la literatura al no existir reportes respecto a cómo se presentan estos.



	Subgrupo Molecular			Total	
	WNT	SHH	No-WNT/No-SHH		
Edades					
	0-2 años	1	3	16	20
	3-5 años	0	3	30	33
	6-10 años	5	8	24	37
	11-15 años	0	3	18	21
	16-18 años	0	0	1	1
Total		6	18	107	112

**Figura 4E. Subgrupos Moleculares contra Edad.** En la parte superior observamos gráficamente el porcentaje de casos por grupo de edad (en años) de acuerdo con la subclasificación molecular, en la tabla presentamos el número de pacientes que compone a cada uno de estos, no se realizó una correlación con lo establecido con la literatura al no existir reportes respecto a cómo se presentan estos.



	Subgrupo Molecular			Total
	no-WNT/no-SHH	SHH	WNT	
ACG	6	1	0	7
Clásico	52	7	4	63
DN	25	5	1	31
NE	6	4	1	11
Total	89	17	6	112

**Figura 4F. Comparación de los casos de los subgrupos moleculares contra los diagnósticos histopatológicos.** En la gráfica superior podemos observar los porcentajes de los casos para cada uno de los grupos moleculares por histología y en la tabla el número de pacientes que los compone, se realizó una prueba de chi-cuadrado de independencia, obteniendo un  $p > 0.05$ .

## Análisis de Resultados

Para este estudio se analizaron 112 muestras de pacientes con meduloblastoma pediátrico entre 0 y 18 años y se determinaron las variantes histológicas y los subgrupos moleculares, para lo cual se evaluó la tinción de H&E y la expresión de las proteínas  $\beta$ -Catenina, YAP1, GAB1 y P53 en microarreglos de tejidos mediante la técnica de inmunohistoquímica, y a partir de la expresión de las diferentes proteínas se procedió a clasificar a los pacientes en los Subgrupos Moleculares WNT, SHH y no-WNT/no-SHH.

Con la finalidad de evaluar los subgrupos moleculares y grupos histológicos con diferentes datos demográficos se realizaron análisis por tablas de contingencia, en estas se analizaron datos como el sexo y la edad. La OMS ha reportado que el meduloblastoma es un tipo de cáncer más frecuente en niños que en niñas (10) tanto por histología como por subgrupos moleculares (16), lo cual concuerda con los datos obtenidos al tener una proporción cercana al 1.8:1 reportado.

Se realizó la clasificación histopatológica de los meduloblastomas, en donde se evaluó la morfología de los tumores, las frecuencias obtenidas son diferentes a las frecuencias esperadas, la histología Clásica, que es la más frecuente de acuerdo a la OMS con un 70%, mostró una menor frecuencia con un 56%, mientras que las histologías Desmoplásico/Nodular y Nodularidad Extensa presentaron 28% y 10%, las cuales son mayores en comparación de lo reportado que es 15.6% y 3.8% respectivamente. Por último, el grupo Anaplásico/Células Grandes presentó un 6%, siendo una menor frecuencia respecto a lo que reporta la OMS del 10.2%, estos resultados contrastan ya que se ha reportado que es más frecuente Anaplásico/Células Grandes comparado con Nodularidad Extensa, en la (Tabla 2) se resumen algunos reportes internacionales en donde evaluaron los MB por la clasificación histológica.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la subclasificación molecular muestran que nuestra población de estudio no presenta las frecuencias reportadas por la OMS (10), ya que los Subgrupos WNT y SHH tienen 5% y 15% respectivamente, siendo menores de acuerdo al 10% y 30% reportado. También se encontró que los tumores no-WNT/no-SHH representan la gran mayoría en nuestra población de estudio, con un 80% aproximadamente, lo cual sobrepasa el 60% reportado por la OMS, en la (Tabla 3) se hace una comparación de los porcentajes reportados por otros grupos y estudios internacionales de los subgrupos moleculares de MB.

Es probable que las diferencias encontradas en las frecuencias de los subgrupos moleculares y la clasificación histológica respecto a lo reportado por parte de la OMS se deba a que nuestra población se comporta de manera diferente a lo descrito en este consenso mundial. Observando otros estudios donde se evalúan los subgrupos moleculares (39–45) y las clasificaciones histológicas (40,43,45,46) de otras poblaciones del mundo se muestran de igual manera diferencias respecto a lo reportado por la OMS, indicando que el comportamiento de los subgrupos moleculares y los grupos histológicos es diferente entre poblaciones.

Además existe una excepción en el subgrupo molecular WNT el cual presenta una proporción 1:1 (10), en nuestros resultados se observa una mayor incidencia en el sexo femenino, este resultado concuerda con reportes en otras poblaciones donde se repite el mismo patrón (47). De igual manera respecto a los grupos histológicos se demostró que en el grupo de Nodularidad Extensa hay una mayor proporción en niñas, este último dato es de relevancia ya que es el único grupo donde la proporción entre niños y niñas es distinta a lo reportado previamente, además de que no se ha observado en algún otro estudio.

Respecto a la evaluación de la edad, se dividieron en 5 diferentes grupos para realizar un análisis más eficiente, siendo estos: 0-2 años, 3-5 años, 6-10 años,

11-15 años y 16-18 años, obteniendo datos heterogéneos. El subgrupo molecular No-WNT/No-SHH se presentó en todos los grupos de edades, en tanto que para el subgrupo SHH no se presenta en el rango de 16-18, ambos grupos coinciden con lo reportado en otros estudios (16). El subgrupo WNT solo se presentó en los grupos de edades de 0-2 años y 11-15 años, lo cual corresponde a los grupos de edad en donde es más frecuente este subgrupo molecular (10).

En lo que concierne a la clasificación histológica, el tipo clásico se presenta en todos los grupos de edades, mientras que el Desmoplásico/Nodular no lo observamos en el grupo de 16-18. Mientras que el Anaplásico/Células Grandes no está presente en los extremos, es decir de 0-2 y de 16-18, en tanto que en los de Nodularidad Extensa se presentan en los tres primeros grupos de edad, abarcando de 0-10 años.

También se realizó un análisis entre subgrupos moleculares y grupos histológicos. Se observó que no existe una dependencia entre ambas variables, por lo tanto, la histología no determinará el subgrupo molecular que presente el tumor. El subgrupo WNT se ha reportado que presenta histología clásica y Desmoplásico/Nodular (10,16), sin embargo destaca que se obtuvo un caso de Nodularidad Extensa, lo cual no se ha reportado previamente. Por otro lado, los subgrupos SHH y No-WNT/No-SHH se comportan de acuerdo a lo reportado (10,16), al presentarse en todos los grupos histológicos.

Finalmente, se observó que la edad y sexo se comportan en su mayoría de acuerdo con lo reportado en estudios previos, solo existen algunas excepciones respecto a los comportamientos.

<b>n</b>	<b>Clásico</b>	<b>DN</b>	<b>ACG</b>	<b>NE</b>	<b>País</b>	<b>Referencia</b>
<b>62</b>	74.2% (46 Casos)	21% (13 Casos)	1.6% (1 Casos)	3.2% (2 Casos)	Holanda	Kool, 2008 (40)
	72%	17%	11%	-----	Estados Unidos	Ellison, 2011 (41)
	70%	16%	10%	-----	Internacional	Kool, 2012 (48)
<b>67</b>	67.1% (45 Casos)	22.4% (15 Casos)	6% (4 Casos)	4.4% (3 Casos)	India (Bangalore)	Narayan, 2013 (49)
<b>75</b>	76% (57 Casos)	5.3% (4 Casos)	16% (12 Casos)	2.7% (2 Casos)	Polonia	Łastowska, 2015 (46)
<b>92</b>	68.5% (63 Casos)	20.6% (19 Casos)	8.7% (8 Casos)	2.2% (2 Casos)	India (Nueva Delhi)	Kaur, 2016 (20)
<b>550</b>	<b>70.4%</b> <b>(387 Casos)</b>	<b>15.6%</b> <b>(86 Casos)</b>	<b>10.2%</b> <b>(56 Casos)</b>	<b>3.8%</b> <b>(21 Casos)</b>	<b>Internacional</b>	<b>Cavalli, 2017</b> <b>(16)</b>
<b>6</b>	50% (3 Casos)	16.7% (1 Caso)	16.6% (1 Caso)	16.6% (1 Caso)	República Checa	Chlapek, 2017 (50)
<b>394</b>	70% (276 Casos)	15% (58 Casos)	15% (60 Casos)	-----	Europa	Schwalbe, 2017 (43)
<b>95</b>	80% (76 Casos)	9.5% (9 Casos)	9.5% (9 Casos)	1% (1 Caso)	India (Nueva Delhi)	Kaur, 2019 (45)
<b>112</b>	<b>56.2%</b> <b>(63 Casos)</b>	<b>27.6%</b> <b>(31 Casos)</b>	<b>6.2%</b> <b>(7 Casos)</b>	<b>9.8%</b> <b>(11 Casos)</b>	<b>México</b>	<b>Anaya-Estrada D,</b> <b>Resultados 2021</b>

**Tabla 2.** Comparación con la histología reportada en otros estudios.

n	WNT	SHH	No-WNT/No-SHH	País	Técnicas	Referencia
46	13% (6 Casos)	28.3% (13 Casos)	58.7% (27 Casos)	Canadá	FISH, PCR, IHQ	Thompson, 2006 (39)
61	14.8% (9 Casos)	23% (14 Casos)	62.2% (38 Casos)	Holanda	PCR	Kool, 2008 (40)
234	14% (32 Casos)	31% (72 Casos)	55% (130 Casos)	Estados Unidos	IHQ	Ellison, 2011 (51)
230	11.7% (27 Casos)	29.5% (68 Casos)	58.7% (135 Casos)	Canadá/Rusia	Perfil Genético, IHQ	Northcoth, 2011 (47)
173	12% (21 Casos)	24% (42 Casos)	64% (110 Casos)	Reino Unido	PCR	Schwalbe, 2011 (51)
550	11% (60 Casos)	28% (153 Casos)	61% (337 Casos)	Internacional	TR, PCR, IHQ	Kool, 2012 (48)
103	22.34% (23 Casos)	29.12% (30 Casos)	48.54% (50 Casos)	India (Mumbai)	TR, PCR TR	Kunder, 2013 (52)
173	21.4% (37 Casos)	23.1% (40 Casos)	55.5% (96 Casos)	China	IHQ	Zhang, 2014 (42)
76	7.9% (6 Casos)	11.8% (9 Casos)	80% (61 Casos)	Polonia	FISH, IHQ	Łastowska, 2015 (46)
92	9.8% (9 Casos)	45.6% (42 Casos)	44.6% (41 Casos)	India (Nueva Delhi)	IHQ	Kaur, 2016 (20)
	<b>10%</b>	<b>30%</b>	<b>60%</b>	<b>Internacional</b>	<b>N/A</b>	Louis, 2016, <b>OMS</b> (10)
763	9.18% (70 Casos)	29.22% (223 Casos)	61.6% (470 Casos)	Internacional	IHQ	Cavalli, 2017 (16)
6	0% (0 Casos)	33.3% (2 Casos)	66.7% (4 Casos)	República Checa	IHQ	Chlapek, 2017 (50)
425	8% (33 Casos)	26% (109 Casos)	67% (283 Casos)	Europa	Metilación DNA	Schwalbe, 2017 (43)
530	9.2% (49 Casos)	22.8% (121 Casos)	68% (360 Casos)	Internacional	N/A	Park, 2019 (44)
95	15.8% (15 Casos)	16.8% (16 Casos)	67.4% (64 Casos)	India (Nueva Delhi)	IHQ, FISH, NanoString	Kaur, 2019 (45)
<b>112</b>	<b>5.3%</b> <b>(6 Casos)</b>	<b>15.1%</b> <b>(17 Casos)</b>	<b>79.4%</b> <b>(89 Casos)</b>	<b>México</b>	<b>IHQ</b>	<b>Anaya-Estrada D,</b> <b>Resultados 2021</b>

**Tabla 3.** Comparación con los resultados de Subgrupos Moleculares reportados en otros estudios.

## Conclusiones

Este es el primer estudio en México en que se evalúa la prevalencia y diagnóstico del meduloblastoma de acuerdo con la clasificación por subgrupos moleculares, determinados por tinciones de inmunohistoquímica, comparándolo con el diagnóstico histológico simultáneamente de una serie de 112 pacientes pediátricos de 2 de los 3 centros pediátricos más grandes del país (Hospital Infantil de México Federico Gómez y Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social).

Se encontraron diferencias en la frecuencia de los grupos histológicos, así como de los diferentes subgrupos moleculares, que lo reportado por la OMS para el MB, indicando probablemente que nuestra población se comporta diferente.

Sin embargo, es necesario realizar estudios moleculares para poder corroborar esta información, así como poder conocer a bien la frecuencia del grupo 3 y 4 para el subgrupo no-WNT/no-SHH.

Este estudio ayudará a establecer las bases para la implementación de la subclasificación molecular para el diagnóstico integral de los pacientes pediátricos con meduloblastoma en nuestro país, y así brindar mayor conocimiento al clínico para definir un tratamiento personalizado sin menos efectos adversos y una mayor sobrevida. Además de poder reportar la frecuencia epidemiológica de este cáncer.

## Perspectivas

-Realizar el análisis por técnicas moleculares para corroborar las frecuencias de los subgrupos WNT, SHH y No-WNT/No-SHH, y poder separarlos en Grupo 3 y Grupo 4, para de esta manera tener una clasificación completa.

-Realizar la determinación de los diferentes marcadores moleculares de manera rutinaria a las muestras diagnosticadas como meduloblastoma, para establecer un enfoque de estratificación terapéutica en los pacientes pediátricos y correlacionar estos con la sobrevida y efectos adversos.

Subgrupo	WNT	SHH	No-WNT/No-SHH	
			Grupo 3	Grupo 4
IHQ $\beta$ -Cat Nuclear	+	-	-	-
IHQ GAB-1	-	+	-	-
IHQ YAP-1 Nuclear	+/-	+	-	-
IHQ P53	+/-	+/-*	+/-	+/-
IHQ Filamina A	+	+	-	-
FISH MYC	-	-	+/-	-
FISH MYCN	-	-	-	+/-
FISH Monosomía 6	+	-	-	-
FISH Pérdida Cromosoma 11	-	-	-	+
Análisis de metilación	x	X	✓	✓

\*Se diagnostica como SHH P53 mutante cuando sale positivo.

**Tabla 4. Parámetros considerados para realizar la subclasificación molecular de los meduloblastomas.** En esta tabla se resumen las determinaciones que se realizan para poder realizar una subclasificación adecuada y completa. De color gris claro se muestran las cuatro primeras filas que son las determinaciones que se pueden realizar a través de la determinación de inmunorreactividad por tinciones de inmunohistoquímica, faltando la filamina A. Con esto podemos observar que es necesario realizar la técnica de FISH para MYC, MYCN y para la pérdida del cromosoma 11, así como el análisis de metilación para poder hacer la separación entre el grupo 3 y grupo 4.

## Referencias

1. Um P. Cancer, Definition. In: Highlander SK, Rodriguez-Valera F, White BA, editors. Encyclopedia of Metagenomics: Environmental Metagenomics [Internet]. Boston, MA: Springer US; 2015. p. 65. Available from: [https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4\\_106](https://doi.org/10.1007/978-1-4899-7475-4_106)
2. OMS | Cáncer. WHO [Internet]. 2017 [cited 2021 Feb 18]; Available from: <http://www.who.int/topics/cancer/es/>
3. Ferlay J, Ervik M, Lam F, Colombet M, Mery L, Piñeros M, Znaor A, Soerjomataram I BF. International Agency for Research on Cancer 2020. Glob Cancer Obs Cancer Today [Internet]. 2020;419:1–2. Available from: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/900-world-fact-sheets.pdf>
4. The Global Cancer Observatory. Globocan 2020: México. Int Agency Res Cancer. 2020;929:29–30.
5. Secretaria de Salud. Programa de Acción Específico. Cáncer en la infancia y la adolescencia 2013-2018. Programa Sectorial de Salud. 2014.
6. Northcott PA, Robinson GW, Kratz CP, Mabbott DJ, Pomeroy SL, Clifford SC, et al. Medulloblastoma. Nat Rev Dis Prim. 2019;5(11):1–20.
7. Gupta K, Jogunoori S, Satapathy A, Salunke P, Kumar N, Radrota BD, et al. Medulloblastoma with myogenic and / or melanotic differentiation does not align immunohistochemically with the genetically defined molecular subgroups. Hum Pathol [Internet]. 2018;75:26–33. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.01.014>
8. López-Aguilar E, Sepúlveda-Vildósola AC, Rivera-Márquez H, Siordia-Reyes G, Betanzos-Cabrera Y, Cerecedo-Díaz F, et al. Clinical and Molecular Parameters for Risk Stratification in Mexican Children with Medulloblastoma. Arch Med Res. 2007;38(7):769–73.
9. Doussouki M El, Gajjar A, Chamdine O. Molecular genetics of medulloblastoma in children : diagnostic , therapeutic and prognostic implications. Futur Neurol. 2019;14(1):20–33.
10. Louis DN, Ohgaki H, Wiestier OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. Louis DN, Ohgaki H, Wiestier OD, Cavenee WK, editors. Lyon: IARC; 2016. 408 p.
11. de la Cruz Pabón JR, Patiño Hoyos MA, Quiceno Restrepo E, Toro Montoya AE.

Medulloblastoma : de la clasificación histológica a la molecular. Med UPB.

2018;37(1):47–54.

12. Pollack IF, Agnihotri S, Broniscer A. Childhood brain tumors: current management, biological insights, and future directions. *J Neurosurg Pediatr.* 2019;23(March):261–73.
13. Kijima N, Kanemura Y. Molecular Classification of Medulloblastoma. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016;56(11):687–97.
14. Thomas A, Noël G. Medulloblastoma: optimizing care with a multidisciplinary approach. *J Multidiscip Healthc.* 2019;12:335–47.
15. Millard NE, Braganca KC De. Medulloblastoma. *J Child Neurol.* 2016;31(12):1341–53.
16. Cavalli FMG, Remke M, Rampasek L, Peacock J, Shih DJH, Luu B, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell.* 2017;31(6):737–754.e6.
17. Taylor MD, Northcott PA, Korshunov A, Remke M, Cho YJ, Clifford SC, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: The current consensus. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):465–72.
18. Kuzan-Fischer CM, Juraschka K, Taylor MD, Ph D. Medulloblastoma in the Molecular Era. *J Korean Neurosurg Soc.* 2018;61(3):292–301.
19. Łastowska M, Trubicka J, Karkucińska A, Magdalena W, Tarasińska M, Perek M, et al. Immunohistochemical detection of ALK protein identifies APC mutated medulloblastoma and differentiates the WNT-activated medulloblastoma from other types of posterior fossa childhood tumors. *Brain Tumor Pathol [Internet].* 2018;36(1):1–6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10014-018-0331-2>
20. Kaur K, Kakkar A, Kumar A, Mallick S, Julka PK, Gupta D, et al. Integrating Molecular Subclassification of Medulloblastomas into Routine Clinical Practice : A Simplified Approach. *Brain Pathol.* 2016;26:334–43.
21. Clifford SC, Lusher ME, Lindsey JC, Langdon JA, Gilbertson RJ, Straughton D, et al. Wnt/Wingless pathway activation and chromosome 6 loss characterize a distinct molecular sub-group of medulloblastomas associated with a favorable prognosis. *Cell Cycle.* 2006;5(22):2666–70.
22. Skowron P, Ramaswamy V, Taylor MD. Genetic and molecular alterations across medulloblastoma subgroups. *J Mol Med.* 2015;93(10):1075–84.
23. Ramaswamy V, Nör C, Taylor MD. p53 and Medulloblastoma. *Cold Spring Harb*

- Perspect Med. 2016;6(4):a029579.
24. Cambruzzi E. Medulloblastoma , WNT-activated / SHH-activated : clinical impact of molecular analysis and histogenetic evaluation. *Child's Nerv Syst.* 2018;
  25. Menyhárt O, Giangaspero F, Gy B. Molecular markers and potential therapeutic targets in non-WNT / non-SHH ( group 3 and group 4 ) medulloblastomas. *J Hematol Oncol.* 2019;12(1):1–17.
  26. Ospina Pérez M, Muñetón Peña CM. Alteraciones del gen c-Myc en la oncogénesis. *latreia.* 2011;24(4):389–401.
  27. Banka S, Lederer D, Benoit V, Jenkins E, Howard E, Bunstone S, et al. Novel KDM6A (UTX) mutations and a clinical and molecular review of the X-linked Kabuki syndrome (KS2). *Clin Genet.* 2015;87(3):252–8.
  28. Cassia G de S e, Alves CAPF, Taranath A, López NS, Oztekin O, Gonçalves FG, et al. Childhood Medulloblastoma Revisited. *Top Magn Reson Imaging.* 2018;27(6):479–502.
  29. Archer TC, Mahoney EL, Pomeroy SL. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. *Neurotherapeutics.* 2017;14(2):265–73.
  30. Martínez León MI. Review and update about medulloblastoma in children. *Radiologia.* 2011;53(2):134–45.
  31. Rivera-Luna R, Niembro-Zúñiga AM, Zarco A, Marhx-Bracho A, Cárdenas-Cardos R, Olaya-Vargas A, et al. Medulloblastoma en pediatría. Pronóstico y tratamiento en la actualidad. *Gac Med Mex.* 2007;143(5):415–20.
  32. Juraschka K, Taylor MD. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *J Neurosurg Pediatr.* 2019;24(4):353–63.
  33. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, Bailey S, Clifford SC, Doz F, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol.* 2016;131(6):821–31.
  34. Rudin CM, Hann CL, Laterra J, Yauch RL, Callahan CA, Fu L, et al. Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N Engl J Med.* 2009 Sep 17;361(12):1173–8.
  35. Morfouace M, Shelat A, Jacus M, Freeman BB, Turner D, Robinson S, et al. Pemetrexed and gemcitabine as combination therapy for the treatment of group3 medulloblastoma. *Cancer Cell [Internet].* 2014;25(4):516–29. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.02.009>
  36. Pei Y, Liu KW, Wang J, Garancher A, Tao R, Esparza LA, et al. HDAC and PI3K

Antagonists Cooperate to Inhibit Growth of MYC-Driven Medulloblastoma. *Cancer Cell* [Internet]. 2016;29(3):311–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccell.2016.02.011>

37. Baay-Guzman GJ, Duran-Padilla MA, Rangel-Santiago J, Tirado-Rodriguez B, Antonio-Andres G, Barrios-Payan J, et al. Dual role of hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$  in experimental pulmonary tuberculosis: Its implication as a new therapeutic target. *Future Microbiol*. 2018;13(7):785–98.
38. Huerta-Yepez S, Baay-Guzman G, Bebenek I, Hernandez-Pando R, Vega M, Chi L. Hypoxia Inducible Factor promotes murine allergic airway inflammation and is increased in asthma and rhinitis. *Allergy*. 2011;66(7):909–18.
39. Thompson MC, Fuller C, Hogg TL, Dalton J, Finkelstein D, Lau CC, et al. Genomics identifies medulloblastoma subgroups that are enriched for specific genetic alterations. *J Clin Oncol*. 2006;24(12):1924–31.
40. Kool M, Koster J, Bunt J, Hasselt NE, Lakeman A, van Sluis P, et al. Integrated genomics identifies five medulloblastoma subtypes with distinct genetic profiles, pathway signatures and clinicopathological features. *PLoS One*. 2008;3(8).
41. Ellison DW, Dalton J, Kocak M, Nicholson SL, Fraga C, Neale G, et al. Medulloblastoma: Clinicopathological correlates of SHH, WNT, and non-SHH/WNT molecular subgroups. *Acta Neuropathol*. 2011;121(3):381–96.
42. Zhang ZY, Xu J, Ren Y, Yao Y, Li KKW, Ng HK, et al. Medulloblastoma in China: Clinicopathologic analyses of SHH, WNT, and Non-SHH/WNT molecular subgroups reveal different therapeutic responses to adjuvant chemotherapy. *PLoS One*. 2014;9(6):e99490.
43. Schwalbe EC, Lindsey JC, Nakjang S, Crosier S, Smith AJ, Hicks D, et al. Novel molecular subgroups for clinical classification and outcome prediction in childhood medulloblastoma: a cohort study. *Lancet Oncol* [Internet]. 2017;18(7):958–71. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045\(17\)30243-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1470-2045(17)30243-7)
44. Park AK, Lee JY, Cheong H, Ramaswamy V, Park SH, Kool M, et al. Subgroup-specific prognostic signaling and metabolic pathways in pediatric medulloblastoma. *BMC Cancer*. 2019;19(1):1–15.
45. Kaur K, Jha P, Pathak P, Suri V, Sharma MC, Garg A, et al. Approach to molecular subgrouping of medulloblastomas: Comparison of NanoString nCounter assay versus combination of immunohistochemistry and fluorescence in-situ hybridization in resource constrained centres. *J Neurooncol* [Internet]. 2019;143(3):393–403.

Available from: <https://doi.org/10.1007/s11060-019-03187-y>

46. Łastowska M, Jurkiewicz E, Trubicka J, Daszkiewicz P, Drogosiewicz M, Malczyk K, et al. Contrast enhancement pattern predicts poor survival for patients with non-WNT/SHH medulloblastoma tumours. *J Neurooncol.* 2015;123(1):65–73.
47. Northcott PA, Korshunov A, Witt H, Hielscher T, Eberhart CG, Mack S, et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *J Clin Oncol.* 2011;29(11):1408–14.
48. Kool M, Korshunov A, Remke M, Jones DTW, Schlanstein M, Northcott PA, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: An international meta-analysis of transcriptome, genetic aberrations, and clinical data of WNT, SHH, Group 3, and Group 4 medulloblastomas. *Acta Neuropathol.* 2012;123(4):473–84.
49. Narayan R, Shastry AH, Thota B, Sampath S, Thennarasu K, Arivazhagan A, et al. Expression patterns of insulin-like growth factor binding protein isoforms in medulloblastoma subtypes and clinical correlation. *Pediatr Neurosurg.* 2013;49(6):325–30.
50. Chlapek P, Zitterbart K, Kren L, Filipova L, Sterba J, Veselska R. Uniformity under in vitro conditions: Changes in the phenotype of cancer cell lines derived from different medulloblastoma subgroups. *PLoS One.* 2017;12(2):1–14.
51. Schwalbe EC, Lindsey JC, Straughton D, Hogg TL, Cole M, Megahed H, et al. Rapid diagnosis of medulloblastoma molecular subgroups. *Clin Cancer Res.* 2011;17(7):1883–94.
52. Kunder R, Jalali R, Sridhar E, Moiyadi A, Goel N, Goel 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 Oncol.* 2013;15(12):1644–51.