



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Ciencias

**Búsqueda de células mesenquimales por
inmunohistoquímica en retinoblastoma de
pacientes atendidos en el Hospital Infantil de
México Federico Gómez**

T E S I S

QUE PARA OBTENER TÍTULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A

Karla Daniela Mérida Escudero

DIRECTORA DE TESIS
M. en C. María de Lourdes Cabrera Muñoz



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX.

JUNIO, 2022



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.

1. Datos del alumno.

Mérida
Escudero
Karla
Daniela
56 11 45 06 47
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
314011479

2. Datos del tutor.

M. en C.
María
de Lourdes
Cabrera
Muñoz

3. Datos del sinodal 1

Dra.
Guillermina
Juliana
Baay
Guzmán

4. Datos del sinodal 2.

Dra.
Martha
Verónica
Ponce
Castañeda

5. Datos del sinodal 3.

Dra.
María
del Pilar
Eguía
Aguilar

6. Datos del sinodal 4.

M. en C.
Adriana
Hernández
Ángeles

7. Datos del trabajo escrito.

Búsqueda de células mesenquimales por inmunohistoquímica en retinoblastoma de
pacientes atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez
72 p
2022

Agradecimientos

A mi familia: mamá, papá y hermano, por impulsarme siempre a seguir mis sueños, apoyarme en todo y hacer esto posible. Gracias a ustedes he podido llegar ser la mujer, y ahora científica, en la que me he convertido.

Especialmente la Dra. Lourdes Cabrera y la Dra. Verónica Ponce por ir de la mano conmigo en este proyecto, brindarme las herramientas, los espacios y el conocimiento necesario para culminar el mismo.

A las demás integrantes de mi jurado, M. en C. Adriana Hernández y Dra. Pilar Eguía por tomarse el tiempo de revisar y enriquecer este trabajo con todo su conocimiento y experiencia, particularmente a la Dra. Guillermina Baay con su equipo de trabajo por además apoyarme y enseñarme en la parte experimental.

Contenido

1	RESUMEN	2
2	INTRODUCCIÓN	3
2.1	Células mesenquimales	3
	Origen de las células mesenquimales	4
	Funciones de las células mesenquimales	4
2.2	Identificación de células mesenquimales	5
2.3	Células mesenquimales y cáncer	6
2.4	Células mesenquimales en leucemia	7
2.5	Células mesenquimales en cáncer de mama	7
2.6	Asociación células mesenquimales con células troncales del tumor	8
	Células troncales normales y células troncales del cáncer.....	9
	Microambiente celular y tumores	13
2.7	Retinoblastoma	16
	Formas clínicas.....	16
	Origen del retinoblastoma.....	17
3	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	18
4	HIPÓTESIS.....	19
5	OBJETIVOS.....	19
5.1	Objetivo general	19
5.2	Objetivos particulares	19
6	MATERIAL Y MÉTODOS	19
6.1	Determinación de grupos	20
6.2	Tinciones de Inmunohistoquímica	22
6.3	Plan de análisis histológico	24
7	RESULTADOS	26
7.1	Casos incluidos	26
7.2	Análisis histológico de las inmunotinciones.....	27
	Expresión de Nestina.....	27
	Expresión de SOX2	30

Expresión de Ki-67	30
Expresión de NGFR.....	32
7.3 Análisis histopatológico	34
8 DISCUSIÓN	45
Limitantes	47
9 CONCLUSIÓN.....	48
10 PERSPECTIVAS.....	48
11 REFERENCIAS	49
ANEXO 1.....	55
ANEXO 2.....	56
ANEXO 3	68

ABREVIATURAS

CSC	Células trocales de cáncer
CM	Células mesenquimales
SMD	Síndrome mielodisplásico
HSC	Células troncales hematopoyéticas
ESC	Células troncales embrionarias
ASC	Células troncales adultas
TME	Microambiente del tumor
NGFR	Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso
RB	Retinoblastoma
PLONI	Infiltración Post Laminar al Nervio Óptico

1 RESUMEN

Dentro del estudio de la biología del cáncer, desde la década de los noventa, las llamadas células troncales del cáncer tomaron relevancia como objeto de estudio en este campo ya que se demostró en leucemia y en cáncer de mama la presencia de una pequeña población de células capaces de autorrenovarse y de producir progenie tumorigénica. Estas características son similares a las de células troncales normales. También se ha sugerido la existencia de una estrecha relación de las células troncales normales con otro tipo de célula: las células mesenquimales, tienen aspecto fibroblástico con propiedades adherentes, tienen la capacidad de autorrenovarse y son multipotentes ya que pueden diferenciarse en osteoblastos, condrocitos y adipocitos entre otros linajes. Entre algunas de sus funciones más estudiadas se encuentra el mantenimiento de los tejidos conjuntivos y su papel intermediario y regulador de la angiogénesis. Estos nichos o microambientes celulares son elementos clave para el desarrollo y comunicación celular. La interacción entre las células troncales de cáncer y las células mesenquimales forma parte de un nicho de células troncales. Recientemente se ha sugerido que la presencia de células troncales del cáncer y células mesenquimales, además de impulsar el desarrollo de tumor, pueden estar relacionadas con la agresividad de las neoplasias malignas.

Este trabajo buscó identificar y localizar células mesenquimales dentro del retinoblastoma que es un tumor intraocular maligno de la infancia temprana, mediante tinciones de inmunohistoquímica de cuatro proteínas clave: Nestina, NGFR que han sido empleadas para la identificación de células mesenquimales, SOX2 utilizado como marcador de células troncales y Ki-67 que permite identificar células en proliferación. A través del análisis histológico se determinó la presencia de células Nestina+ con morfología arborescente rodeando vasos sanguíneos del tumor, sugerentes de células mesenquimales. También se encontraron células SOX2+ en la misma localización, sin embargo la tinción con el marcador NGFR resultó negativa en esa localización, tampoco se identificaron diferencias entre el grupo de alto riesgo a metástasis y el grupo de bajo riesgo a metástasis.

2 INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades heterogéneas, esto quiere decir que un tumor no es únicamente una masa de células tumorales idénticas en proliferación, pues se trata de un ecosistema complejo que contiene tanto a las células tumorales como a varios tipos de células endoteliales, hematopoyéticas y estromales que pueden influir en el desarrollo del tumor (1). Los tumores están compuestos de poblaciones heterogéneas de células con diferentes niveles de inestabilidad genética; actualmente se considera que el desarrollo del tumor es impulsado por un subconjunto de células centrales que se caracteriza por propiedades autorrenovables, multipotentes e iniciadoras de tumores, estas células malignas se llaman células troncales del cáncer (*CSC del inglés Cancer Stem Cells*)(2). Además, se ha encontrado una relación estrecha entre las CSC con un tipo de células mesenquimales.

2.1 Células mesenquimales

Las CM fueron descritas por Friedenstein y sus colaboradores en 1968 a partir del estudio y análisis de una muestra de médula ósea, y definidas como células formadoras de colonias que tienen la capacidad de autorrenovarse, multipotentes, y que se pueden diferenciar típicamente en osteoblastos, condrocitos y adipocitos (3); sin embargo, años después se demostró que también pueden originar mioblastos, endotelios, pericitos, fibroblastos y hasta células neuronales (4). Fenotípicamente, son células con aspecto fibroblástico, presentan prolongaciones celulares en diferentes planos y propiedades adherentes. Se encuentran en la médula ósea, de donde generalmente son aisladas, pero pueden estar presentes en otros tejidos del cuerpo (5) como en el tejido adiposo, tendones, sangre periférica y sangre del cordón umbilical (6).

Debido a que presentan muchas características en común con los fibroblastos, la Sociedad Internacional de Terapia Celular dictó tres criterios mínimos para describir a una célula como CM: debe ser adherente a la placa plástica de cultivo, debe expresar CD105, CD733 y CD90; y deben diferenciarse en

osteoblastos, adipocitos y condrocitos en condiciones *in vitro*; sin embargo este tema aún está en debate (7).

Origen de las células mesenquimales

Inicialmente las CM fueron identificadas como una subpoblación de células de médula ósea que tenía potencial osteogénico (3). Sin embargo, las características descritas se les han asignado únicamente a partir de cultivos *in vitro*. Ha surgido la teoría de que un nicho de *células troncales mesenquimales* (MSC por sus siglas en inglés) *in vivo* está localizado en zonas perivasculares. Ya que las CM y los pericitos tienen características similares y funcionan como fuentes de reparación y mantenimiento de los tejidos, por lo tanto, son células que tienen capacidades de diferenciación y autorenovación (8,9). Los pericitos están definidos por su ubicación perivascular y morfología. Los cultivos derivados de los pericitos tienen características similares, como lo es la morfología y la expresión antigénica de la superficie celular, a las células obtenidas de cultivos derivados del estroma mesenquimatoso, además de que ambos cultivos pueden inducirse a la diferenciación en osteoblastos, condrocitos, adipocitos (10,11) lo que apoya la idea de que los pericitos dan lugar a CM; sin embargo se ha encontrado que no es el único linaje que las puede producir (12) por lo que el tema sobre término “troncal” asociado a estas células aún es controversial.

Las CM de la médula ósea se aíslan y purifican gracias a su capacidad de adherirse a la placa plástica donde se realizan los cultivos celulares (6). Se han desarrollado otros métodos a partir de la separación celular por gradiente de densidad (13). Cuando son aisladas, en la mayoría de los casos, son heterogéneas en cuanto a su capacidad de diferenciación y proliferación; tienen tres propiedades biológicas importantes, un amplio potencial de diferenciación, propiedades inmunoreguladoras y secretan factores que promueven la remodelación de los tejidos (14).

Funciones de las células mesenquimales

Las CM están involucradas en diversos procesos fisiológicos normales y patológicos, como lo es la supresión del sistema inmunológico. En condiciones

normales, participan en el mantenimiento de la estructura y el funcionamiento de tejidos conjuntivos. Actúan como mediadores durante la reparación tisular a partir de la síntesis de biomoléculas que ayudan a la regeneración del tejido posterior a una lesión (15).

2.2 Identificación de células mesenquimales

A través de estudios con el método de citometría de flujo se ha intentado hacer la inmunofenotipificación de las células mesenquimales en los que se ha encontrado una serie de combinaciones de marcadores se superficie para caracterizarlas (16) como lo son CD29, CD44, CD49, CD73, CD90, CD105, CD106, CD140b, CD166 Y STRO-1 en su superficie celular, sin embargo, se ha demostrado que no funcionan como marcadores específicos (4). Además no presentan CD45, CD19, CD79, CD11b Y HLA-DR, en contraste con las células hematopoyéticas (5,17).

Una de las moléculas que se ha explorado como marcador de CM es el receptor del factor de crecimiento nervioso de baja afinidad (NGFR por sus siglas en inglés *Nerve Growth Factor Receptor*), también conocido como CD271, ya que las células positivas para esta proteína pueden diferenciarse en diferentes linajes mesenquimales(18). El NGFR representa uno de los marcadores más específicos para las CM (19), que consta de un dominio extracelular de cuatro repeticiones de cuarenta aminoácidos con seis residuos de cisteína en posiciones conservadas seguida de una región rica en serina/treonina, un dominio transmembrana y otro dominio citoplasmático de ciento cincuenta y cinco aminoácidos; el dominio de unión al factor de crecimiento nervioso está localizado en la región rica en cisteína. Se ha publicado que el anticuerpo que identifica esta proteína es específica para una población de células presentes en médula ósea con capacidades multipotentes por lo que sugirió el uso de este marcador como una opción para la selección de CM (20,21). Posteriormente a estos hallazgos se realizaron más estudios en los que se ha demostrado que con la expresión de NGFR, es posible asociar la localización *in situ* de las CM (4,22).

Por otro lado, también se ha observado que las CM de médula ósea pueden ser identificadas por Nestina ya que CM cultivadas *in vitro* son positivas para esta proteína antes de su diferenciación; y se descubrió que en la médula ósea las CM marcadas con Nestina presentaban actividad progenitora y tienen cierto potencial de autorrenovación y diferenciación (23,24). Nestina es una proteína de filamento intermedio de clase VI expresada principalmente en células de rápida división y encargadas de regeneración tisular (25), los filamentos intermedios son un componente importante del citoesqueleto celular en conjunto con los microtúbulos y microfilamentos (26). En mamíferos esta proteína tiene filamentos de 1618 aminoácidos y peso molecular de 176 kDa. Se caracteriza por tener un extremo N-terminal corto y un C-terminal largo lo que permite uniones complejas con proteínas estructurales.

2.3 Células mesenquimales y cáncer

Estudios han demostrado que las CM humanas tienen un papel importante durante la tumorigénesis; contribuyen al crecimiento de tumores y/o a la progresión de la metástasis mediante la promoción de la angiogénesis facilitando su formación y maduración. Dichos procesos también son regulados por las CM mediante la síntesis de quimiocinas, citocinas y factores de crecimiento que tienen acción paracrina sobre las células tumorales a partir de sus propios receptores (15). Se ha observado en estudios de cáncer de mama que la densidad de CM en los tumores y su liberación de citocinas dentro del microambiente que se genera en ellos, tiene una relación con un mayor número de CSC (27).

El crecimiento de tumores invasivos provoca lesiones en los tejidos donde se reclutan CM para participar en los mecanismos de reparación que involucra la comunicación celular entre células adyacentes en donde las MC pueden alterar la capacidad proliferativa y la funcionalidad de las células formadoras de tumores contribuyendo también a la heterogeneidad que presentan diversos tumores (28).

2.4 Células mesenquimales en leucemia

Las células mesenquimales (CM) han tomado relevancia dado que se ha demostrado que no solo tienen un papel importante en la hematopoyesis, sino que también pueden participar activamente en el desarrollo de patologías como el

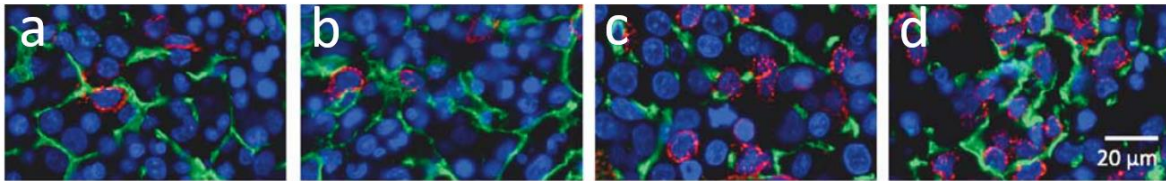


Figura 1. Inmunofluorescencia en la que se observa que las CM (verde) con morfología arborescente se encuentran en contacto con las HSC (rojo) en muestras de a) SMD benigno, b) SMD de bajo agrado, c) SMD de alto grado y d) leucemia mieloide aguda sugiriendo una relación MC-CSC y asociando una mayor cantidad de estas células con la agresividad de la enfermedad (4).

síndrome mielodisplásico (SMD) y leucemias agudas. Se ha evaluado la cantidad, distribución y localización de las células mesenquimales, en diversas leucemias, estas observaciones han revelado una asociación entre la densidad de CM con leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda y SMD; siendo los pacientes con leucemia mieloide aguda los que presentan una mayor cantidad de CM, lo que sugiere una asociación proporcional de la cantidad de las CM con la agresividad de las enfermedades. Además, se propone que las CM se localizan en zonas perivasculares en la mayoría de los casos (29). Estos datos están apoyados por otro estudio donde además de determinar la localización perivascular, específicamente rodeando los capilares y las arteriolas, mediante el empleo de marcadores fluorescentes se logró caracterizar una población de CM con morfología arborescente que parece presentar una estrecha relación con las células troncales hematopoyéticas (HSC del inglés *Hematopoietic Stem Cells*) en presencia de patologías como el SMD y la leucemia mieloide aguda (Figura 1) (30).

2.5 Células mesenquimales en cáncer de mama

En 2011 se demostró un papel importante para las CM, en la regulación de las CSC de mama; en donde Liu y sus colaboradores llevaron a cabo un estudio que demostró que la interacción entre las CM y las CSC está mediada por un ciclo de retroalimentación positiva de citocinas en el que la IL-6 y CXCL7 desempeñan papeles fundamentales. Este ciclo requiere la presencia simultánea de ambos tipos

de células. Además, se mostró que las células mesenquimales, como las células cancerosas, están organizadas en una jerarquía en la que los células mesenquimales primitivas que expresan ALDENOFUOR (ALDH+) poseen capacidades de autorrenovación, diferenciación multilínea e interactúan con las células cancerosas regulando la renovación de las CSC (Figura 2) (27). También, se ha observado que la presencia de CM aumenta la proliferación y el potencial metastásico de las células tumorales debido a factores solubles secretados por las CM como CXCL 1, 6 y 5, así como la IL-8 (31).

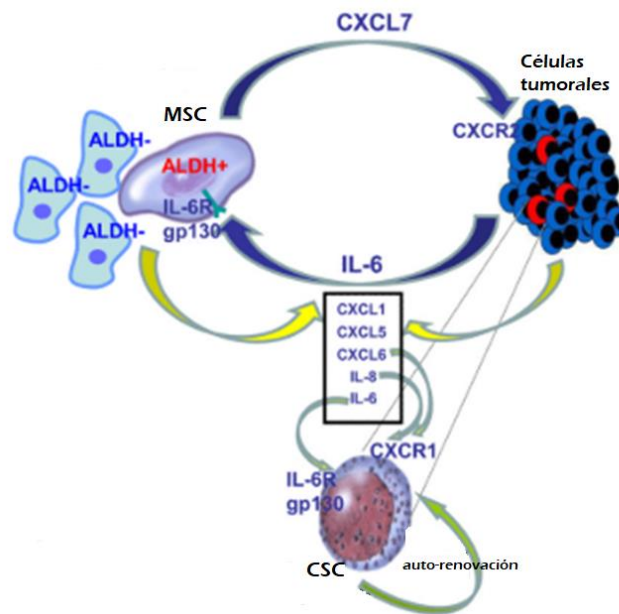


Figura 2. Modelo de redes de citocinas que median la interacción entre CM (ALDH+), células tumorales y CSC en cáncer de mama. Funciona como un ciclo de retroalimentación positiva en el que la IL-6 es producida por las células tumorales para atraer a las CM, las CM en respuesta a IL-6 producen CXCL7, citocina clave que induce la producción de más células tumorales, a su vez, IL-6 en conjunto con otras citocinas de la familia de ligando con motivo CXC contribuyen a la expansión de la población de las CSC (5).

2.6 Asociación células mesenquimales con células troncales del tumor

Para poder entender qué es y cómo funciona una célula troncal del cáncer, primero es necesario conocer a las células troncales animales en condiciones normales. Las células troncales son definidas generalmente como células con la capacidad de autorreplicarse y de generar una variedad de células diferenciadas; sin embargo, dicha definición es utilizada para referirse tanto a células troncales embrionarias (ESC, del inglés *Embryonic Stem Cells*), como a células troncales adultas (ASC, del inglés *Adult Stem Cells*), debido a que existen durante el

desarrollo embrionario o durante la vida adulta en el proceso del mantenimiento de los tejidos.

Células troncales normales y células troncales del cáncer

Para alcanzar una definición más acertada de las células troncales en el contexto del cáncer, es importante tomar en cuenta tres criterios principales: la capacidad de replicación, la clonalidad y la potencialidad.

En cuanto a la autorreplicación, todas las células, incluyendo a las troncales, presentan un número finito de duplicaciones antes de que ocurran los arrestos replicativos o la senescencia. La clonalidad, es la capacidad necesaria de células troncales individuales para dar lugar a más células troncales con el mismo grado de potencialidad (32). Finalmente, la potencialidad se refiere a la capacidad de producir variedades de células diferenciadas, ésta se reduce conforme avanza el desarrollo del organismo de manera que, el cigoto es una célula troncal totipotencial, con la capacidad de generar tanto los tejidos embrionarios como extraembrionarios en organismos vertebrados. Posteriormente, durante la etapa de blastocisto, las células de la masa celular interna son pluripotentes (ESC), es decir, cuentan con la capacidad de formar cualquier tejido embrionario, de estas se derivan las células troncales de la línea germinal y las células troncales adultas (ASC). Dependiendo de la capacidad que tenga una célula ASC para generar uno o varios tipos celulares, será multi o monopotente pero jamás totipotente (33).

Las ESC muestran totipotencia, tienen la capacidad de diferenciarse en células que componen tanto a las capas embrionarias: ectodermo, mesodermo y endodermo, así como a las membranas extraembrionarias: amnios, corion, alantoides y saco vitelino. En condiciones *in vitro* son “inmortales” y pueden mantenerse en estado indiferenciado (34). Algunas de las células que derivan de forma directa del interior de la masa celular del blastocisto quístico comienzan a tener potencialidad restringida.

Las células ASC tienen capacidad de autorreplicación y diferenciación restringida en mayor grado (32), estas células se encuentran en los tejidos del organismo después del nacimiento (35), se mantienen en tejidos del organismo adulto donde son responsables principalmente de la homeostasis tisular y la

regeneración de los mismos (36). Se han identificado ASC en diferentes órganos y tejidos como médula ósea, cerebro, sangre periférica, vasos sanguíneos, piel, epitelio ovárico, testículos y otros. Se cree que éstas residen en los llamados nichos de células troncales donde, generalmente hay un número reducido de ASC (37); sin embargo no se han identificado en todos los tejidos del organismo humano.

Un ejemplo de ASC son las células troncales hematopoyéticas (HSC del inglés *Hematopoietic Stem Cells*), encargadas de mantener y producir todos los linajes de células sanguíneas durante la vida de los organismos. En mamíferos, es posible encontrar a las HSC en un nicho ubicado en la médula ósea, tejido en el cual fueron descubiertas y caracterizadas, que proporciona factores indispensables para su autorrenovación y diferenciación (38,39). La médula ósea es un tejido complejo que se puede dividir en parénquima y estroma medular. El parénquima es el conjunto de células hematopoyéticas en sus diferentes estados de maduración y el estroma medular está conformado por tejido adiposo, hueso trabecular y células reticulares, todas con origen en una célula troncal mesenquimal (40).

La idea de la existencia de las CSC surgió en 1997 cuando Bonnet y Dick encontraron una pequeña población de células en médula ósea de un paciente con leucemia mieloide aguda que presentaba características de células troncales tales como la autorrenovación y diferenciación. Al inocularse en ratones inmunosuprimidos observaron que iniciaban leucemia mieloide aguda y daban origen a otros tipos celulares que ya habían sido descritos en esta enfermedad (41).

Las CSC se consideran como células que se someten a un proceso de organogénesis aberrante y mal regulado, análogo al trabajo realizado por las células troncales normales pero aberrante (42). A pesar de que las CSC son heterogéneas, tienen propiedades y firmas transcripcionales específicas a causa de diversas mutaciones genéticas y modificaciones epigenéticas, relacionadas principalmente con las vías de desarrollo; poseen variación en el crecimiento, la apoptosis y el metabolismo, por ejemplo. Además, como las células troncales normales, tienen capacidad de autorrenovación y poseen multipotencia, pero estos procesos suele estar desregulados a causa de mutaciones acumuladas (1,42,43) y pueden adquirir la capacidad de generar metástasis (42).

Debido a que muchos tumores son de origen clonal, la variedad de células tumorales que generan puede tener potencial proliferativo indefinido, limitado o nulo. Tienden a presentar características fenotípicas y funcionales de las células normales de las que se derivan, pueden adaptarse a microambientes y permanecer inactivas a lo largo de los años o proliferar hasta llegar a provocar metástasis a partir de la pérdida de la adhesión celular y la adquisición de un fenotipo migratorio (42,44).

Sin embargo, el desarrollo de las CSC aún no está definido por lo que se han desarrollado dos modelos para tratar de explicar su origen.

El modelo estocástico: Está basado en que el cáncer está dado por la hiperproliferación y acumulación de mutaciones en genes implicados en el ciclo celular (45). A partir de células epiteliales, posterior a una mutación oncogénica, desarrollando más mutaciones oncogénicas (Figura 3A). En este modelo, cada una de las células tienen la misma probabilidad de ser la que origina y facilita la iniciación y progresión del tumor las cuales no son afectadas únicamente por el ambiente donde se encuentran sino también por factores intrínsecos que varían estocásticamente (46).

El modelo jerárquico: Está basado en la idea de que las CSC representan una población de células con características biológicas distintas a las del resto de las que componen un tumor. La carcinogénesis ocurre cuando una célula troncal normal pierde su regulación originando así a una CSC y, dando lugar a células con diferentes capacidades proliferativas (Figura 3B). Una CSC o diferentes poblaciones de CSC pueden dar lugar a diferentes tumores o clonas tumorales dependiendo del tejido y órganos en el que se encuentre, donde destaca la importancia del microambiente de los tumores, ya que esto puede explicar la heterogeneidad de los tumores (1,47).

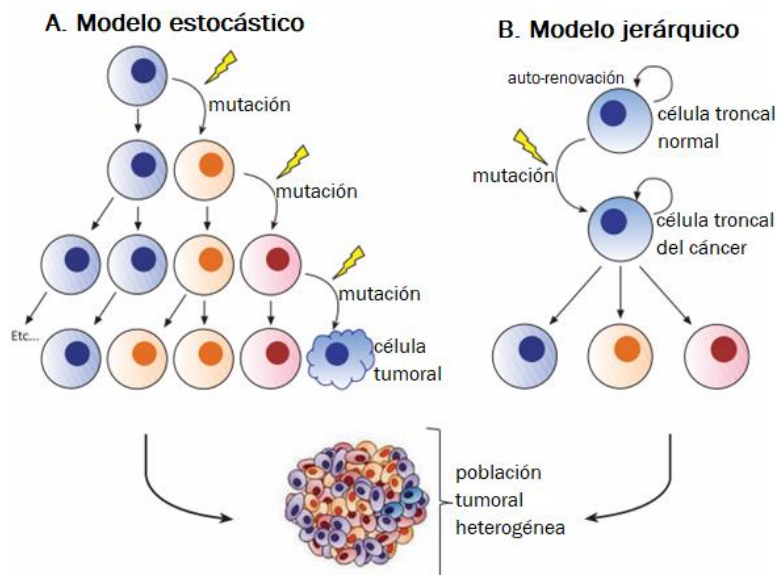


Figura 3 Modelos de carcinogénesis: estocástico y jerárquico. A) Modelo estocástico: hiperproliferación de células y acumulación de múltiples mutaciones originan células tumorales. B) Modelo jerárquico: Una célula troncal normal sufre eventos mutacionales perdiendo su regulación originando así una CSC (21).

Una de las características de estas células es la plasticidad que forma un puente entre el modelo jerárquico y el modelo estocástico debido a que aquellas poblaciones organizadas jerárquicamente ocurren en poco tiempo entre un estadio y otro; y los eventos estocásticos pueden generar nuevas poblaciones con organizaciones jerárquicas (48).

Si bien se ha reportado la presencia de una pequeña población de células que se encargan de mantener la homeóstasis en diferentes tejidos y de originar diferentes tumores malignos, no se ha comprobado su presencia en todos los tejidos ni en todos los tumores, por lo que este tema aún se encuentra en debate.

En tumores cerebrales, se ha reportado la presencia de una pequeña población de células CD133 positivas, un marcador de células madre neurales, que cuentan con características de CSC, es decir, con capacidad proliferativa, autorrenovación y diferenciación (49). SOX2 representa otro marcador utilizado para la identificación de células con características de CSC en glioma, una de las neoplasias más agresivas, en donde se reportó que la expresión de SOX2 es necesaria para la proliferación y mantenimiento del tumor (50). Se sabe que SOX2 es un factor de transcripción de la familia de genes SOX HGM-box relacionada con

los genes determinantes del sexo SRY (51). SOX2 y Oct3 son responsables del mantenimiento de la pluripotencialidad de las ESC debido a su participación en el ciclo celular (52).

Las ideas arrojadas por estas primeras exploraciones en la biología de las células troncales conducen a la probabilidad de la existencia de las CSC en los tumores, por lo que la confirmación y estudio de estas células podría dirigir y conducir al desarrollo de mejores terapias contra el cáncer al identificar e idear estrategias para aniquilar, a esa población de células.

Además, si las CSC impulsan el desarrollo de los tumores y la metástasis, esto permite explicar que muchos de los tratamientos administrados a personas con cáncer fracasen ya que es posible la adquisición de resistencia a los fármacos por parte de estas células a través de un proceso de evolución acelerado (42).

Así como es el caso de las células troncales normales, las CSC por lo menos en el sistema hematopoyético se alojan en nichos que, en general, son microambientes especializados que se encargan de regular la diferenciación de las células al proporcionar muy reguladamente el intercambio de señales extracelulares mediante factores secretados (53).

Además, se sabe que las células troncales normales están reguladas por la interacción entre factores extrínsecos y vías reguladoras intrínsecas de las células. Durante el desarrollo normal y la homeostasis del tejido, los factores extrínsecos son proporcionados por elementos celulares y extracelulares que definen el nicho o microambiente de las células troncales. Cada vez hay más pruebas de que muchos tumores, incluido el cáncer de mama, pueden ser impulsados por un subcomponente celular que muestra propiedades de células troncales. Aunque está claro que el microambiente tumoral influye en el crecimiento tumoral y la metástasis, no está claro si estos efectos están mediados exclusivamente por las CSC.

Microambiente celular y tumores

Como se ha mencionado, las células troncales normales se encuentran en microambientes especializados o nichos que les brinda protección y mantenimiento

de sus propiedades mediante redes complejas de interacciones con diversos tipos celulares. El microambiente tiene diferentes funciones, además de proporcionar soporte estructural, también brinda soporte trófico, información topográfica y las señales fisiológicas apropiadas para regular la función de las células; son capaces de proporcionar señales a las células troncales, principalmente por moléculas secretadas y de superficie, para controlar estrictamente la tasa de proliferación, determinar el destino de las células hijas y proteger las células troncales del agotamiento o la muerte (54).

A partir de estudios de la línea germinal y las células troncales del bulbo folicular epitelial se han determinado, de forma hipotética, algunos componentes principales de los microambientes que sostienen a las células troncales, además de la propia célula troncal, se pueden encontrar células de soporte del estroma que interactúan directamente con ella y entre sí a través de los receptores de superficie, uniones y factores solubles; proteínas típicas de la matriz extracelular que proporcionan estructura, organización y señales mecánicas al nicho; vasos sanguíneos y conexiones con el sistema nervioso (Figura 4).

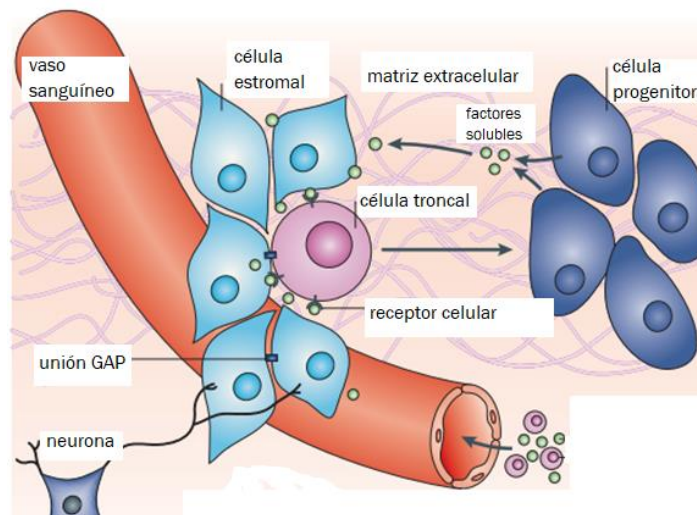


Figura 4 Principales componentes celulares de los microambientes donde se encuentran las células troncales. Todos los elementos contribuyen al correcto funcionamiento de las células al suministrar nutrientes, realizar el intercambio de señales o incluso ser elemento de soporte (29).

De manera similar en el cáncer los componentes celulares y no celulares de un tumor proporcionan regulación de las señales proliferativas y de autorrenovación, ayudando así a las CSC a mantener su estado indiferenciado (55). Las células

estromales, las células inflamatorias y la vasculatura se han propuesto como componentes clave del nicho que respaldan y sostienen las CSC (56).

Los tumores en desarrollo tienen además la capacidad de movilizar una variedad de tipos celulares distintos en nichos locales o distantes, a partir de la secreción de factores químicos sintetizados por las células tumorales; las células movilizadas o reclutadas provocan alteraciones de la composición del tumor provocando la coevolución de las células malignas y el estroma (15).

Los diferentes elementos de células no tumorales asociados con tumores hacen referencia al microambiente del tumor (*TME del inglés Tumor Micro Environment*) que, en condiciones normales, se encarga de la regulación del mantenimiento de las células troncales a partir del equilibrio entre la autorrenovación y diferenciación de las mismas (54); para suministrar oxígeno y nutrientes a través de los vasos sanguíneos es necesario que estos nichos de células troncales se encuentren cercanos a la vasculatura del organismo, o en dado caso, que se presente una neovascularización (57); a su vez la matriz extracelular brinda un soporte estructural.

En el cáncer, el TME influye directamente la función de las células tumorales siendo indispensable para su desarrollo debido a que es el proveedor de nutrientes y el principal regulador de pH del neoplasma entre otras actividades (1). Además de proporcionar las señales necesarias para el crecimiento, se ha reportado que el microambiente participa en la resistencia terapéutica al brindar protección a las células tumorales a partir de proteínas extracelulares específicas (58). Es posible que la heterogeneidad del TME de los tumores sea la causante de la diferenciación anómala de las células tumorales (42).

La interacción entre las células tumorales y el microambiente es un elemento clave para la progresión del tumor, en dicho evento las células mesenquimales, representan uno de los componentes críticos (15), ya que son reclutadas durante la tumorigénesis hacia el sitio de inflamación y se incorporan al tumor (59,60).

Toda la información recabada de esos reportes es de gran relevancia debido a que el principal interés de este trabajo es evaluar a las CM en el nicho tumoral del retinoblastoma, ya que no se ha presentado información relevante sobre las CM en este tumor.

2.7 Retinoblastoma

El retinoblastoma (RB) es un tumor intraocular maligno común de la infancia con una baja tasa de incidencia que varía entre países que puede ser letal si no se trata a tiempo y adecuadamente. En México se estima que hay un caso de retinoblastoma por cada 20 000 nacidos vivo. Esta neoplasia surge en la retina en desarrollo y surge de células troncales retinianas primitivas o células precursoras de las diferentes capas de la retina, la mayoría de los casos se diagnostica entre los 2 y 5 años (61).

El RB representa un problema de salud que afecta de forma única, pues a pesar de los avances en el diagnóstico y tratamiento, estos no suelen llegar a todos los niños afectados, principalmente afecta la población pediátrica de países con bajos y medianos ingresos (62), en estos países la detección del tumor suele ser en pacientes con mayor edad al momento del diagnóstico y con mayor riesgo a generar metástasis (63).

Formas clínicas

En términos generales el retinoblastoma se puede presentar en dos formas clínicas con características especiales:

- 1) Forma bilateral, que es heredable constituye el 25% de los casos. Está caracterizado por la presencia de mutaciones en la línea germinal del gen RB1, se puede heredar a partir de un progenitor afectado o ser el resultado de una nueva mutación.
- 2) Forma unilateral, afectando un solo ojo, constituye el 75% de todos los casos y no es heredada ni heredable en el 90% de los casos.

Ambas manifestaciones del retinoblastoma pueden surgir a partir de la mutación de los dos alelos del gen RB1 que se encuentra localizado en el cromosoma 13q14. Esto es importante debido a que su producto, la proteína pRb, es un regulador negativo clave para la fase G1 del ciclo celular. La falta de dicha proteína o su inactivación elimina la restricción de pRb en el control del ciclo celular, dando como resultado la proliferación celular desregulada(64), por lo que las células cancerígenas del RB pueden identificarse con el marcador Ki-67, proteína nuclear

que se encuentra activa en las fases del ciclo celular (G_1 , S, G_2 , y M) pero ausente en las células en reposo (G_0)(65). Sin embargo, además de esta mutación se requieren otros eventos para que el tumor tenga progresión (64). Adicionalmente, se sabe que la inactivación del gen RB1 conduce a la inestabilidad cromosómica y a mutaciones secundarias y terciarias que constituyen vías clave para el desarrollo del cáncer (61). Esto es importante debido a que se ha determinado que debido a la mutación en uno de los reguladores más importantes del ciclo celular como lo es el gen RB1 los sobrevivientes de RB pueden desarrollar otros tipos de cáncer como sarcomas en tejidos blandos, osteosarcomas, tumores cerebrales, cáncer de mama y cáncer de pulmón (66)

Origen del retinoblastoma

Se deriva de células de origen neuroectodérmico de la capa interna de la copa óptica. Se trata de un tumor endofítico o exofítico según crece por abajo o por encima de la retina respectivamente. Clínicamente es de color blanquecino que, entre más desarrollado, ocupa mayor espacio de la cavidad vítrea del globo ocular. Se ha caracterizado microscópicamente como una proliferación de células redondas pequeñas con núcleos basófilos y escaso citoplasma, necrosis tumoral, apoptosis y actividad mitótica prominente. La invasión de las células neoplásicas al nervio óptico y/o a la coroides se considera como uno de los factores de riesgo que indica probabilidad de metástasis (67).

El ojo es un tejido que continúa desarrollándose después del nacimiento (68) y respecto a las células troncales del ojo, se ha reportado evidencia de la presencia de ASC que se encuentran albergadas en el epitelio ciliar del ojo adulto que proliferan *in vitro* y presentan la capacidad para originar neuronas retinianas (69); otro estudio demuestra la presencia en la retina de mamíferos de células con características de células troncales cuya actividad y densidad disminuye conforme avanza el desarrollo del organismo, situándose en el borde periférico de la retina (70).

Pocos estudios describen la arquitectura del TME en retinoblastoma. Sin embargo, algunos estudios han confirmado la presencia de diferentes tipos de

células del estroma en RB con TME similares a los observados en otros tipos de cáncer. Se ha demostrado por ejemplo la presencia de tipos de células del estroma como células endoteliales, fibroblastos, fibroblastos asociados a cáncer, células del sistema inmune como macrófagos y pericitos a partir de la positividad a distintos marcadores mediante inmunohistoquímica (71). También se encontró una población de células SOX2 positivas cuyo aumento, en conjunto con una mayor vasculatura, podría relacionarse con la agresividad del tumor (72). Sin embargo, no se ha reportado la presencia de CM asociadas a las CSC, y por lo anteriormente expuesto, su identificación podría dar indicios de la localización de las células que dan origen al tumor (CSC) debido a la interacción de estos dos tipos de células que se ha observado en otros tipos de cáncer.

3 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha observado en diferentes tipos de cáncer como leucemia (41) y cáncer de mama (73) la presencia de una pequeña población de células relacionadas con el origen de los tumores (CSC), además entre ellas se han encontrado células mesenquimales íntimamente asociadas y que pueden dar origen a diversos tipos celulares cuando se aíslan.

En el caso particular de retinoblastoma no se ha reportado la presencia de estas células por lo que este trabajo es una aproximación inicial para identificar y localizar a las células mesenquimales que potencialmente pueden acompañar a las células iniciadoras del retinoblastoma (27,30).

Búsqueda de células mesenquimales por inmunohistoquímica en retinoblastoma de pacientes atendidos en el Hospital Infantil de México Federico Gómez

4 HIPÓTESIS

Si en retinoblastoma hay células mesenquimales se pueden identificar por inmunohistoquímica con anticuerpos anti Nestina, anti NGFR, anti SOX2 y anti Ki-67.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Identificar y distinguir células mesenquimales de células tumorales en retinoblastoma mediante inmunohistoquímica con los marcadores Nestina, NGFR, SOX-2 y Ki-67 para analizar y establecer su localización dentro del tumor.

5.2 Objetivos particulares

- Demostrar la presencia de células mesenquimales en retinoblastoma.
- Describir si existe una relación topográfica de estas células en el retinoblastoma con la vasculatura tumoral.
- Explorar si existe relación entre estas células y el riesgo de desarrollo metastásico.

6 MATERIAL Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo observacional, empleando tejidos tumorales fijados en formol e incluidos en parafina que forman parte del acervo del Servicio de Patología y que provienen de pacientes atendidos y tratados por retinoblastoma en el “Hospital Infantil de México Federico Gómez”. De acuerdo con

sus características histopatológicas se identificaron 5 casos de bajo riesgo y 7 casos de alto riesgo metastásico.

6.1 Determinación de grupos

Para determinar los grupos de bajo y alto riesgo histológico es importante tomar en cuenta que en la mayoría de los casos el tratamiento de retinoblastoma consiste en la extirpación quirúrgica del globo ocular, e incluye su análisis histológico que permite identificar factores de riesgo de metástasis. Estos factores metastásicos, son hallazgos microscópicos que demuestran la invasión del tumor a diversas estructuras oculares (Figura 5) y su identificación ayudan a determinar si se trata de un tumor de alto o bajo riesgo a generar metástasis y esta información ayuda a determinar los tratamientos posteriores a la cirugía, así como su intensidad. Estos criterios histológicos principalmente han sido establecidos por el Grupo de Trabajo Internacional de Estadificación del Retinoblastoma (IRSWG por sus siglas en inglés). En el año 2009 se llegó a un consenso en el que se definieron los principales criterios de riesgo: que la invasión coroidea masiva del foco tumoral tenga un diámetro igual o mayor a 3mm, que estos focos invasivos alcancen a la esclera y la invasión tumoral al nervio óptico (regiones pre laminar, laminar y post laminar) (Figura 6) (74). Tomando en cuenta lo anterior a en la Tabla 1 se enuncian detalladamente estos criterios morfológicos que se tomaron en cuenta para la definición de los grupos.

Tabla 1. Criterios de clasificación para la determinación del grupos de bajo riesgo y alto riesgo metastásico

Criterios de clasificación	Bajo riesgo metastásico	Alto riesgo metastásico
1 Invasión a coroides	Ausente o menor a 3mm	Mayor a 3 mm
2 Invasión a iris	Ausente	Presente
3 Invasión a cuerpo ciliar	Ausente	Presente
4 Invasión a región pre laminar del nervio óptico	Ausente	Presente
5 Invasión a región laminar del nervio óptico	Ausente	Presente
6 Invasión a región post laminar del nervio óptico	Ausente	Presente
7 Invasión a borde quirúrgico del nervio óptico	Ausente	Presente

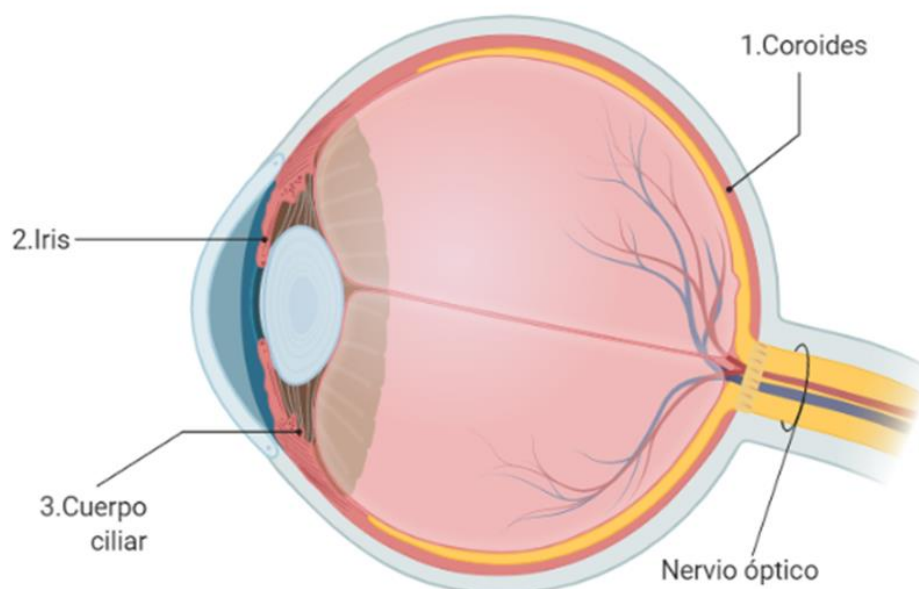


Figura 5. Representación de la anatomía del ojo humano donde se muestran y enumeran los criterios de inclusión para los grupos de bajo riesgo y alto riesgo metastásico.

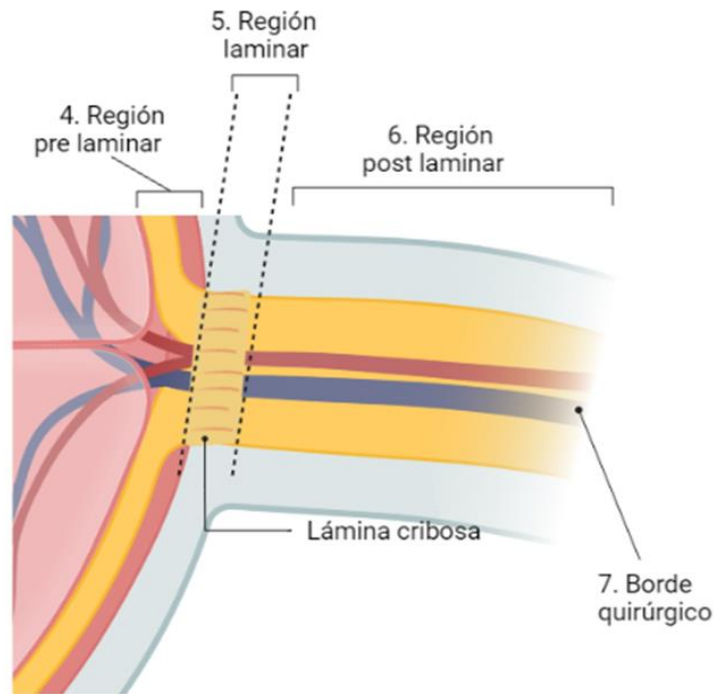


Figura 6. Representación de las regiones pre laminar, laminar y post laminar del nervio óptico.

Para realizar los estudios histopatológicos del globo ocular enucleado, las piezas quirúrgicas se fijan en formol amortiguado al 10% durante 24 horas, posteriormente se realiza un procesamiento histológico de rutina en donde el tejido es deshidratado y parafinado en un incluidor. Finalmente, los tejidos se incluyen en bloques de parafina y con un microtomo semiautomatizado se realizaron cortes seriados de 4 μm de grosor, los cuales se colocaron en laminillas electrocargadas para su estudio.

6.2 Tinciones de Inmunohistoquímica

Una vez que se obtuvieron los cortes histológicos de cada caso, se les realizaron inmunotinciones, sin distinción entre cada caso, empleando anticuerpos contra las proteínas de membrana Nestina y NGFR que son características de células mesenquimales identificadas en médula ósea. También identificando Ki-67 proteína que se encuentra en el núcleo de células en proliferación, para contrastar las células tumorales y SOX2 proteína que es un factor de transcripción, esencial en una red genética responsable de mantener pluripotencia y se encuentra en el núcleo celular de células troncales.

Para la realización las inmunotinciones, las laminillas se desparafinaron en una horno a 80°C por 10 minutos y 5 minutos más sumergidas en Xilol (JT Baker) al 100%. Se hidrataron utilizando alcoholes de mayor a menor concentración: Xilol al (100%), etanol/xilol (50%), etanol (JT Baker) al (100%, 90% y 70%) y agua. Se realizó recuperación de antígenos empleando amortiguador de citrato pH 6 “VECTOR Antigen Solution Citrated Base” (H-3300, VECTOR) en una olla de presión a 135°C por 20 minutos, posteriormente se trataron dos veces con peróxido de hidrógeno (JT Baker) al 3% durante 15 minutos en agitación para desactivar las peroxidases endógenas. Posterior a los lavados, las secciones se incubaron en cámara húmeda con Suero Normal de Caballo al 2.5% incluido en el kit “ImmPRESS Universal Polymer Kit Peroxidase Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG” (MP-7500, Vector Laboratories Inc.) para bloquear la unión inespecífica por 2 horas a temperatura ambiente, seguido del bloqueo se realizó la incubación con los anticuerpos.

Previamente se realizaron estandarizaciones para determinar la concentración óptima de cada anticuerpo a utilizar para las inmunotinciones, se probaron las diluciones 1:200, 1:300 y 1:500, y a partir de estos resultados se eligieron las siguientes diluciones para los cortes histológicos de cada caso:

Para la identificación de la proteína Nestina, las secciones se incubaron por 20 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-Nestina clona 10C2 de ratón (MAB5326, MERK) a una dilución 1:500 con diluyente de anticuerpos Da Vinci Green Diluent (PD900, BioCare Medical, SKU).

Para la identificación de la proteína NGFR, la secciones se incubaron por 20 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti – NGFR (p75) clona 8211 de ratón (MAB5264, MERK) a una dilución 1:200 con diluyente de anticuerpos Da Vinci Green Diluent.

Para la identificación de la proteína SOX2, las secciones se incubaron por 20 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal anti-SOX2 [EPR3131] de conejo (an215970, abcam) a una dilución 1:300 con diluyente de anticuerpos Da Vinci Green Diluent.

Para la identificación de Ki-67, las secciones se incubaron por 20 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo monoclonal Ki-67 de conejo (9901-325-

092820, BIOCARE) a una dilución 1:200 con diluyente de anticuerpos Da Vinci Green Diluent.

La detección de la unión específica de estos anticuerpos con su antígeno se llevó a cabo utilizando el kit “ImmPRESS Universal Polymer Kit Peroxidase Horse Anti-Mouse/Rabbit IgG” (MP-7500, Vector Laboratories Inc.) que emplea un sistema de amplificación enzimática a partir de anticuerpos secundarios conjugados con la enzima peroxidasa que produce un color marrón en el sitio del reconocimiento del antígeno detectable por microscopía de luz.

Finalmente, las tinciones fueron reveladas con el kit “ImmPACT DAB Substrate, Peroxidase (HRP) (SK-4105, Vector Laboratories Inc.)”, la diaminobencidina en conjunto con el peróxido de hidrógeno (H₂O₂) son el sustrato de la peroxidasa que, al activar la enzima, se generan precipitados insolubles color marrón-ocre en el sitio de reconocimiento antígeno-anticuerpo. Los cortes histológicos fueron contrateñidos con hematoxilina (Thermo Fisher) y montadas con resina sintética (Entelan, Merk) para su conservación y análisis histológico.

6.3 Plan de análisis histológico

Se obtuvo una imagen digital de alta resolución de cada corte histológico inmunoteñido utilizando el escáner para laminillas de patología digital marca Aperio CS2, Leica. Debido a la magnitud del tumor, y con el fin de obtener observaciones de las diferentes regiones que conforman el tumor se utilizaron cortes completos de la porción central del globo ocular que incluyen desde la córnea hasta el nervio óptico post laminar referidos como pupila-nervio óptico, en cada imagen digital se realizó una selección de 4 zonas de interés por triplicado ilustradas en la Figura 7, de acuerdo con los siguientes criterios:

1. Tumor adyacente a la retina no neoplásica.
2. Tumor central, identificándose al contener los vasos sanguíneos más grandes que irrigan el tumor.
3. Tumor periférico, es decir, zonas que se encuentran alejadas del centro del tumor.
4. Nervio óptico (regiones pre laminar, laminar y post laminar).

Nota: La información del estado del borde quirúrgico del nervio óptico se revisó en las laminillas histológicas e informe del estudio histopatológico original.

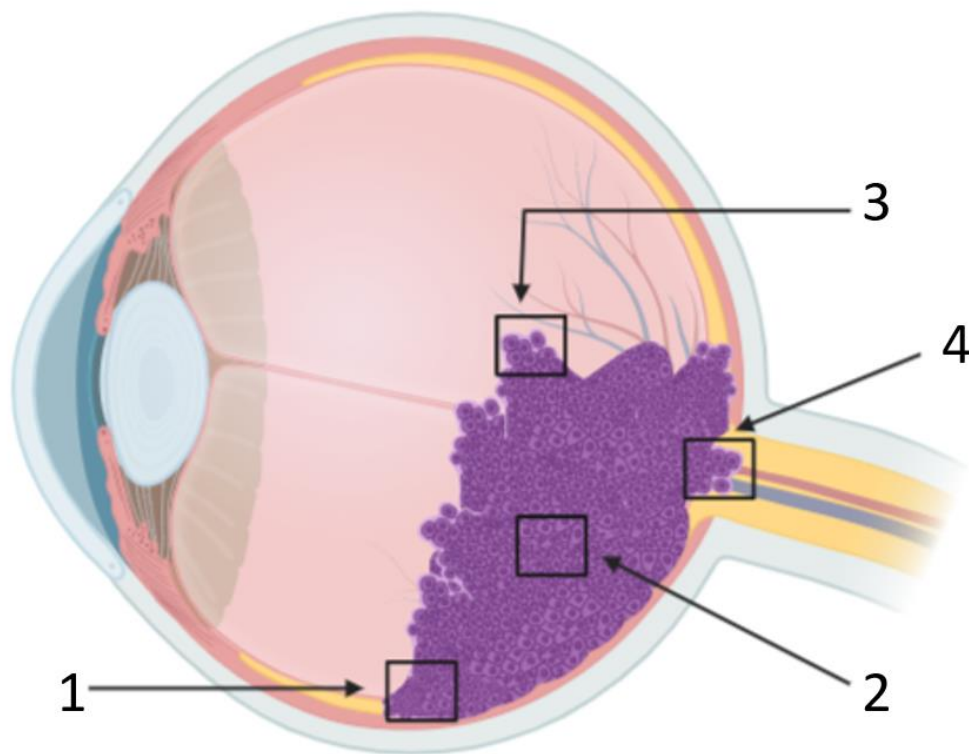


Figura 7. Esquema representativo de un globo ocular con retinoblastoma y el plan de análisis histológico en cuatro zonas de interés: 1. Tumor adyacente a la retina no neoplásica, 2. Tumor central, 3. Tumor periférico y 4. Nervio óptico (región pre laminar, laminar y post laminar).

7 RESULTADOS

7.1 Casos incluidos

Se incluyeron 12 casos de retinoblastoma de los cuales se muestra la información clínico-demográfica en la Tabla 2.

Tabla 2. Lista de casos e información clínico-demográfica de cada uno.

Número de caso	Edad (meses)	Género	Lateralidad
1	24	F	Uni
2	18	F	Bil
3	26	M	Uni
4	48	M	Bil
5	6	M	Uni
6	36	F	Uni
7	13	M	Bil
8	17	M	Uni
9	38	M	Uni
10	14	M	Uni
11	22	F	Bil
12	25	F	Uni

Abreviaturas: F= femenino, M= masculino, Uni= unilateral, Bil= bilateral.

Los 12 casos se dividieron en dos grupos, bajo riesgo y alto riesgo, tras el análisis de factores de alto riesgo realizado por un patólogo (Tabla 3).

Tabla 3. Lista de casos evaluados en el estudio.

Caso	Coroides	PLONI	Borde Qx del nervio óptico infiltrado	Tipo de tumor
1	<3 mm	NO	Negativo	Bajo riesgo
2	<3 mm	NO	Negativo	Bajo riesgo
3	NO	NO	Negativo	Bajo riesgo
4	>3mm	NO	Negativo	Alto riesgo*
5	<3 mm	NO	Negativo	Bajo riesgo
6	NO	NO	Negativo	Bajo riesgo
7	<3mm	SI	Negativo	Alto riesgo

8	>3mm	SI	Negativo	Alto riesgo
9	<3mm	SI	Negativo	Alto riesgo
10	>3mm	SI	Negativo	Alto riesgo
11	<3mm	SI	Negativo	Alto riesgo
12	>3mm	SI	Negativo	Alto riesgo

*PLONI= Infiltración Post Laminar al Nervio Óptico; Qx= quirúrgico; *Al realizar el análisis histológico se determinó que corresponde a un caso de alto riesgo.*

7.2 Análisis histológico de las inmunotinciones

Se analizaron las tinciones obtenidas de cada anticuerpo (resumen de la información de los anticuerpos Anexo 1) para cada caso en estructuras neoplásicas, así como estructuras no neoplásicas. En total se obtuvieron 48 imágenes digitalizadas, a continuación, se describen e ilustran de manera general los hallazgos panorámicos más sobresalientes en estructuras no neoplásicas de cada tinción y posteriormente, se describe detalladamente el proceso de análisis realizado en las estructura tumorales.

Expresión de Nestina

La proteína de filamento intermedio Nestina se expresa en cuerpos y prolongaciones de neuronas y otras células de la retina no neoplásica, en el endotelio vascular, así como en toda la región post laminar del nervio óptico (Figura 8).

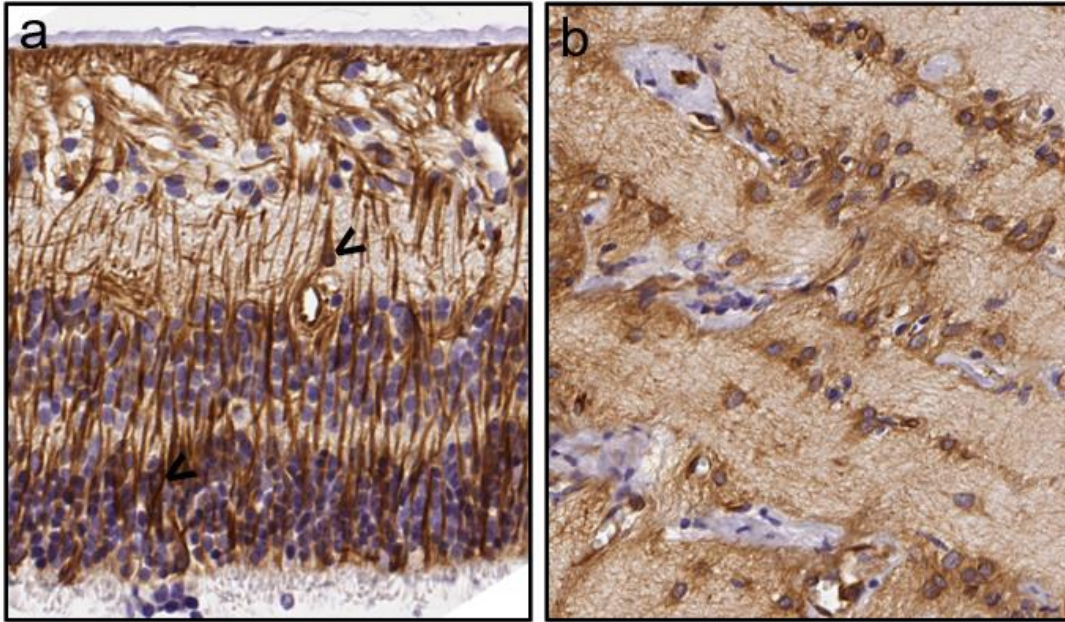


Figura 8. Expresión de Nestina (coloración ocre-marrón) en células de estructuras no neoplásicas: a) Retina no neoplásica, se observan abundantes prolongaciones celulares y las puntas de flecha señalan dos cuerpos celulares tenidos y b) Región post laminar del nervio óptico. Caso 5, amplificación 20x.

En cuanto a la expresión de Nestina en las células del tejido tumoral, también se observan prolongaciones celulares revelando estructuras arborescentes y algunos cuerpos celulares en el endotelio vascular (Figura 9) y particularmente en células alrededor de los vasos sanguíneos tanto arteriolas como en arterias y capilares (Figura 10).

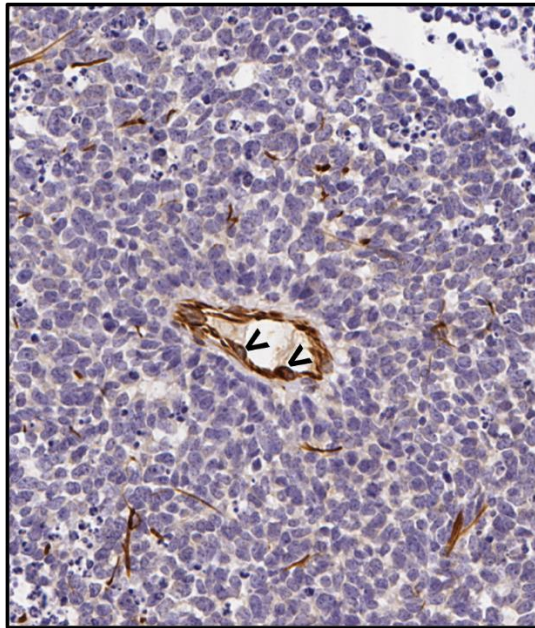


Figura 9. Expresión de Nestina (colocación marrón) en células del endotelio vascular del tumor. Caso 12, amplificación 20x.

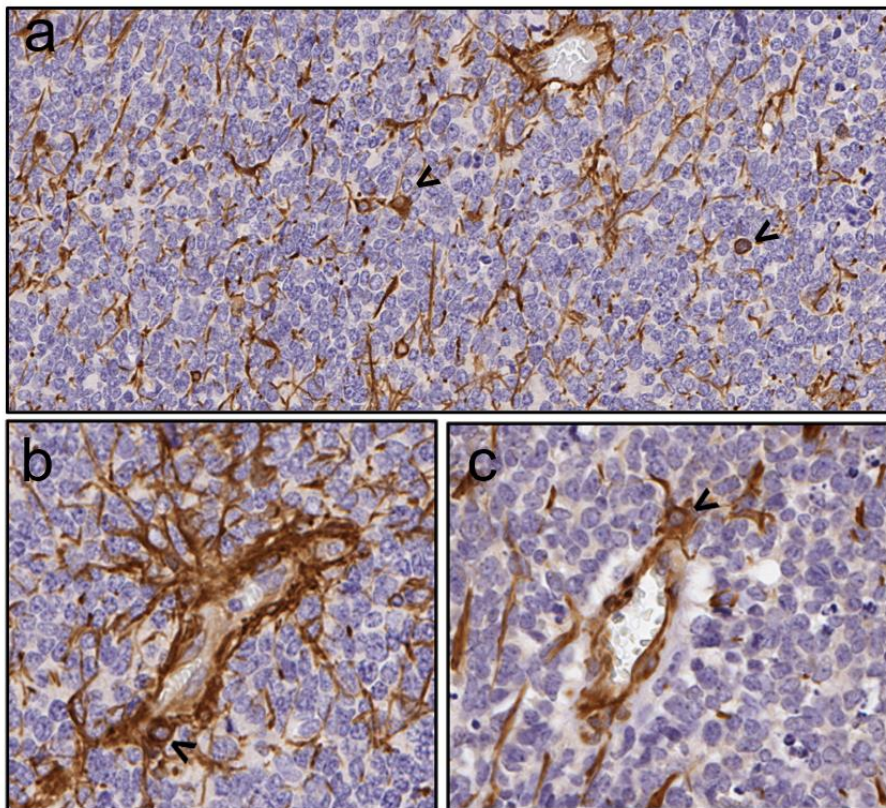


Figura 10. Expresión de Nestina (coloración marrón) en células del tumor. a) Tumor central con cuerpos celulares teñidos (punta de flecha) y prolongaciones arborescentes (amplificación 10x) y b-c) Expresión de Nestina en células alrededor de vasos sanguíneos del tumor (amplificación 20x). Caso 10.

Expresión de SOX2

El factor de transcripción SOX2 se expresa en el núcleo de células con capacidades de autorrenovación, esta inmunotinción se observa en células de estructuras oculares no neoplásicas tales como la retina, el nervio óptico en la región pre laminar, laminar y post laminar; y en el epitelio subcapsular del cristalino (Figura 11).

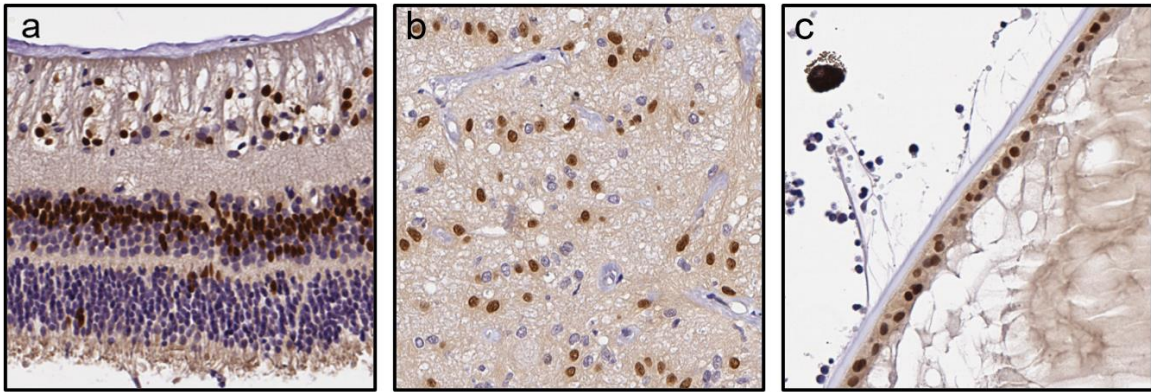


Figura 11. Expresión de SOX2 (coloración marrón) en el núcleo de células de estructuras no neoplásicas: a) retina, b) nervio óptico post laminar y c) epitelio subcapsular del cristalino. Caso 4, amplificación 20x.

La expresión de SOX2 también se observa en el núcleo de las células en el centro del tumor (Figura 12), particularmente rodeando vasos sanguíneos.

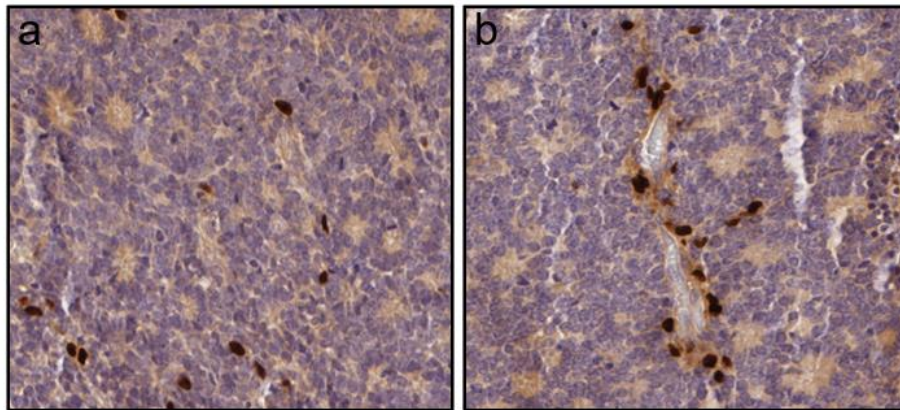


Figura 12. Expresión de SOX2 a) en el núcleo de algunas células del centro del tumor y b) en el núcleo de células perivasculares (rodeando arteriolas). Caso 5, amplificación 20x.

Expresión de Ki-67

El factor de transcripción Ki-67, a diferencia de Nestina y SOX2, no se expresa en ninguna célula de las estructuras oculares no neoplásicas (Figura 13).

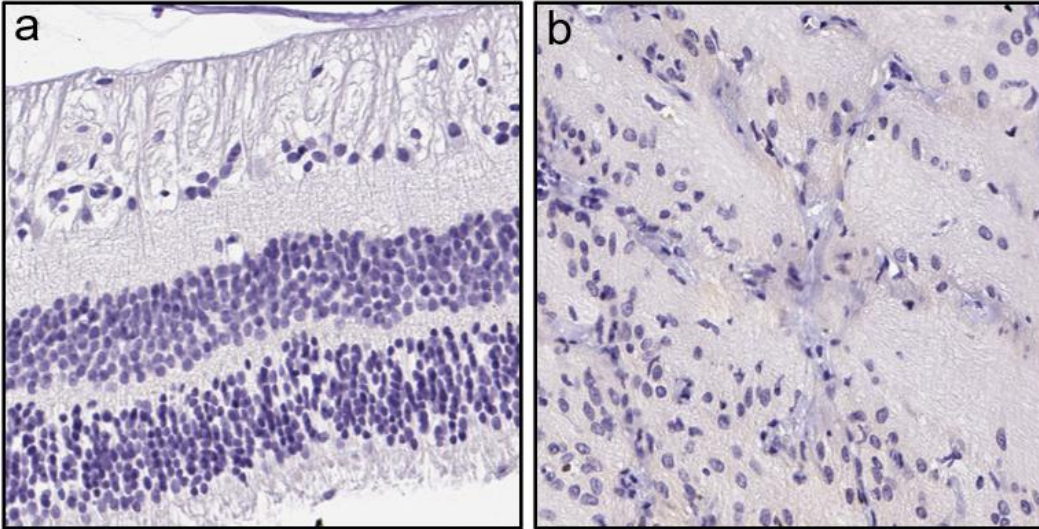


Figura 13. El factor de transcripción Ki-67 no se expresa en a) retina ni en b) nervio óptico. Caso 5 aumento 20x.

La inmunotinción de Ki-67 únicamente se observa en el núcleo de las células tumorales en estado proliferativo, presente en el centro del tumor, así como en áreas periféricas del tumor (Figura 14) y en células que infiltran el nervio óptico (PLONI) (Figura 15).

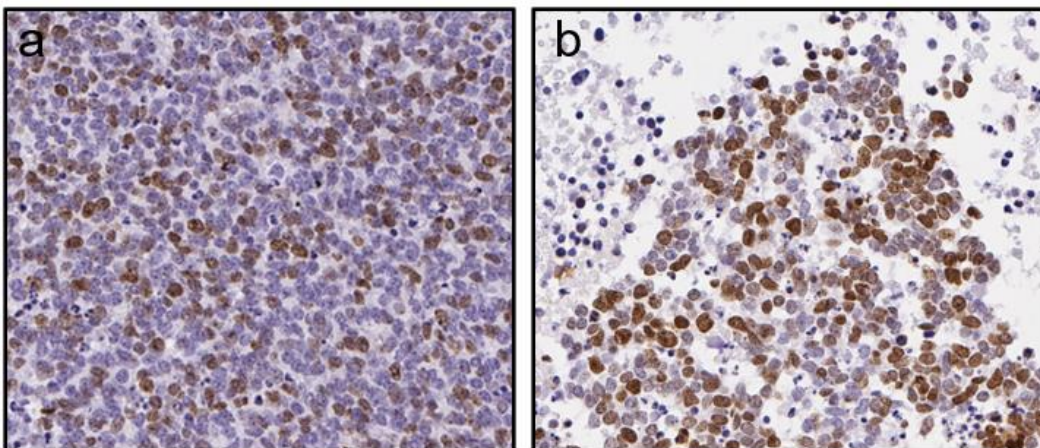


Figura 14. Expresión de Ki-67 (coloración marrón) en el núcleo de células del a) centro del tumor y b) área periférica. Caso 11, amplificación 20x.

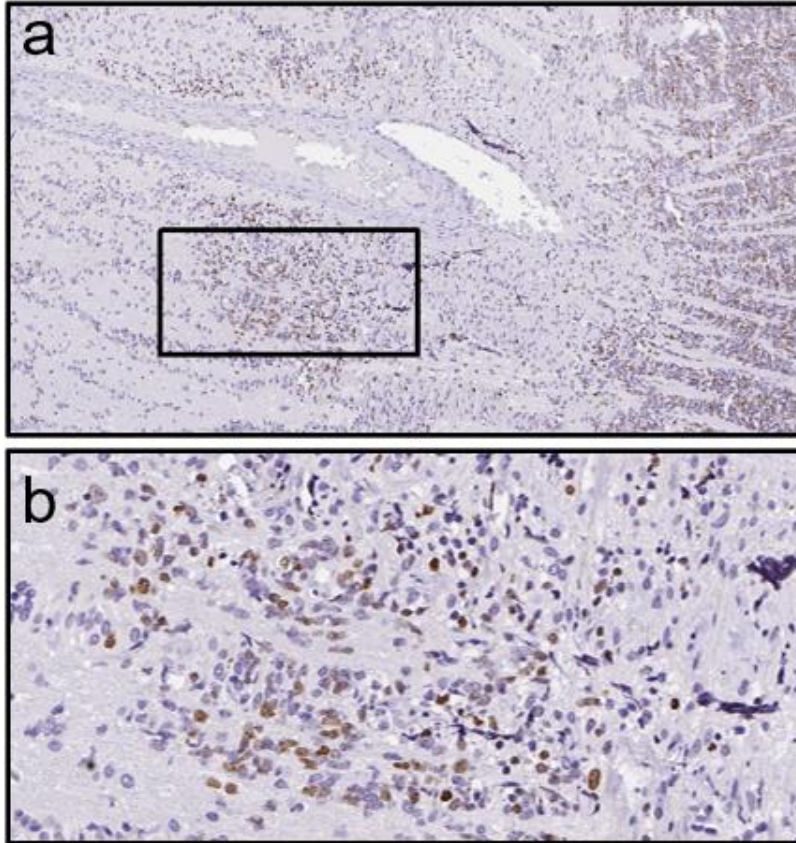


Figura 15. Expresión de Ki-67 (coloración marrón) a) en células tumorales que invaden el nervio óptico 5x y b) ampliación del recuadro marcado a 20x. Caso 11.

Expresión de NGFR

El Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso (NGFR) se expresa principalmente en prolongaciones celulares de las neuronas (axones y neuritas) de la retina no neoplásica, así como en los axones del nervio óptico (Figura 16).

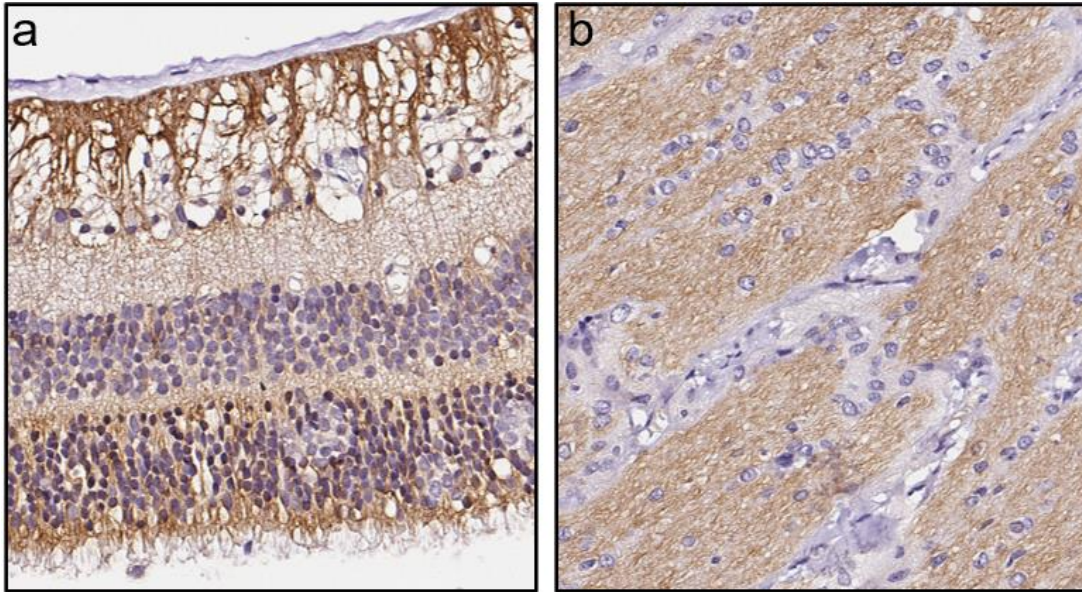


Figura 16. Expresión de NGFR (coloración marrón) en células de a) la retina no neoplásica y b) el nervio óptico región post laminar. Caso 5 aumento 20x.

Dentro del tumor viable, así como en las áreas perinecroticas no se observa expresión de la proteína NGFR en células neoplásicas ni en células no neoplásicas. En escasas áreas excepcionales que se encuentran cercanas a la retina no neoplásica, se observan algunas prolongaciones celulares inmunoteñidas (Figura 17).

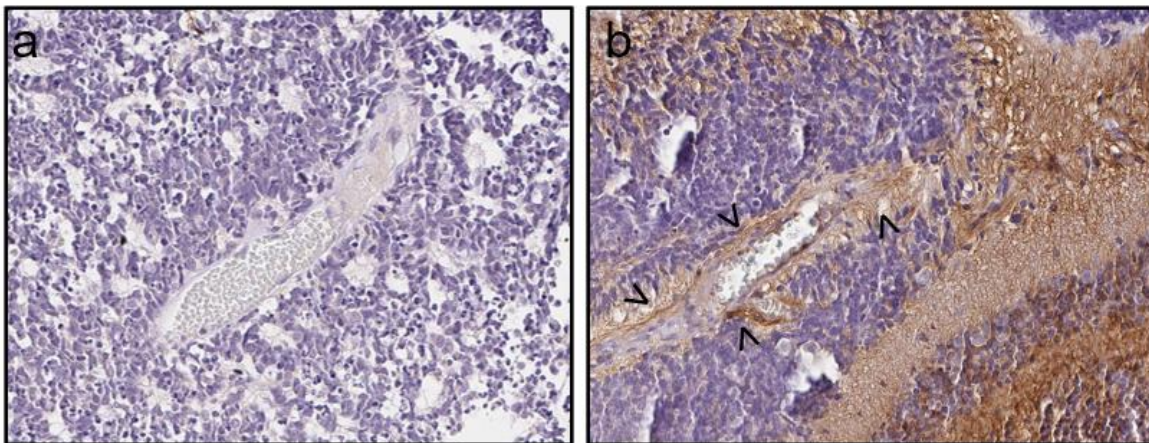


Figura 17. a) No se observa expresión de NGFR dentro del tumor viable; b) solo en áreas excepcionales cercanas a la retina no neoplásica hay prolongaciones celulares positivas (coloración marrón, punta de flecha). Caso 2, amplificación 20x

7.3 Análisis histopatológico

Este análisis se basó primeramente en la búsqueda de células Nestina+, SOX2+, Ki-67+, NGFR+ tomando como punto de referencia su relación con la vasculatura intratumoral en las zonas de interés 1. Tumor adyacente a la retina, 2. Tumor central y 3. Tumor periférico (Figura 18) descritas en materiales y métodos, considerando los hallazgos reportados sobre la ubicación de las CM en médula ósea y otros tipos de cáncer.

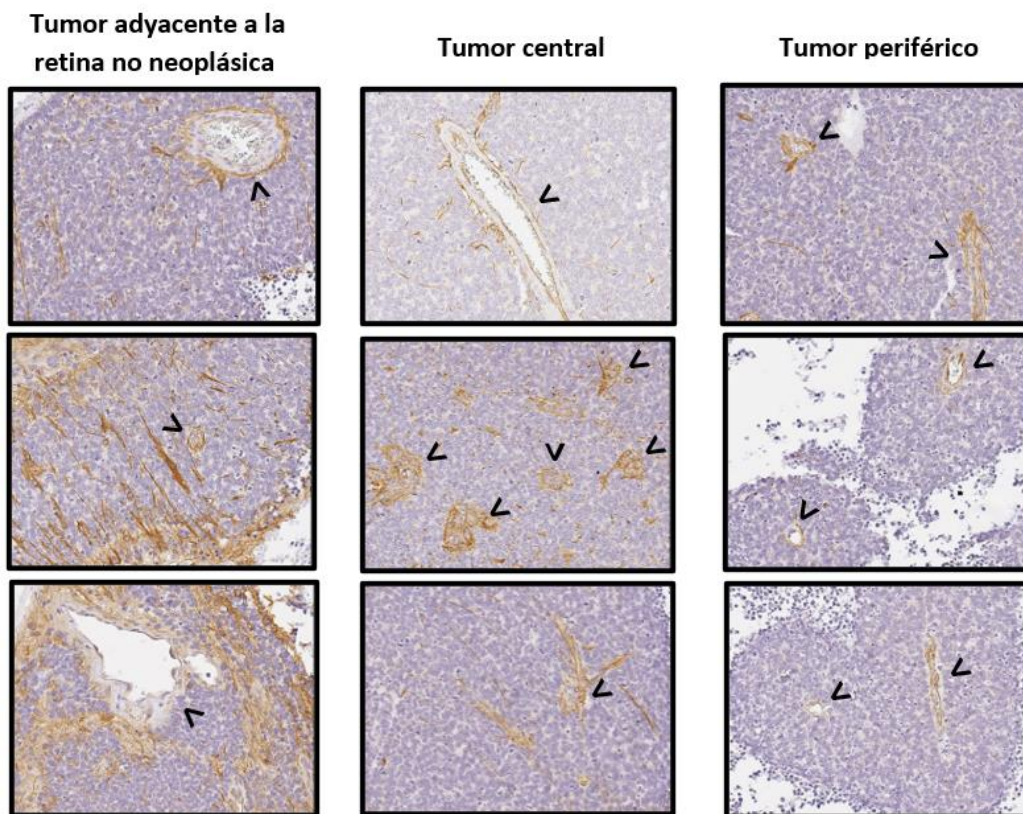


Figura 18. Identificación de vasculatura tumoral (punta de flecha) en ejemplos de zonas de interés. Caso 4, inmunotinción con anticuerpo anti Nestina, aumento 20x.

Al determinar las cuatro zonas de interés por triplicado en las cuatro inmunotinciones de cada caso (Figura 19 y Anexo 2), se obtuvieron alrededor de 2304 observaciones.

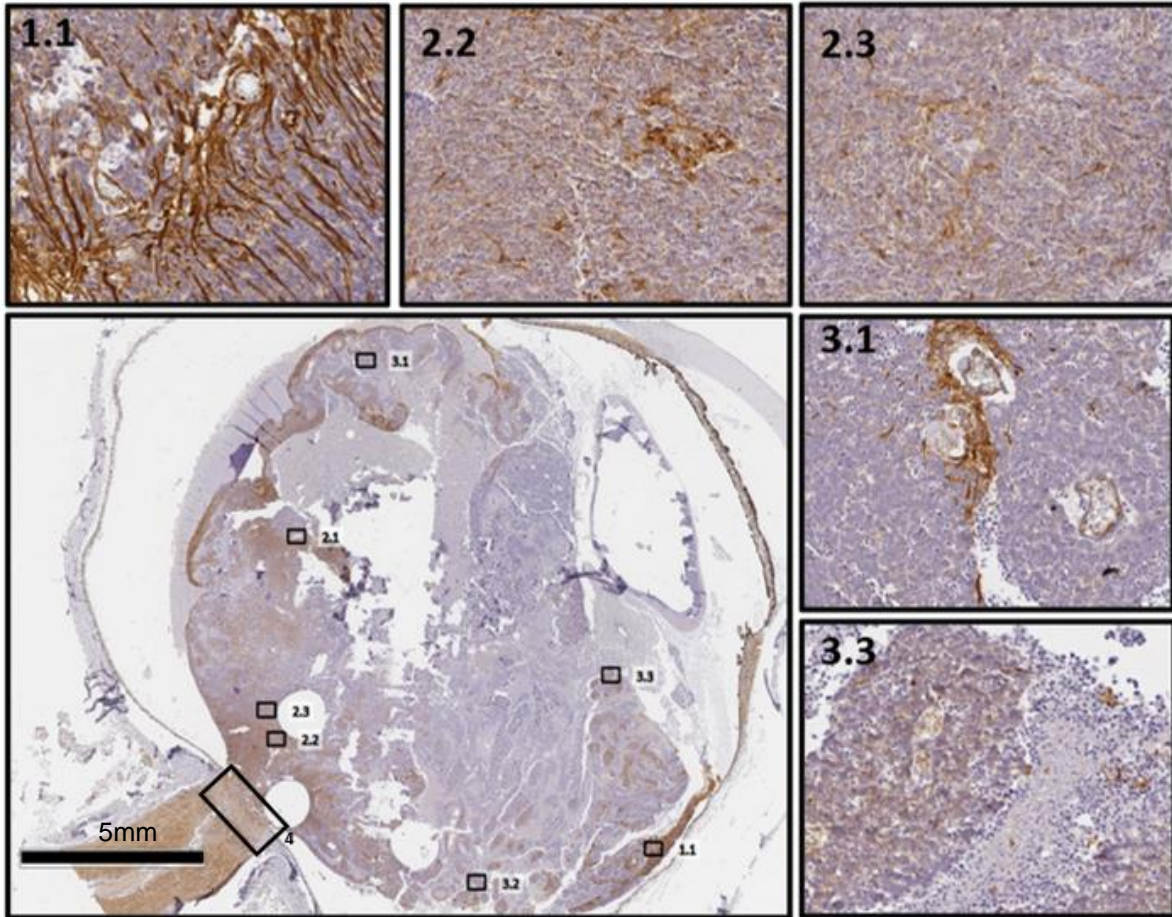


Figura 19. Fotografía panorámica del globo ocular para la selección de las zonas de interés. Aumentos representativos: 1.1 Tumor adyacente la retina no neoplásica; 2.2 y 2.3 Centro de tumor viable; 3.1 y 3.3 Áreas perinecroticas. Caso 9 inmunotinción de Nestina, barra=5mm, amplificación 20x.

Al realizar un análisis comparativo entre las mismas zonas con los cuatro diferentes marcadores, se observa un posible patrón de presencia de células Nestina+ perivasculares que revelan estructuras filamentosas y arborescentes correspondientes a una malla de extensiones celulares y de células SOX2+, cuya tinción es nuclear que también se encuentran en las células alrededor de los vasos sanguíneos. En la Figura 20 se muestran ejemplos de dicha relación en una misma zona del centro del tumor en distinto plano. Este patrón no se repite en todos los vasos sanguíneos del tumor, principalmente en áreas perinecroticas (Figura 21).

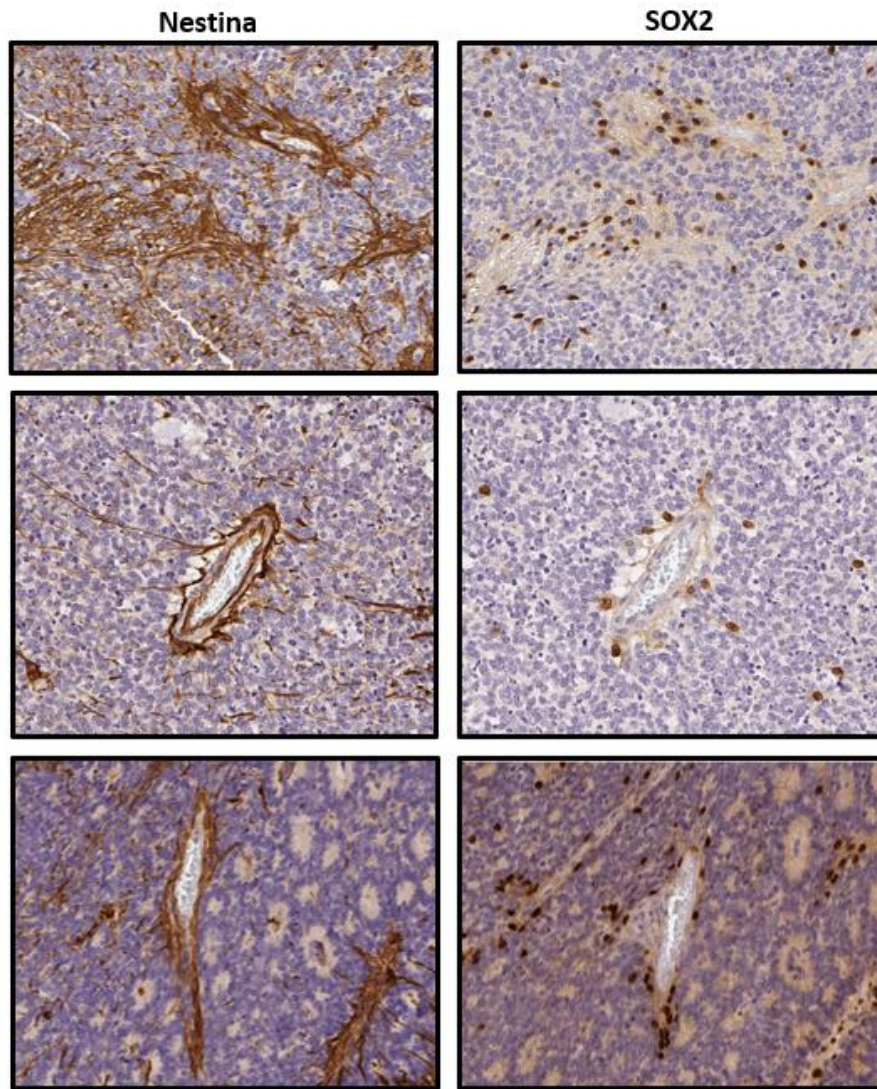


Figura 20. Expresión de Nestina en prolongaciones celulares alrededor de vasos sanguíneos y expresión de SOX2 en núcleos celulares en la misma región 20x.

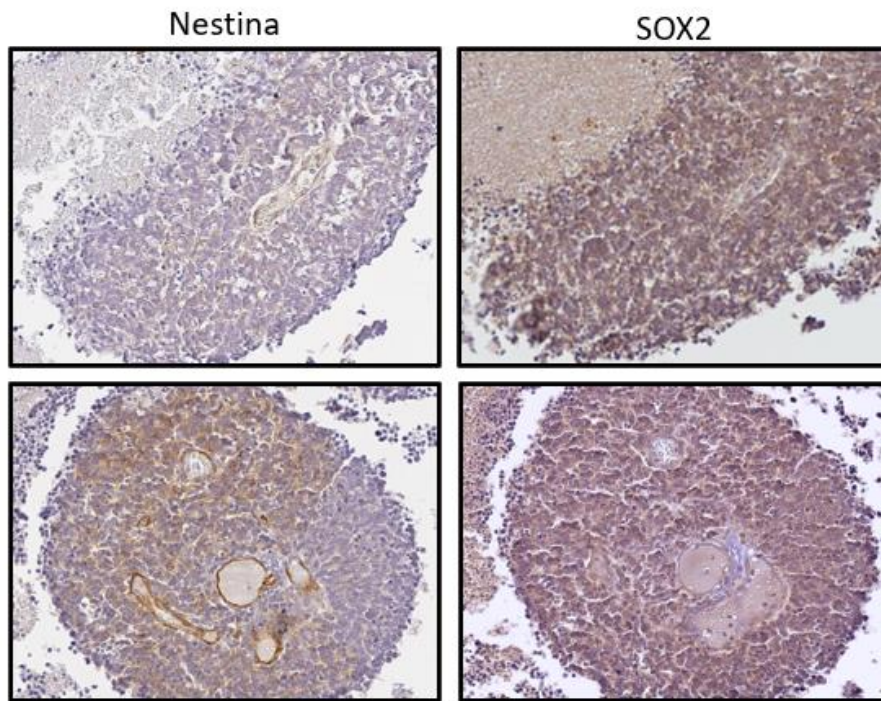


Figura 21. Vasos sanguíneos de áreas periféricas del tumor en los que no se observan células Nestina+ ni células SOX2+ alrededor de los vasos sanguíneos. Amplificación 20x.

Además, se observa que en las zonas perivasculares teñidas por Nestina y SOX2, no se expresa el marcador de proliferación celular Ki-67 en todas las células que se encuentran alrededor del vaso (Figura 22).

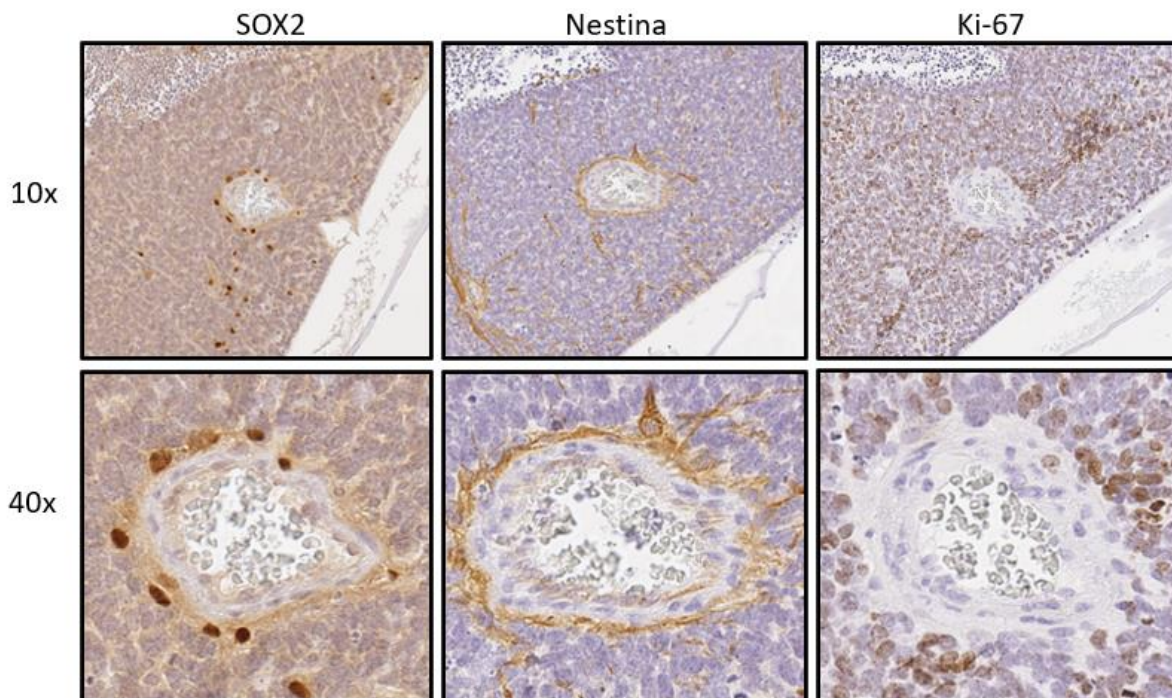


Figura 22. Contraste entre las expresión de células SOX2+, Nestina+ y Ki-67-, región adyacente a la retina no neoplásica

Se capturó una fotografía de cada una de las zonas seleccionadas y la información observada acerca de los posibles patrones de expresión se recopiló caso por caso para cada una de las inmunotinciones en formatos como el que se ilustra en la Tabla 4 para su análisis e interpretación.

Tabla 4. Formato para el registro de datos de las observaciones utilizado para cada uno de los anticuerpos.

Caso		Marcador				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1					
	1.2					
	1.3					
Tumor central	2.1					
	2.2					
	2.3					
Tumor periférico	3.1					
	3.2					
	3.3					
Nervio óptico	4.1					
	4.2					
	4.3					

Los formatos se llenaron con 1 (presencia) y 0 (ausencia), puntuaciones que fueron determinadas por la patóloga María de Lourdes Cabrera Muñoz, en cuatro campos principales:

1. Células tumorales perivasculares
2. Células no tumorales perivasculares
3. Células tumorales no perivasculares
4. Células no tumorales no perivasculares

Además de señalar de que tipo de vaso sanguíneo se encuentra en la región a analizar.

En la Tabla 5 se presenta un ejemplo de los datos obtenidos de las observaciones de las inmunotinciones, para el Caso 1 inmunotinción con anti Nestina, para la zona 1. Tumor adyacente a la retina no neoplásica hay células perivasculares tumorales Nestina+ en 3/3 áreas seleccionadas, únicamente en 1/3 áreas hay células perivasculares no tumorales Nestina+, también en 3/3 áreas hay células no perivasculares tumorales y no tumorales Nestina+. En la zona 1 se encuentran arterias y capilares. De esta forma se pueden interpretar cada uno de los campos de las tablas para cada anticuerpo utilizado.

Tabla 5. Ejemplo de puntuación asignada al Caso 1, inmunotinción con anti Nestina

Caso 1		Nestina				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	1	0	1	1	Arteriola
	1.2	1	1	1	1	Capilar
	1.3	1	0	1	1	Capilar
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Arteriola
	2.2	0	1	1	1	Capilar
	2.3	0	1	0	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	1	0	0	0	Capilar
	3.2	1	0	0	1	Capilar
	3.3	1	0	0	1	Arteriola
Nervio óptico	4.1	0	1	0	1	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Capilar

Debido a diferentes circunstancias como la fijación del tejido y las diferentes profundidades de cada corte histológico, en algunos casos no todas las zonas de interés fueron encontradas, en los formatos de recopilación de datos la o las áreas faltantes fueron llenadas con NV (No Valorable) (Tabla 6), por lo que se realizó un análisis de calidad de las muestras (Figura 23) y se determinó que para este análisis más del 70% de todas las muestras fueron valorables.

Tabla 6. Ejemplo de Caso con zonas de tejido no valorables. Caso 4. NV: Áreas no valorables.

Caso 4		Nestina				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1	0	1	Capilar
	1.2	1	1	1	1	Capilar
	1.3	0	1	1	1	Capilar
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Capilar
	2.2	0	1	0	1	Capilar
	2.3	0	1	0	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	0	0	Capilar
	3.2	0	1	0	1	Capilar
	3.3	0	1	0	1	Capilar
Nervio óptico	4.1	NV	NV	NV	NV	NV
	4.2	NV	NV	NV	NV	NV
	4.3	0	1	0	1	Arteria y capilar

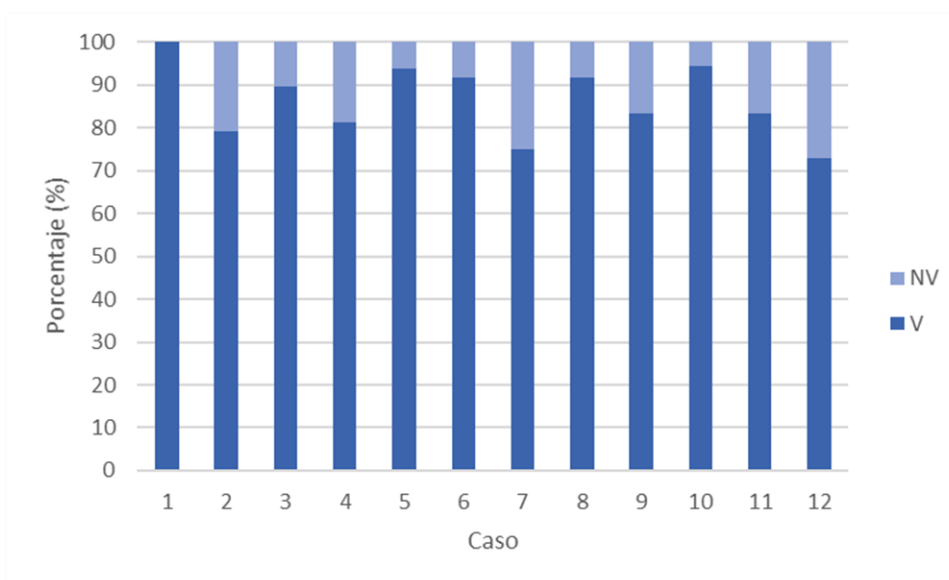


Figura 23. Calidad de muestras por caso. NV: porcentaje de áreas de interés no valorables y V: porcentaje de áreas de interés valorables.

Una vez que se determinó el puntaje de cada región, se observó que hay células positivas para Nestina, SOX2 en regiones perivasculares, así como en regiones no perivasculares, es decir, hay expresión de estas proteínas en células que no se encuentran rodeando los vasos sanguíneos, sin embargo, la cantidad de las células SOX2+ que no están perivascularmente es menor que las que si se encuentran rodeando a los vasos sanguíneos.

Para la evaluación de la identificación y localización de las células mesenquimales, se tomaron en cuenta los siguientes criterios basados en la literatura:

1. Células con localización perivascular
2. Células no tumorales positivas para Nestina
3. Células no tumorales positivas para NGFR
4. Células no tumorales positivas para SOX2
5. Células no tumorales negativas para Ki-67

Para lograr un acercamiento cuantitativo a la evaluación de las inmunotinciones, se sumó el puntaje obtenido del tumor adyacente a la retina no neoplásica (zona 1), tumor central (zona 2), tumor periférico (zona 3) y región pre laminar del nervio óptico (zona 4.1) de las regiones perivasculares, y se obtuvo el promedio respecto a las zonas valorables obteniendo la siguiente tabla del porcentaje de zonas con células perivasculares no tumorales positivas para Nestina, SOX2 y Ki-67 (Tablas 7 y 8).

Tabla 7. Ejemplo de porcentaje de áreas positivas para Nestina respecto a las áreas valorables. Caso 1.

Caso 1		Nestina	
Región	ID de región	Células perivasculares	
		Tumorales	No tumorales
Tumor adyacente a retina	1.1	1	0
	1.2	1	1
	1.3	1	0
Tumor central	2.1	0	1
	2.2	0	1
	2.3	0	1
Tumor periférico	3.1	1	0
	3.2	1	0
	3.3	1	0
Nervio óptico	4.1	0	1
	Suma de puntaje	6	5
	Áreas valorables	10	10
	Porcentaje	60	50

Tabla 8. Ejemplo de porcentaje de áreas positivas para Nestina respecto a las áreas valorables. Caso 4.

Caso 1		Nestina	
Región	ID de región	Células perivasculares	
		Tumorales	No tumorales
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1
	1.2	1	1
	1.3	0	1
Tumor central	2.1	0	1
	2.2	0	1
	2.3	0	1
Tumor periférico	3.1	0	1
	3.2	0	1
	3.3	0	1
Nervio óptico	4.1	NV	NV
	Suma de puntaje	1	9
	Áreas valorables	9	9
	Porcentaje	11	100

Finalmente, el porcentaje de todos los casos se recopiló en la Tabla 9 que tiene una escala de color de verde (100%) a rojo (0%).

Tabla 9. Porcentaje de zonas perivasculares positivas para Nestina, NGFR y Ki-67 en escala de color. Verde: valor más alto (100%) a rojo: valor más bajo (0%).

Caso	Nestina % positivos		SOX2 % positivos		Ki67 % positivos	
	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral
1	60.0	50.0	90.0	90.0	90.0	10.0
2	0.0	66.7	0.0	33.3	100.0	0.0
3	10.0	100.0	60.0	80.0	100.0	33.3
4	11.1	100.0	33.3	0.0	100.0	0.0
5	40.0	90.0	60.0	90.0	80.0	10.0
6	12.5	87.5	77.8	55.6	80.0	10.0
7	0.0	100.0	42.9	85.7	42.9	0.0
8	11.1	88.9	33.3	77.8	22.2	0.0
9	0.0	25.0	25.0	62.5	100.0	0.0
10	66.7	77.8	66.7	88.9	88.9	11.1
11	62.5	87.5	62.5	75.0	100.0	0.0
12	42.9	85.7	85.7	100.0	100.0	0.0

Nota: La inmunotinción de NGFR no fue tomada en cuenta para este análisis debido a que la tinción fue negativa en el tumor.

En la Tabla 9 se observa en la escala de color de verde a rojo que la expresión de Nestina y SOX2 en células no tumorales tiende a ser en la mayoría de los casos en las regiones perivasculares y que Ki-67 no se expresa en células no tumorales perivasculares.

En la Tabla 10 se determina el porcentaje de células positivas perivasculares en el nervio óptico en las tres regiones (pre laminar, laminar y post laminar) de todos los casos en una escala de color, donde se observa que en el nervio óptico también hay células Nestina y SOX2 positivas, pero no son células con proliferación activa.

Tabla 10. Porcentaje de zonas perivasculares del nervio óptico positivas para Nestina, NGFR y Ki-67 en escala de color. Verde: valor más alto (100%) a rojo: valor más bajo (0%).

Caso	Nestina % positivos		SOX2 % positivos		Ki67 % positivos	
	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral
1	33.3	100.0	66.7	100.0	0.0	33.3
2	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0
3	33.3	100.0	33.3	66.7	33.3	100.0
4	0.0	100.0	0.0	100.0	NV	NV
5	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0
6	0.0	100.0	NV	NV	0.0	33.3
7	33.3	100.0	100.0	100.0	33.3	33.3
8	0.0	100.0	66.7	100.0	0.0	0.0
9	0.0	33.3	33.3	100.0	33.3	0.0
10	0.0	66.7	33.3	66.7	0.0	0.0
11	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7
12	50.0	66.7	100.0	100.0	100.0	0.0

8 DISCUSIÓN

Para tratar de identificar a las células mesenquimales y con esto probablemente el nicho de las células troncales dentro del retinoblastoma, se utilizaron dos marcadores celulares que se han empleado en otros estudios: Nestina y NGFR (CD271). Además, se incluyó el marcador SOX2 porque es un factor de transcripción asociado a células troncales.

Los resultados cualitativos indican que la inmunotinción de la proteína Nestina se expresa en células de la retina no neoplásica como ya se ha descrito con anterioridad (75) y en distintas áreas del tumor, principalmente en el tumor central y en el tumor adyacente a la retina no neoplásica. De forma particular, la inmunotinción revela estructuras celulares filamentosas y arborescentes, y en algunos casos se pueden observar cuerpos celulares, que se encuentran rodeando a la vasculatura del tumor, la expresión de Nestina ya se ha reportado en tumores cerebrales de niños (76), osteosarcoma (77), melanoma (78), entre otros.

Dentro de la retina no neoplásica también se observa la presencia de células SOX2 positivas, principalmente en la capa nuclear interna que corresponde típicamente a los núcleos de las células de Müller (glía especializada) y tres tipos de neuronas: bipolares, horizontales y amácrinas (79). La expresión del factor de transcripción SOX2 recientemente ha sido reportada como marcador de CSC ya que se ha observado una población de células SOX2 positivas propagan el desarrollo del meduloblastoma (80). La inmunotinción de SOX2 en retinoblastoma permite observar de forma clara los núcleos de las células que se encuentran en el tumor adyacente a la retina no neoplásica, tumor central y en algunas de las áreas periféricas del tumor, con arreglos particulares alrededor de los vasos sanguíneos al igual que las CM (72).

El análisis cualitativo de la expresión de Nestina y SOX2 indica una posible asociación entre las células Nestina+ y las células SOX2+ que se encuentran rodeando la vasculatura en retinoblastoma. Este fenómeno se identifica principalmente en el tumor adyacente a la retina no neoplásica y el centro del tumor viable de las regiones analizadas de los 12 casos. En el tumor periférico este patrón no es consistente.

El análisis cuantitativo también muestra la tendencia de que la mayoría de las regiones perivasculares son células no tumorales positivas para Nestina y Sox2, y negativas para Ki-67.

La expresión del factor de transcripción Ki-67 muestra la capacidad proliferativa del mayor porcentaje de las células tumorales, sin embargo, no se expresa en todas las células cercanas alrededor de la vasculatura (Figura 14), lo que apoya a la teoría de la presencia de células con características troncales, ya que estas tienen tasas proliferativas bajas (81).

En el análisis cuantitativo sobre la expresión de los marcadores en el nervio óptico muestra la presencia de células que expresan Nestina y Sox2 sin embargo, la mayoría de las regiones son negativas para Ki-67, es decir, no son células propias del tumor, a excepción de los casos del grupo de alto riesgo de metástasis con infiltración de células tumorales en los diferentes segmentos del nervio óptico, por lo que es posible que el nervio óptico albergue estas células de forma normal y correspondan a células gliales.

Finalmente, la inmunotinción de NGFR únicamente se observa en prolongaciones celulares de las neuronas ganglionares principalmente de la retina no neoplásica y alrededor de escasos vasos sanguíneos que se encuentran especialmente cercanos a la retina no neoplásica por lo que podrían considerarse como parte de ella, ya que se ha observado que NGFR se expresa en células gliales y fibras neurales de la retina (82). La inmunotinción de NGFR no se expresa en estructuras celulares del tumor similares a las que se tiñen con Nestina.

La intención de incluir casos de alto y bajo riesgo metastásico fue determinar si existe o no una relación entre la presencia de las células mesenquimales y la agresividad del tumor, sin embargo, no se observó algún patrón de diferencia entre de los dos grupos (ver Anexo 3) pero la asociación células Nestina+ y Sox2+ en regiones perivasculares si es consistente en regiones vitales del tumor.

Los resultados presentados sugieren la localización del nicho de células troncales, la relevancia de este trabajo es que contribuye a la determinación del nicho de origen del retinoblastoma y este conocimiento puede contribuir al mejoramiento de terapias dirigidas, ya que como se ha mencionado, la presencia de células troncales dentro de otros tumores malignos se relaciona a un mayor

riesgo de metástasis, resistencia a las terapias y recaídas debido a que las terapias típicas van dirigidas principalmente a células tumorales y no precisamente a células troncales.

Limitantes

Una de las principales limitantes de este estudio fue la dificultad de obtención de cortes histológicos secuenciales debido a la pérdida durante el proceso de inmunotinción y el agotamiento de los bloques de los casos lo que dificultó la localización de las mismas regiones en cada una de las inmunotinciones. La estrategia que se propone para resolver este problema es la realización de dos o más inmunotinciones en el mismo corte histológico (inmunotinciones de colocalización). Las inmunotinciones de colocalización consisten en utilizar dos enzimas reportadoras distintas asociadas al anticuerpo secundario, entre las más comunes se encuentra la peroxidasa que reacciona con diaminobenzidina y peróxido de hidrógeno dando un precipitado color marrón; y la fosfatasa alcalina que al ser activada se generan fenoles que reaccionan con sales de Diazonio que pueden dar coloraciones azules o rojizas (83) obteniendo así dos colores distintos correspondientes a dos marcadores de interés. También se pueden utilizar otras técnicas como inmunofluorescencia.

9 CONCLUSIÓN

El hallazgo más importante para reportar de este estudio es la presencia de células Nestina positivas con morfología arborescente dentro del retinoblastoma con un arreglo especial rodeando vasos sanguíneos.

La localización de las células que expresan Nestina puede estar asociada a la localización de las células que expresan el marcador de células troncales del cáncer SOX2 y al encontrarse estos marcadores alrededor de la vasculatura se sugiere una aproximación de la ubicación al nicho de origen del tumor.

En este estudio considerando 12 casos, no se observó una diferencia de expresión de células Nestina+ con el riesgo histológico de metástasis en retinoblastoma.

El Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso es un marcador que no se expresa en las células tumorales y no tumorales en nuestra serie, por lo tanto, no fue de utilidad para identificar células mesenquimales en retinoblastoma.

10 PERSPECTIVAS

Continuar con la búsqueda y determinación de las células mesenquimales dentro del retinoblastoma utilizando otros marcadores reportados para la identificación de células mesenquimales.

Utilizar otras técnicas para detectar la expresión de los marcadores como tinciones dobles para colocalización por Inmunohistoquímica y/o emplear técnicas de inmunofluorescencia.

11 REFERENCIAS

1. Kreso A, Dick JE. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2014;14(3):275–91. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
2. Tirino V, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Papaccio F, Fazioli F, et al. Human primary bone sarcomas contain CD133+ cancer stem cells displaying high tumorigenicity in vivo. *FASEB J*. 2011;25(6):2022–30.
3. Friedenstein AJ, Petrakova KV, Kurolesova AI, Frolova GP. Heterotopic transplants of bone marrow. *Transplantation* [Internet]. marzo de 1968 [citado el 23 de agosto de 2019];6(2):230–47. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5654088>
4. Boxall SA, Jones E. Markers for Characterization of Bone Marrow Multipotential Stromal Cells. *Stem Cells Int*. 2012;2012:1–12.
5. Keating A. Mesenchymal stromal cells: New directions. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2012;10(6):709–16. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.05.015>
6. Huang S, Xu L, Sun Y, Wu T, Wang K, Li G. An improved protocol for isolation and culture of mesenchymal stem cells from mouse bone marrow. *J Orthop Transl* [Internet]. el 1 de enero de 2015 [citado el 23 de agosto de 2019];3(1):26–33. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214031X14000850>
7. Soundararajan M, Kannan S. Fibroblasts and mesenchymal stem cells: Two sides of the same coin? *J Cell Physiol*. 2018;233(12):9099–109.
8. Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA, Orellana MD, Freitas MCC, et al. Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol* [Internet]. mayo de 2008 [citado el 23 de agosto de 2019];36(5):642–54. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18295964>
9. Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen C-W, Corselli M, Park TS, et al. A Perivascular Origin for Mesenchymal Stem Cells in Multiple Human Organs. *Cell Stem Cell* [Internet]. el 11 de septiembre de 2008 [citado el 23 de agosto de 2019];3(3):301–13. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590908003378?via%3Dihub>
10. Nombela-Arrieta C, Ritz J, Silberstein LE. The elusive nature and function of mesenchymal stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2011 [citado el 25 de agosto de 2019];12(2):126–31. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21253000>
11. Farrington-Rock C, Crofts ; N J, Doherty ; M J, Ashton ; B A, Griffin-Jones ; C, Canfield ; A E. Chondrogenic and Adipogenic Potential of Microvascular Pericytes. 2004 [citado el 25 de agosto de 2019]; Disponible en: <http://www.circulationaha.org>
12. Feng J, Mantesso A, De Bari C, Nishiyama A, Sharp PT. Dual origin of mesenchymal stem cells contributing to organ growth and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108(16):6503–8.

13. Grisendi G, Annerén C, Cafarelli L, Sternieri R, Veronesi E, Cervo GL, et al. GMP-manufactured density gradient media for optimized mesenchymal stromal/stem cell isolation and expansion. *Cytotherapy*. 2010;12(4):466–77.
14. Castro-Manreza ME, Montesinos JJ. Immunoregulation by mesenchymal stem cells: Biological aspects and clinical applications. *J Immunol Res*. 2015;2015.
15. Cuiffo BG, Karnoub AE. Mesenchymal stem cells in tumor development: Emerging roles and concepts. 2012;6(3):220–30.
16. Rojewski MT, Weber BM, Schrezenmeier H. Phenotypic characterization of mesenchymal stem cells from various tissues. Vol. 35, *Transfusion Medicine and Hemotherapy*. 2008. p. 168–84.
17. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F., Krause DS, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* [Internet]. 2006 [citado el 23 de agosto de 2019];8(4):315–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16923606>
18. Jones EA, English A, Kinsey SE, Straszynski L, Emery P, Ponchel F, et al. Optimization of a flow cytometry-based protocol for detection and phenotypic characterization of multipotent mesenchymal stromal cells from human bone marrow. Vol. 70, *Cytometry Part B - Clinical Cytometry*. 2006. p. 391–9.
19. Álvarez-Viejo M, Menéndez-Menéndez Y, Otero-Hernández J, Roma de. CD271 as a marker to identify mesenchymal stem cells from diverse sources before culture. *World J Stem Cells* [Internet]. el 26 de marzo de 2015 [citado el 7 de marzo de 2020];7(2):470–6. Disponible en: <http://www.wjgnet>.
20. Quirici N, Soligo D, Bossolasco P, Servida F, Lumini C, Deliliers GL. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells by anti-nerve growth factor receptor antibodies. *Exp Hematol*. 2002;30(7):783–91.
21. Jones EA, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, et al. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum* [Internet]. el 1 de diciembre de 2002 [citado el 7 de marzo de 2020];46(12):3349–60. Disponible en: <http://doi.wiley.com/10.1002/art.10696>
22. Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schutz B, Ehinger M, et al. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood* [Internet]. el 12 de mayo de 2011 [citado el 25 de agosto de 2019];117(19):5067–77. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21415267>
23. Schipani E, Kronenberg HM. Adult mesenchymal stem cells. En: Chien KR, editor. *Stem Book* [Internet]. 2009 [citado el 7 de marzo de 2020]. p. 1–11. Disponible en: <http://www.stembook.org>.
24. Méndez-Ferrer S, Michurina T, Ferraro F, Mazloom AR, MacArthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells from a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(829):834.
25. Michalczyk K, Ziman M. Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol*. 2005;20(2):665–71.
26. Xie L, Zeng X, Hu J, Chen Q. Characterization of Nestin, a Selective Marker for Bone Marrow Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int*.

- 2015;2015:1–9.
27. Liu S, Ginestier C, Ou SJ, Clouthier SG, Patel SH, Monville F, et al. Breast cancer stem cells are regulated by mesenchymal stem cells through cytokine networks. *Cancer Res.* 2011;71(2):614–24.
 28. Yang Y, Otte A, Hass R. Human mesenchymal stroma/stem cells exchange membrane proteins and alter functionality during interaction with different tumor cell lines. *Stem Cells Dev.* 2015;24(10):1205–22.
 29. Juárez Aguilar FG. Estudio sistemático de las células estromales mesenquimales en biopsias de médula ósea de pacientes con síndrome mielodisplásico y leucemias agudas. Tesis de Especialidad. México D. F. Universidad Nacional Autónoma de México; 2016.
 30. Flores-Figueroa E, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest.* 2012;92(9):1330–41.
 31. Maffey A, Storini C, Diceglie C, Martelli C, Sironi L, Calzarossa C, et al. Mesenchymal stem cells from tumor microenvironment favour breast cancer stem cell proliferation, cancerogenic and metastatic potential, via ionotropic purinergic signalling. *Sci Rep [Internet].* 2017;7(1):1–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-13460-7>
 32. Lanza R. “Stemness”: Definitions, Criteria, and Standards. En: *Handbook of stem cells.* Estados Unidos: ELSEVIER; 2004. p. XXV–XXX.
 33. Mayani H, Lisker R. México, las células troncales y la clonación. *Gac Med Mex [Internet].* 2007 [citado el 26 de febrero de 2019];143(1):1–4. Disponible en: www.anmm.org.mx
 34. Chagastelles PC, Nardi NB. Biology of stem cells: an overview. *Kidney Int Suppl [Internet].* septiembre de 2011 [citado el 18 de marzo de 2019];1(3):63–7. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2157171615310145>
 35. Ashan T, Doyle AM, Nerem RM. *Stem Cell Research.* Princ Regen Med. 2008;28–47.
 36. Los MJ, Skubis A, Ghavami S. *Stem Cells [Internet].* Vols. 12–15, *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine.* Elsevier Inc.; 2019. 5–16 p. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812258-7.00002-2>
 37. Kalra K, Tomar PC. *Stem Cell: Basics, Classification and Applications.* Am J Phytomedicine Clin Ther [Internet]. 2014;2(7):919–30. Disponible en: <http://www.imedpub.com/abstract/stem-cell-basics-classification-andrnapplications-10382.html>
 38. Dzierzak E, Bigas A. Blood Development: Hematopoietic Stem Cell Dependence and Independence. *Cell Stem Cell [Internet].* 2018;22(5):639–51. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.04.015>
 39. Szade K, Gulati GS, Chan CKF, Kao KS, Miyanishi M, Marjon KD, et al. Where Hematopoietic Stem Cells Live: The Bone Marrow Niche. *Antioxidants Redox Signal.* 2018;29(2):191–204.
 40. Krebsbach PH, Kuznetsov SA, Bianco P, Gehron Robey P. Bone marrow stromal cells: Characterization and clinical application. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(2):165–81.

41. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* [Internet]. 1997;3(7):731–7. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9585240>
42. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nat Rev Cancer*. 2001;414(12):105–11.
43. Pützer BM, Solanki M, Herchenröder O. Advances in cancer stem cell targeting: How to strike the evil at its root. *Adv Drug Deliv Rev*. 2017;1(120):89–107.
44. López-Gómez M, Casado E, Muñoz M, Alcalá S, Moreno-Rubio J, D’Errico G, et al. Current evidence for cancer stem cells in gastrointestinal tumors and future research perspectives. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2016;107:54–71.
45. Greaves M, Maley CC. CLONAL EVOLUTION IN CANCER. *Nature*. 2012;481(7381):306–13.
46. F. Quail D, J. Taylor M, Postovit L-M. Microenvironmental Regulation of Cancer Stem Cell Phenotypes. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2012;7(3):197–216.
47. Kreso A, Brien CAO, Galen P Van, Gan O, Notta F. Variable Clonal Repopulation Dynamics Influence Chemotherapy Respo Influence Chemotherapy Response in Colorectal Cancer. 2012;(December).
48. Chaffer CL, Weinberg RA. How does multistep tumorigenesis really proceed? *Cancer Discov*. 2015;5(1):22–4.
49. Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, et al. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res*. 2003;63(18):5821–8.
50. Gangeni RMR, Griffiero F, Marubbi D, Perera M, Capra MC, Malatesta P, et al. SOX2 Silencing in Glioblastoma Tumor-Initiating Cells Causes Stop of Proliferation and Loss of Tumorigenicity. *Stem Cells*. 2009;27:40–8.
51. Kamachi Y, Uchikawa M, Kondoh H. Pairing SOX off: With partners in the regulation of embryonic development. *Trends Genet*. 2000;16(4):182–7.
52. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, et al. Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*. 2007;9(6):625–35.
53. Voog J, Jones DL. Stem Cells and the Niche: A Dynamic Duo. *Cell Stem Cell* [Internet]. 2010;6(2):103–15. Disponible en: <http://www.sciencemag.org/content/306/5703/1895.short>
54. Jones DL, Wagers AJ. No place like home: Anatomy and function of the stem cell niche. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2008;9(1):11–21.
55. Kuhn NZ, Tuan RS. Regulation of stemness and stem cell niche of mesenchymal stem cells: Implications in tumorigenesis and metastasis. *J Cell Physiol*. 2010;222(2):268–77.
56. Fuchs E, Tumber T, Guasch G. Socializing with the neighbors: Stem cells and their niche. *Cell*. 2004;116(6):769–78.
57. Calabrese C, Poppleton H, Kocak M, Hogg TL, Fuller C, Hamner B, et al. A Perivascular Niche for Brain Tumor Stem Cells. *Cancer Cell*. 2007;11(1):69–82.
58. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer

- therapy resistance through WNT16B. *Nat Med.* 2012;18(9):1359–68.
59. Ridge SM, Sullivan FJ, Glynn SA. Mesenchymal stem cells: Key players in cancer progression. Vol. 16, *Molecular Cancer*. BioMed Central Ltd.; 2017.
 60. Hass R, Otte A. Mesenchymal stem cells as all-round supporters in a normal and neoplastic microenvironment. *Cell Commun Signal* [Internet]. 2012;10(26):1–13. Disponible en: *Cell Communication and Signaling*
 61. Mendoza PR, Grossniklaus HE. The Biology of Retinoblastoma. En: *Progress in molecular biology and translational science* [Internet]. 2015 [citado el 5 de febrero de 2019]. p. 503–16. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26310174>
 62. Rodriguez-Galindo C, Wilson MW, Chantada G, Qaddoumi I, Antonelli C, Leal-leal C, et al. Retinoblastoma: One World, One Vision. *Pediatrics*. 2008;122(3):763–70.
 63. Global Retinoblastoma Study Group. Global Retinoblastoma Presentation and Analysis by National Income Level. *JAMA Oncol.* 202d. C.;6(5):685–95.
 64. Rodriguez-Galindo C, Orbach DB, VanderVeen D. Retinoblastoma. *Pediatr Clin North Am.* 2015;
 65. Sun X, Kaufman P. Ki-67 : more than a proliferation marker. *Chromosoma.* 2018;127(2):175–86.
 66. Abramson DH. Retinoblastoma in the 20th century: Past success and future challenges. The Weisenfeld Lecture. *Investig Ophthalmol Vis Sci.* 2005;46(8):2684–91.
 67. Dimaras H, Corson T. Retinoblastoma, the visible CNS tumor: a review. *Physiol Behav.* 2019;97(1):29–44.
 68. Hoar RM. Embryology of the eye. *Environ Health Perspect.* 1982;Vol. 44(April):31–4.
 69. Das A V., James J, Rahnenführer J, Thoreson WB, Bhattacharya S, Zhao X, et al. Retinal properties and potential of the adult mammalian ciliary epithelium stem cells. *Vision Res.* 2005;45(13):1653–66.
 70. Zhao X, Das A V., Soto-Leon F, Ahmad I. Growth factor-responsive progenitors in the postnatal mammalian retina. *Dev Dyn.* 2005;232(2):349–58.
 71. Raguraman R, Parameswaran S, Kanwar JR, Khetan V, Rishi P, Kanwar RK, et al. Evidence of Tumour Microenvironment and Stromal Cellular Components in Retinoblastoma. *Ocul Oncol Pathol.* 2019;5(2):85–93.
 72. Garcia JR, Gombos DS, Prospero CM, Ganapathy A, Penland RL, Chévez-Barrios P. Expression of angiogenic factors in invasive retinoblastoma tumors is associated with increase in tumor cells expressing stem cell marker sox2. *Arch Pathol Lab Med.* 2015;139(12):1531–8.
 73. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(7):3983–8.
 74. Sastre X, Chantada GL, Doz F, Wilson MW, De Davila MTG, Rodríguez-Galindo C, et al. Proceedings of the Consensus Meetings from the International Retinoblastoma Staging Working Group on the pathology guidelines for the examination of enucleated eyes and evaluation of prognostic risk factors in retinoblastoma. *Arch Pathol Lab Med.* 2009;133(8):1199–202.
 75. Mayer EJ, Hughes EH, Carter DA, Dick AD. Nestin positive cells in adult

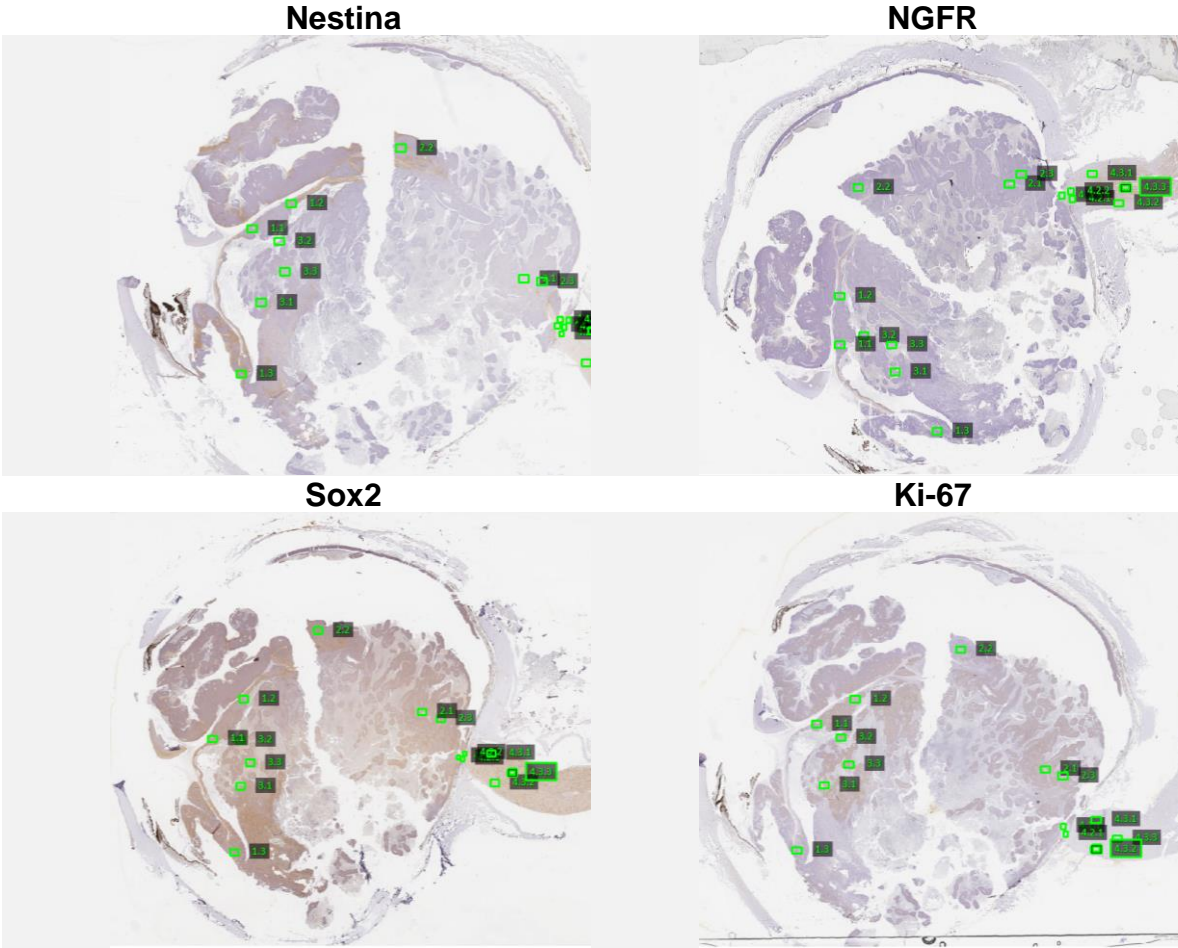
- human retina and in epiretinal membranes. *Br J Ophthalmol*. 2003;87(9):1154–8.
76. Almqvist PM, Mah R, Lendahl U, Jacobsson B, Hendson G. Immunohistochemical detection of nestin in pediatric brain tumors. *J Histochem Cytochem*. 2002;50(2):147–58.
 77. Veselska R, Hermanova M, Loja T, Chlapek P, Zambo I, Vesely K, et al. Nestin expression in osteosarcomas and derivation of nestin/CD133 positive osteosarcoma cell lines. *BMC Cancer*. 2008;8:1–8.
 78. Laga AC, Zhan Q, Weishaupt C, Jie M, Frank MH, Murphy GF. SOX2 and nestin expression in human melanoma: an immunohistochemical and experimental study. *Bone*. 2008;23(1):1–7.
 79. Lawrence J, Singhal S, Bhatia B, Keegan D, Reh T, Luthert P, et al. MIO-M1 Cells and Similar Müller Glial Cell Lines Derived from Adult Human Retina Exhibit Neural Stem Cell Characteristics. *Stem Cells*. 2007;25(1):2033–43.
 80. Vanner RJ, Remke M, Gallo M, Selvadurai HJ, Coutinho F, Lee L, et al. Quiescent Sox2 + Cells Drive Hierarchical Growth and Relapse in Sonic Hedgehog Subgroup Medulloblastoma. *Cancer Cell [Internet]*. 2014;26(1):33–47. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2014.05.005>
 81. Felthaus O, Ettl T, Gosau M, Driemel O, Brockhoff G, Reck A, et al. Cancer stem cell-like cells from a single cell of oral squamous carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 2011;407(1):28–33. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2011.02.084>
 82. Schatteman GC, Gibbs L, Lanahan AA, Claude P, Bothwell M. Expression of NGF receptor in the developing and adult primate central nervous system. *J Neurosci*. 1988;8(3):860–73.
 83. de Dios Soler M, Acosta Haab G. Guía de Inmunohistoquímica para Técnicos [Internet]. Instituto Nacional del Cáncer. 2018. 46 p. Disponible en: <http://iah.salud.gob.ar/doc/Documento203.pdf>

Anexo 1. Resumen de los anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Tipo	Localización	Información
Anti-Nestina	Monoclonal	Citoesqueleto	Nestina es una proteína de filamento intermedio utilizada como marcador neuronal, se ha reportado como identificador de Células Mesenquimales.
Anti-Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso	Monoclonal	Membrana	El Receptor del Factor de Crecimiento Nervioso es una glicoproteína que atraviesa la membrana de células ampliamente utilizada como marcador de Células Mesenquimales.
Anti-SOX2	Monoclonal	Núcleo	La proteína SOX2 es un factor de transcripción importante en el mantenimiento de la pluripotencialidad de las células troncales, es utilizado como marcador de células troncales del cáncer.
Anti-Ki-67	Monoclonal	Núcleo	Ki-67 es una proteína nuclear presente en todas las etapas del ciclo celular, es utilizada como marcador de células en estado proliferativo o células tumorales.

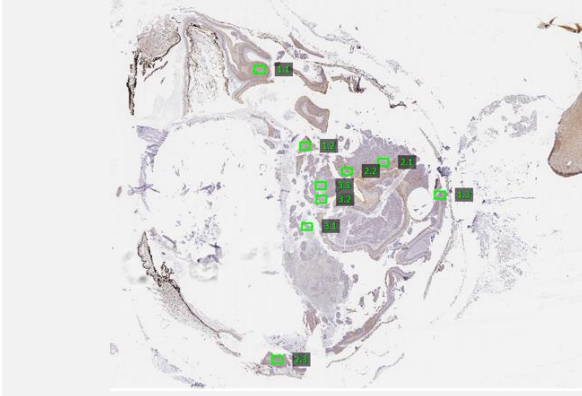
Anexo 2. Selección de zonas de interés de 12 casos de retinoblastoma evaluados.

Caso 1

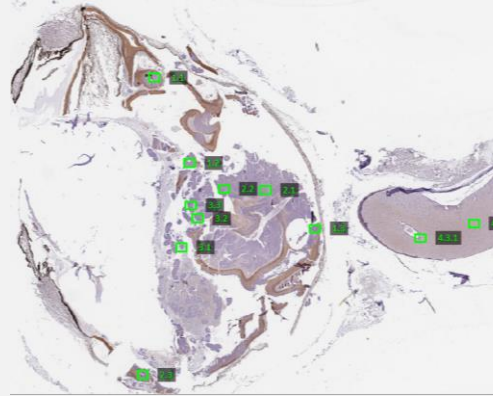


Caso 2

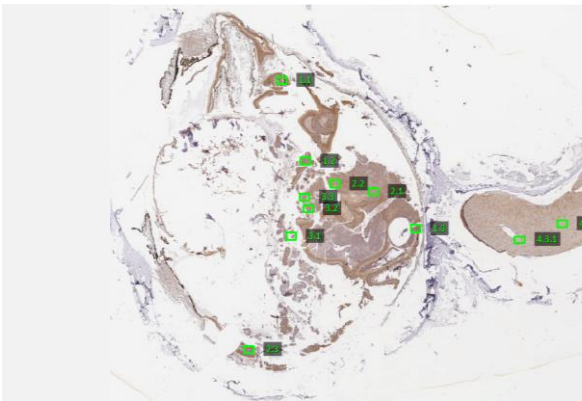
Nestina



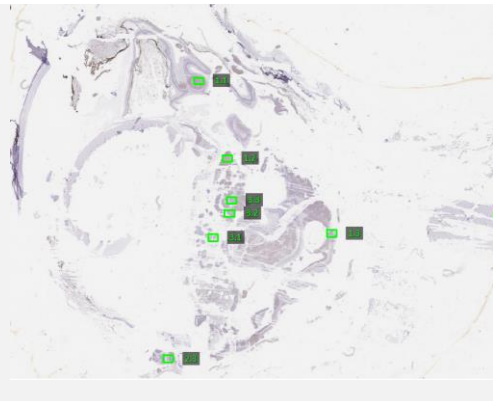
NGFR



Sox2

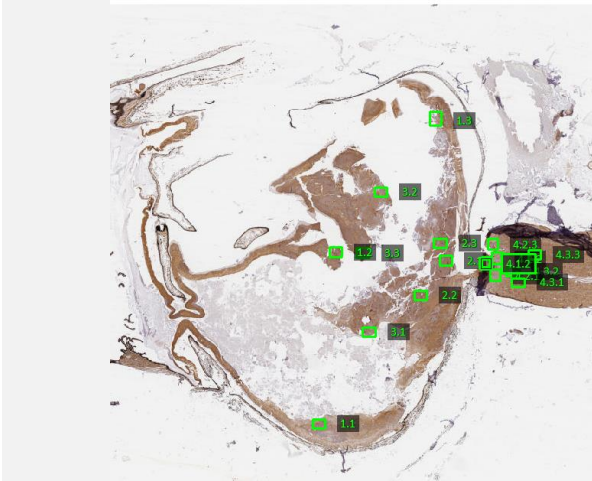


Ki-67

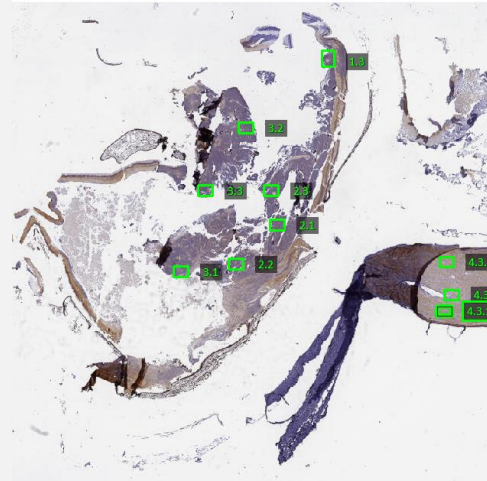


Caso 3

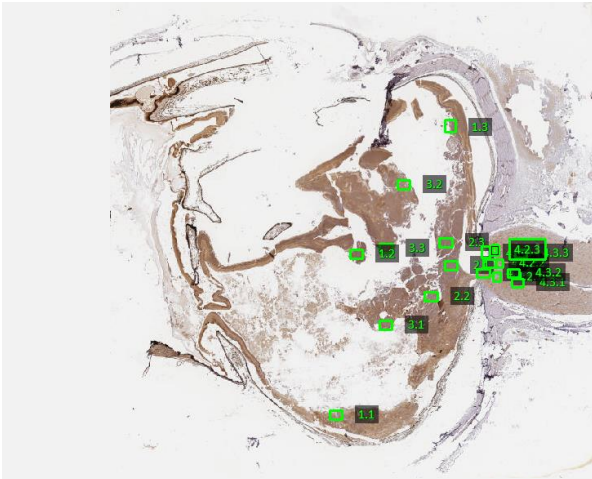
Nestina



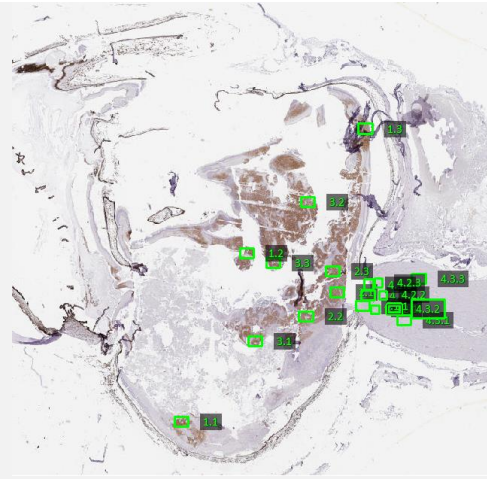
NGFR



Sox2

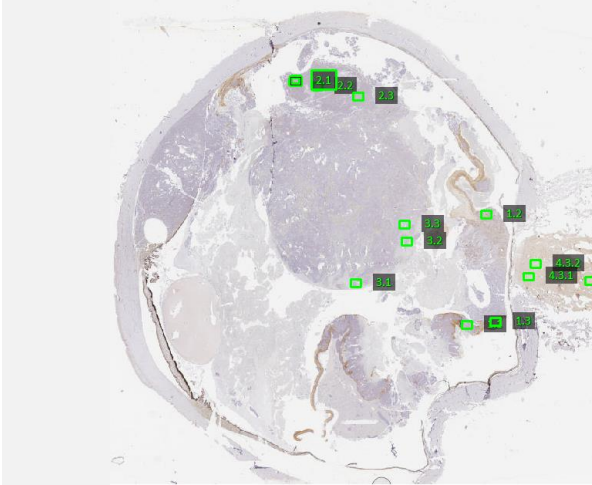


Ki-67

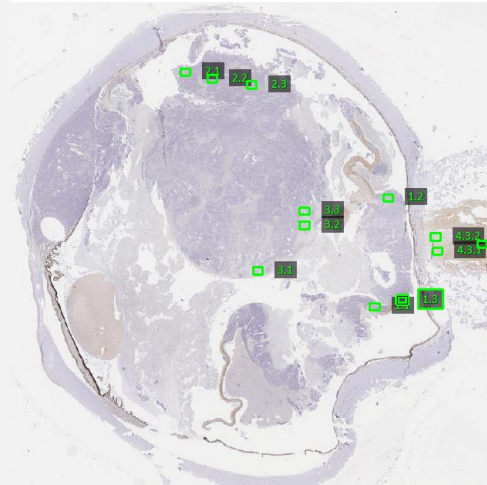


Caso 4

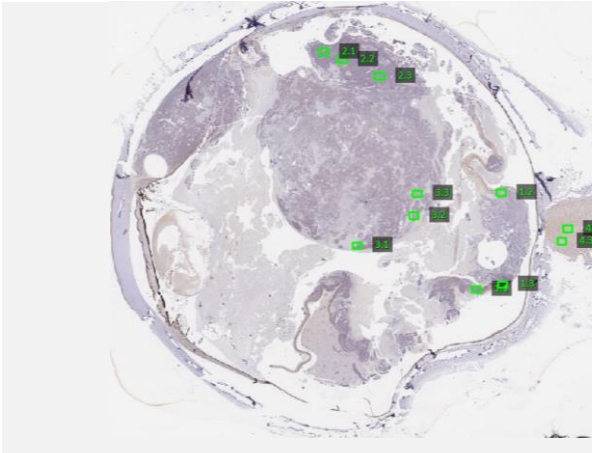
Nestina



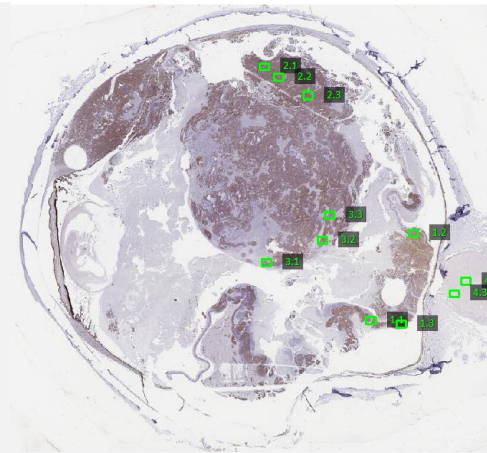
NGFR



Sox2

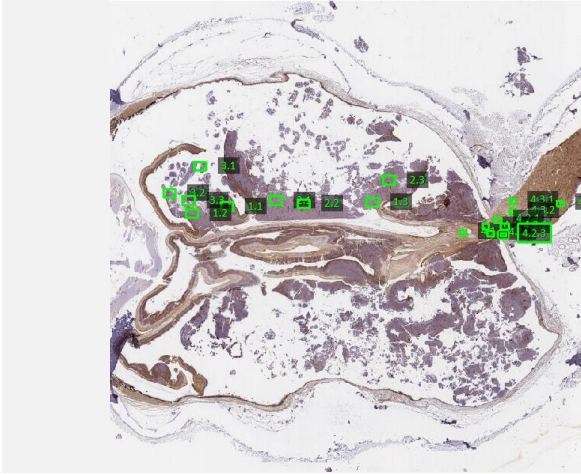


Ki-67

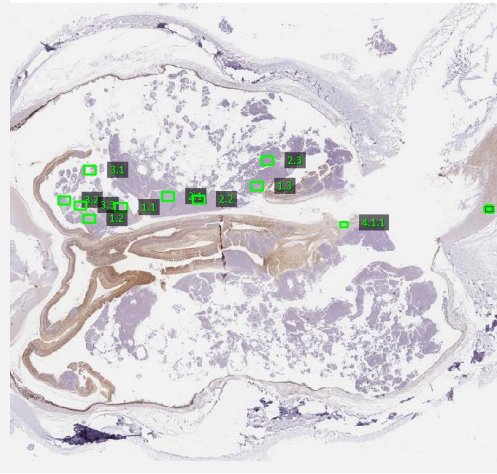


Caso 5

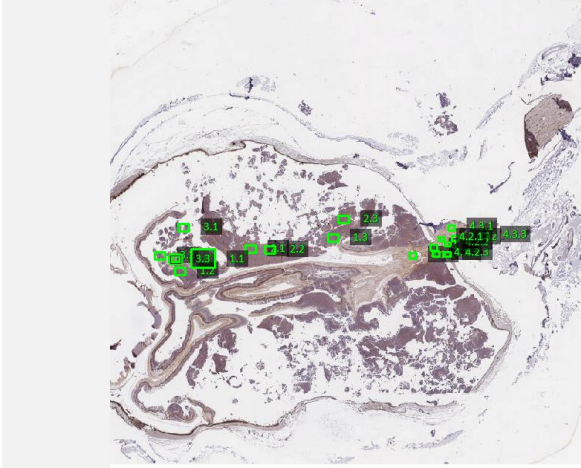
Nestina



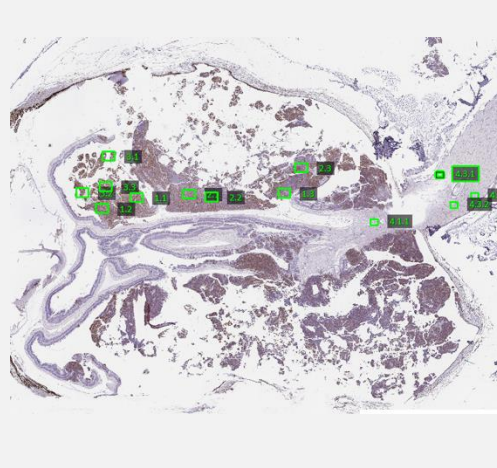
NGFR



Sox2

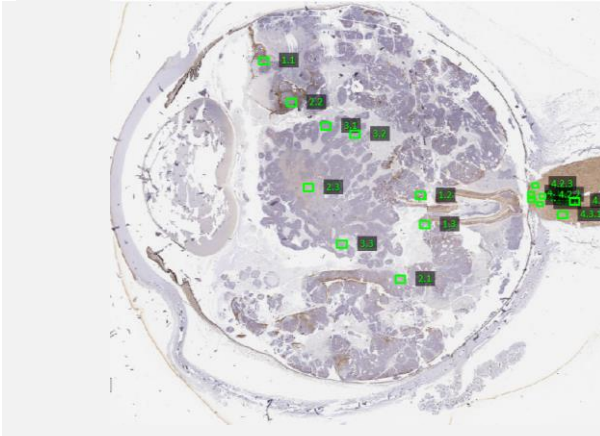


Ki-67

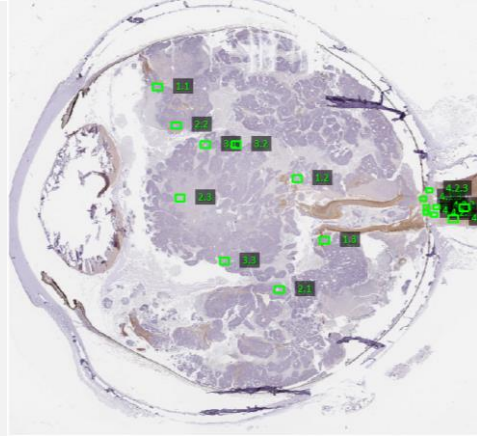


Caso 6

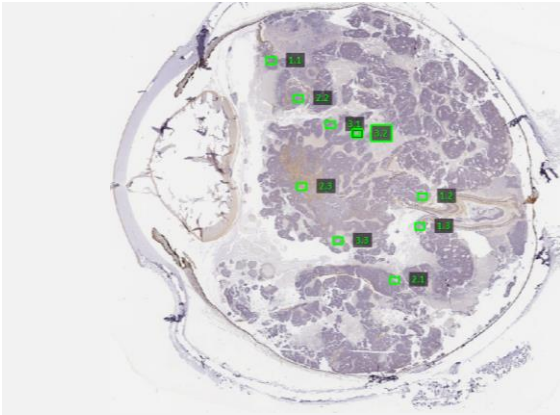
Nestina



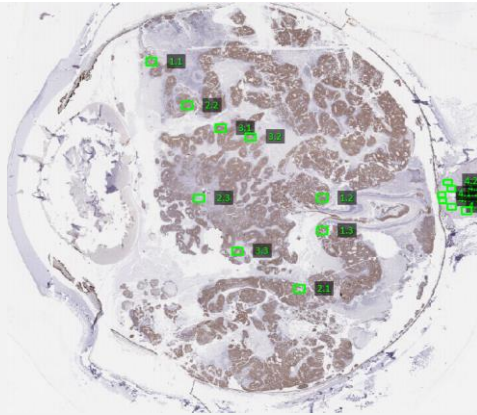
NGFR



Sox2

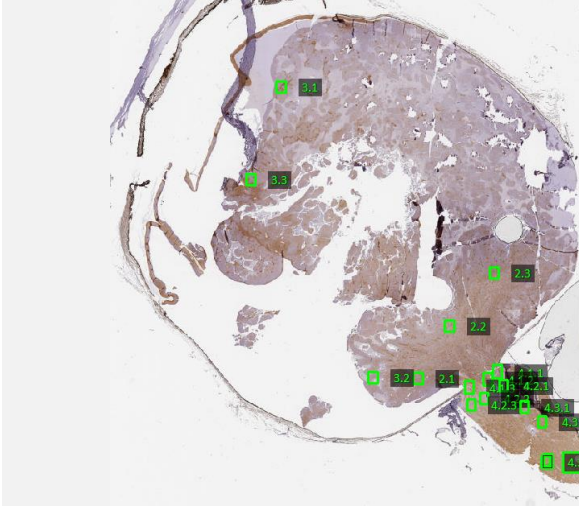


Ki-67

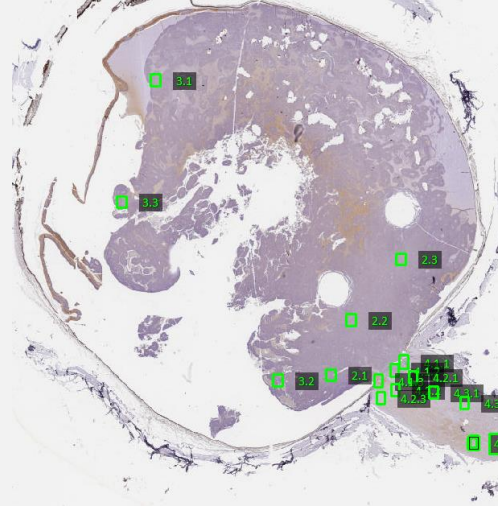


Caso 7

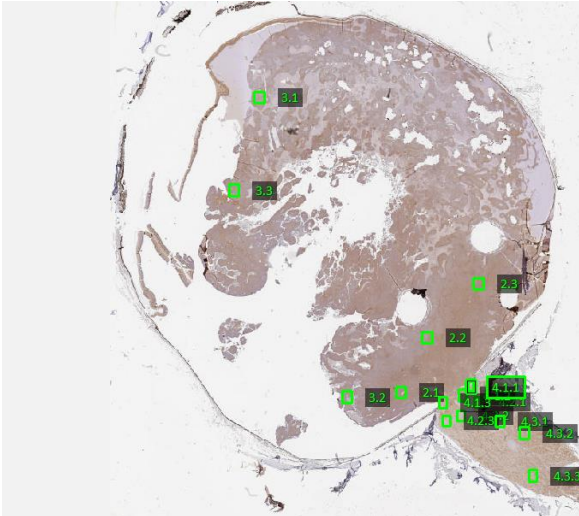
Nestina



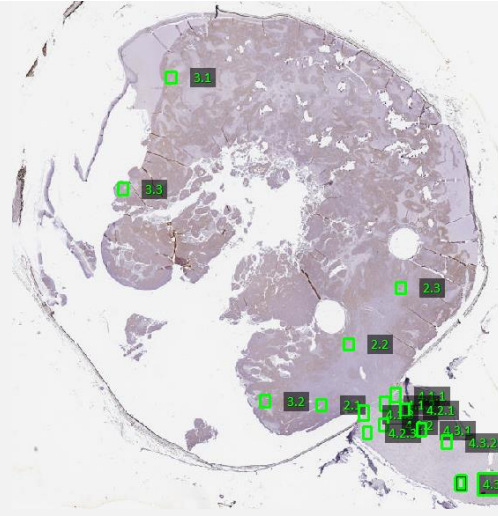
NGFR



Sox2

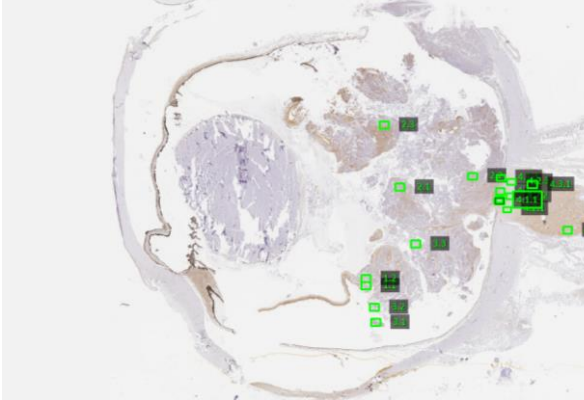


Ki-67

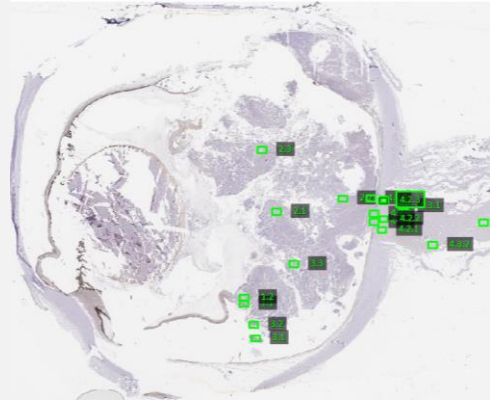


Caso 8

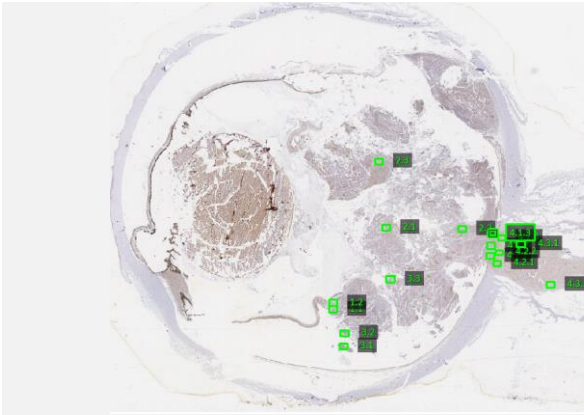
Nestina



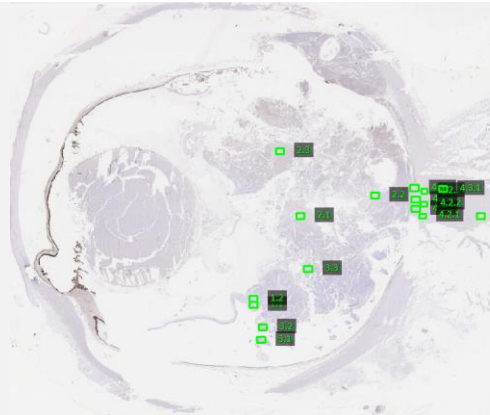
NGFR



Sox2

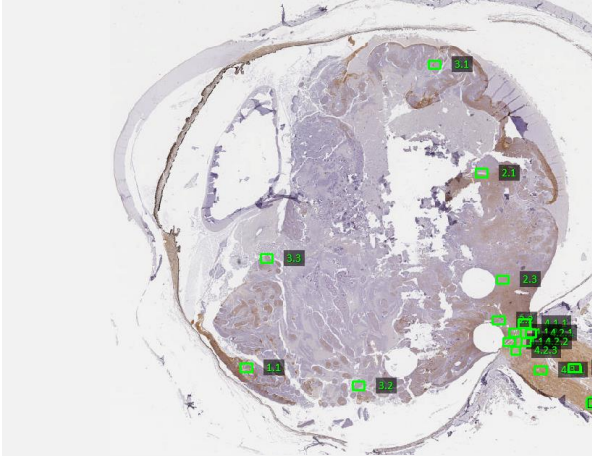


Ki-67

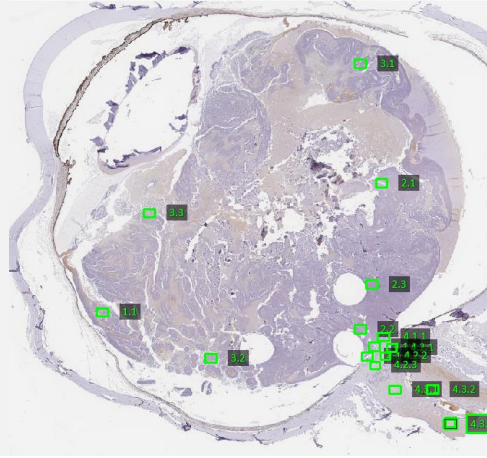


Caso 9

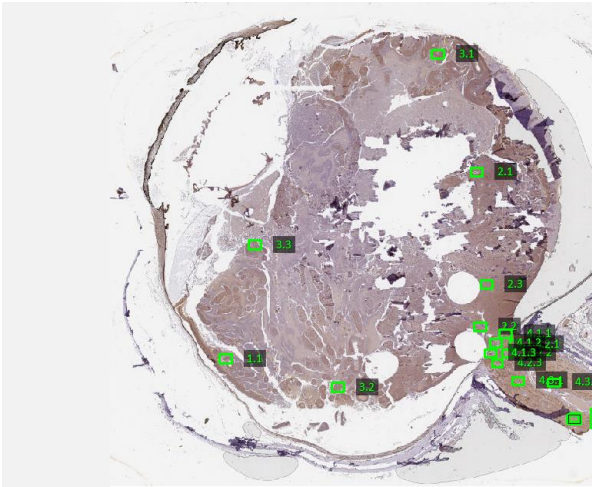
Nestina



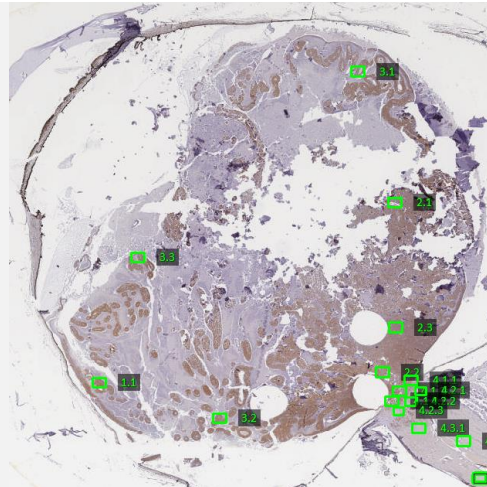
NGFR



Sox2

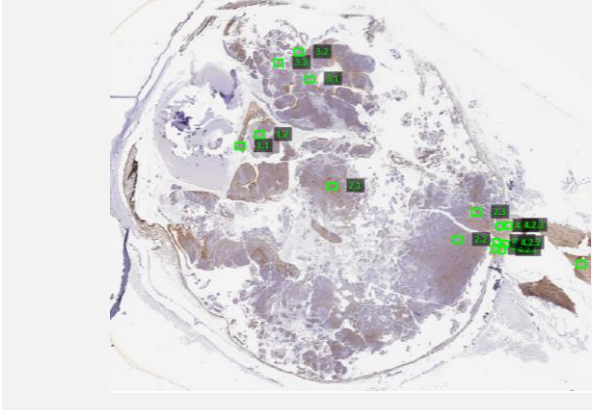


Ki-67

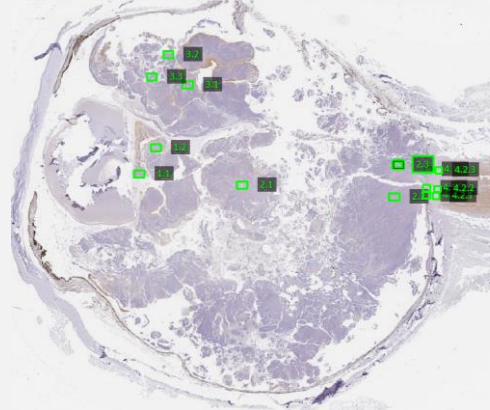


Caso 10

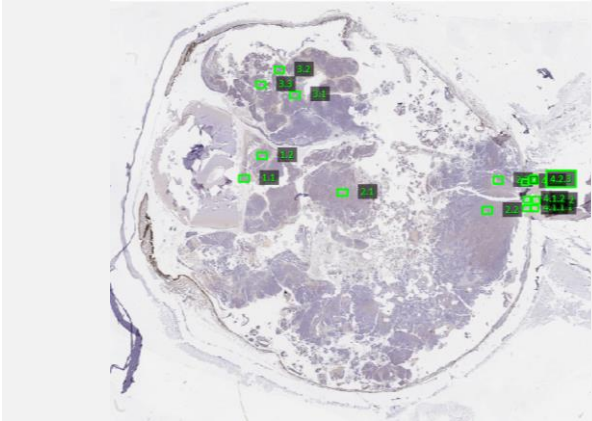
Nestina



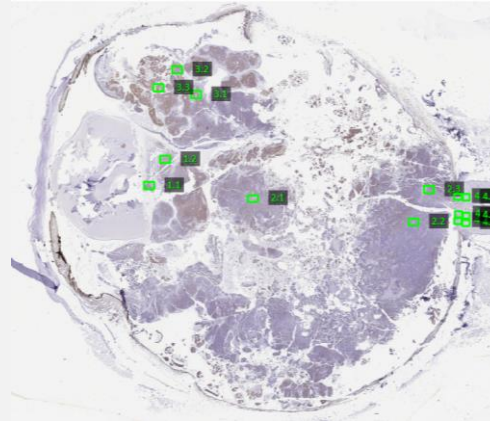
NGFR



Sox2

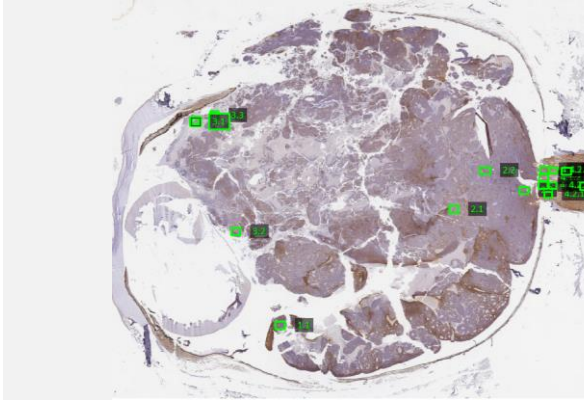


Ki-67

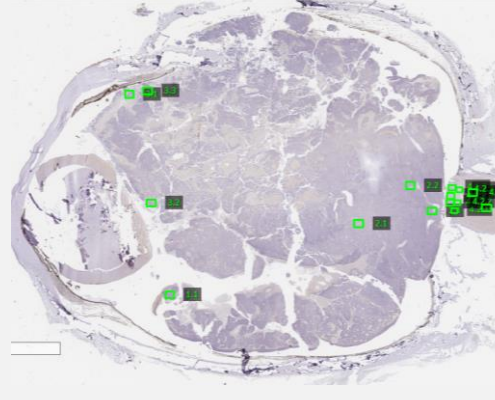


Caso 11

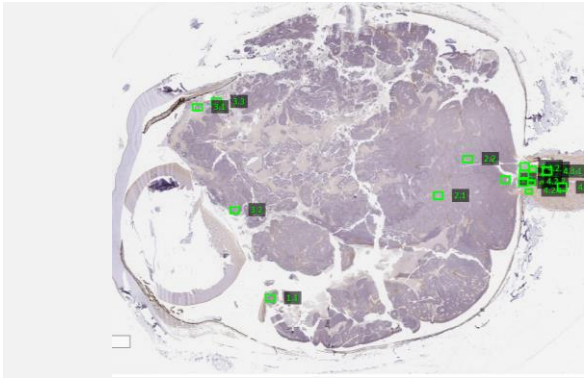
Nestina



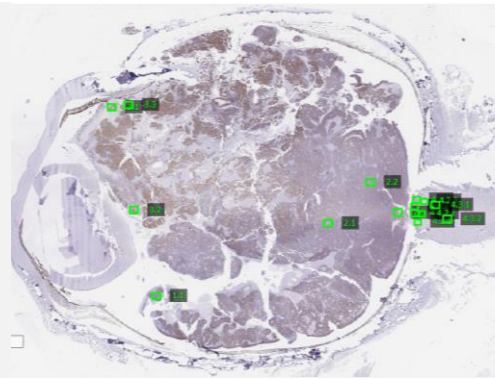
NGFR



Sox2

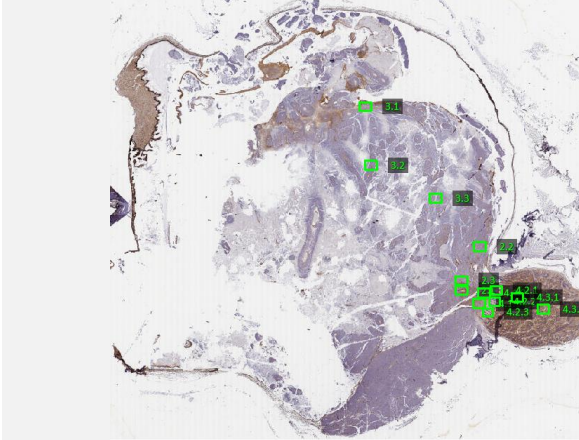


Ki-67

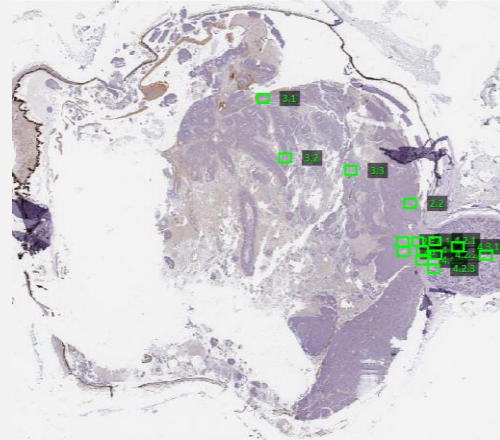


Caso 12

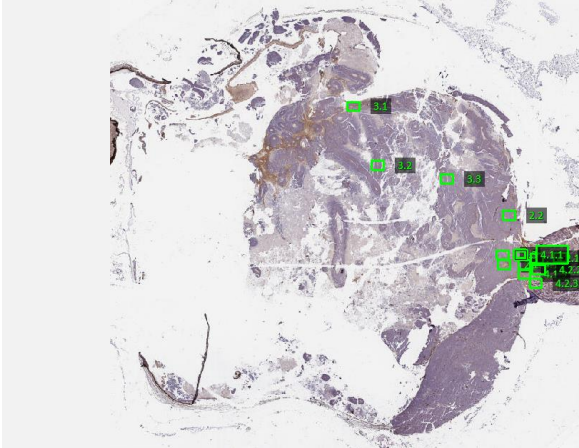
Nestina



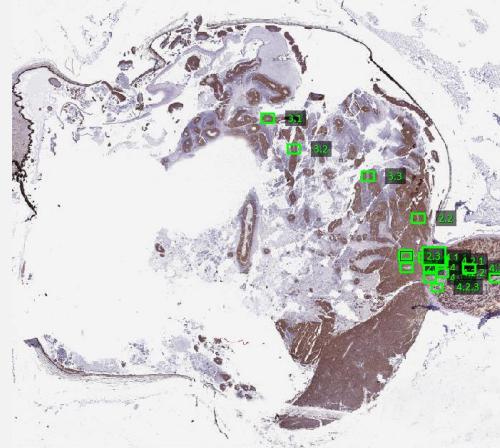
NGFR



Sox2



Ki-67



Anexo 3. Tablas de datos

Caso	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Tipo de tumor	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Alto riesgo	Bajo riesgo	Bajo riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo	Alto riesgo

NV=No Valorable

Caso 1		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	1	0	1	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	1	1	1	0	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	1.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Arteriola y capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.3	1	0	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Arteriola y capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	1	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.2	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.3	0	1	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	1	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.2	1	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Arteriola y capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Arteriola y capilar
	3.3	1	0	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Arteriola y Capilar
Nervio óptico	4.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	NO	1	1	1	1	Arteriola	0	1	0	1	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	1	1	1	Arteriola	0	0	0	1	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar

Caso 2		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1	0	1	Arteriola y Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	1	NO	1	0	1	0	Capilar
	1.2	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	1	NO	1	0	1	0	Capilar
	1.3	0	0	0	1	NO	0	0	0	1	Capilar	0	1	0	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor central	2.1	0	0	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	NO	NV	NV	NV	NV	NV
	2.2	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	0	1	1	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV
	2.3	0	1	0	1	Arteriola	0	1	0	1	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	NO	1	0	1	0	Capilar
	3.2	0	0	0	0	Capilar	0	1	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	0	1	1	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	4.2	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	4.3	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	1	Arteriola y capilar	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	0	Capilar

Caso 3		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1	1	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	1	1	1	Arteriola y capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.2	0	1	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.3	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	0	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola y capilar
	2.2	0	1	1	1	Arteriola y capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.3	0	1	0	0	Capilar	0	1	0	0	Capilar	1	1	1	1	Arteriola y capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	0	0	1	1	Capilar	1	1	1	1	Arteriola y Capilar
	3.2	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	1	1	0	Arteriola y capilar
	3.3	0	1	0	1	Arteriola	0	0	0	1	Arteriola	1	1	1	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar
Nervio óptico	4.1	1	1	1	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	1	1	1	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	1	Arteriola y capilar	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	1	Arteriola y capilar

Caso 4		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67					
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1	0	1	Capilar	0	1	0	0	Capilar	1	0	0	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
	1.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
	1.3	0	1	1	1	Capilar	0	1	0	0	Capilar	1	0	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
	2.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
	2.3	0	1	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
Tumor periférico	3.1	0	1	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
	3.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
	3.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	
Nervio óptico	4.1	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	4.2	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	4.3	0	1	0	1	Arteria y capilar	0	0	0	1	Arteria y capilar	0	1	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	

Caso 5		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	1	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.3	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	0	1	Capilar	1	1	1	0	Capilar
Tumor central	2.1	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1K	1	1K	Capilar	0	0	1	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	1	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	1	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV
	4.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	0	0	0	Capilar

Caso 6		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.2	NV	NV	1	1	No	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.3	NV	NV	0	1	No	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Arteria y capilar	0	1	0	0	Capilar	1	0	0	0	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.2	0	1	1	1	Arteria y capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.3	0	1	1	1	Arteria y capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	1	1	1	Capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	0	0	Arteria y capilar	0	0	0	0	Arteriola y capilar	0	1	0	0	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	3.2	0	0	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	3.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Arteriola	1	0	1	1	Arteriola
Nervio óptico	4.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	0	0	1	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	1	0	0	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	NV	NV	NV	NV	NV	0	0	0	0	Capilar

Caso 7		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	1.2	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	1.3	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	1	1	1	1	Arteriola y capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	0	0	1	0	Capilar
	2.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	0	1	0	Capilar
	2.3	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	0	1	0	NO
Tumor periférico	3.1	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	0	1	0	NO
	3.2	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	4.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	0	1	1	1	Capilar
	4.3	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar	0	0	1	1	Capilar

Caso 8 Q092285		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	1.2	0	0	1	1	NO	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	1.3	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	0	1	1	1	Arteriola	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Arteriola
	2.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	2.3	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Arteriola	0	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
Tumor periférico	3.1	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Arteriola	0	0	0	0	Capilar
	3.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	3.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar

Caso 9		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	0	1	0	1	Arteriola	0	0	0	1	Capilar	0	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Capilar
	1.2	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	1.3	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	0	0	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	0	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.2	0	0	1	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	0	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.3	0	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Arteriola	1	0	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Arteriola
	3.2	0	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	0	0	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	0	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	4.2	0	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	0	0	1	1	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	1	Arteriola y capilar	0	1	0	1	Arteriola y capilar	0	0	0	1	Capilar

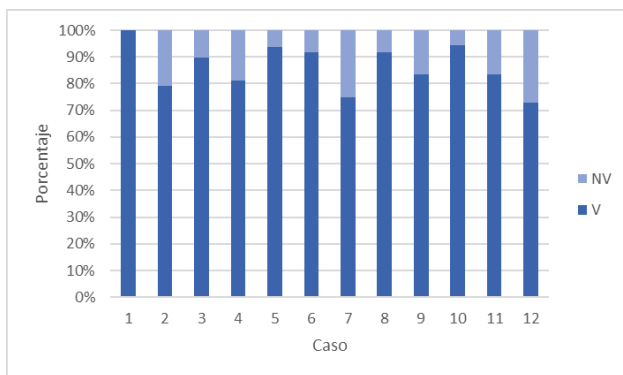
Caso 10		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	1	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.2	1	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	0	0	Capilar	1	1	1	0	Capilar
	1.3	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.2	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1K	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.3	1	1	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	1	1	1	1K	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
Tumor periférico	3.1	1	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.2	1	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	0	0	1	1	NO	0	0	0	0	NO	1	1	1	1	Capilar	0	0	1	0	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	0	0	1	1	Capilar	0	0	1	1	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar

Caso 11		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	1.2	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	1.3	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	0	1	0	1	Arteriola	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Arteriola
	2.2	1	1	1	1	Arteriola	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.3	1	1	1	1	Arteriola y capilar	0	0	0	0	Arteriola y capilar	1	1	1	1	Arteriola y capilar	1	0	1	0	Arteriola y capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	0	1	0	Arteriola
	3.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	0	0	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	0	1	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	1	Capilar
	4.2	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar
	4.3	0	1	1	1	Capilar	0	0	0	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	1	1	1	Capilar

Caso 12		Nestina					NGFR					SOX2					Ki-67				
Región	ID de región	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso	Células perivasculares		Células no perivasculares		Tipo de vaso
		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales		Tumorales	No tumorales	Tumorales	No tumorales	
Tumor adyacente a retina	1.1	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	1.2	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
	1.3	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV	NV
Tumor central	2.1	1	1	1	1	Arteriola	0	0	0	0	Arteriola	1	1	1	1	Arteriola	1	0	1	0	Arteriola
	2.2	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	2.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Tumor periférico	3.1	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.2	0	0	0	0	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	0	0	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	3.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	0	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
Nervio óptico	4.1	1	1	1	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	0	Capilar
	4.2	NV	0	0	1	Capilar	NV	0	0	0	Capilar	NV	1	1	1	Capilar	NV	0	1	1	Capilar
	4.3	0	1	0	1	Capilar	0	0	0	0	Capilar	1	1	1	1	Capilar	1	0	1	1	Capilar

Análisis de calidad

Caso	V	NV
1	100	0
2	79.17	20.83
3	89.58	10.42
4	81.25	18.75
5	93.75	6.25
6	91.67	8.33
7	75	25
8	91.67	8.33
9	83.34	16.66
10	94.44	5.56
11	83.33	16.67
12	72.92	27.08



Resumen de las zonas 1. Tumor adyacente a la retina, 2. Tumor central, 3. Tumor periférico y 4. Nervio óptico en la región preliminar

Caso	Nestina +		SOX2 +		Ki67 +		Nestina Valorables		SOX2 Valorables		Ki67 Valorables		Nestina % positivos		SOX2 % positivos		Ki67 % positivos		
	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	
1	6	5	9	9	9	1	10	10	10	10	10	10	10	60.0	50.0	90.0	90.0	90.0	10.0
2	0	6	0	3	7	0	9	9	9	9	9	7	7	0.0	66.7	0.0	33.3	100.0	0.0
3	1	10	6	8	9	3	10	10	10	10	10	9	9	10.0	100.0	60.0	80.0	100.0	33.3
4	1	9	3	0	9	0	9	9	9	9	9	9	9	11.1	100.0	33.3	0.0	100.0	0.0
5	4	9	6	9	8	1	10	10	10	10	10	10	10	40.0	90.0	60.0	90.0	80.0	10.0
6	1	7	7	5	8	1	8	8	9	9	10	10	12.5	87.5	77.8	55.6	80.0	10.0	
7	0	7	3	6	3	0	7	7	7	7	7	7	7	0.0	100.0	42.9	85.7	42.9	0.0
8	1	8	3	7	2	0	9	9	9	9	9	9	9	11.1	88.9	33.3	77.8	22.2	0.0
9	0	2	2	5	8	0	8	8	8	8	8	8	8	0.0	25.0	25.0	62.5	100.0	0.0
10	6	7	6	8	8	1	9	9	9	9	9	9	9	66.7	77.8	66.7	88.9	88.9	11.1
11	5	7	5	6	8	0	8	8	8	8	8	8	8	62.5	87.5	62.5	75.0	100.0	0.0
12	3	6	6	7	7	0	7	7	7	7	7	7	7	42.9	85.7	85.7	100.0	100.0	0.0

Porcentaje de zonas con células positivas para Nestina, SOX2 y Ki-67 con escala de color. Rojo (0%) y verde (100%).

Caso	Nestina % positivos		SOX2 % positivos		Ki67 % positivos	
	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral
1	60.0	50.0	90.0	90.0	90.0	10.0
2	0.0	66.7	0.0	33.3	100.0	0.0
3	10.0	100.0	60.0	80.0	100.0	33.3
4	11.1	100.0	33.3	0.0	100.0	0.0
5	40.0	90.0	60.0	90.0	80.0	10.0
6	12.5	87.5	77.8	55.6	80.0	10.0
7	0.0	100.0	42.9	85.7	42.9	0.0
8	11.1	88.9	33.3	77.8	22.2	0.0
9	0.0	25.0	25.0	62.5	100.0	0.0
10	66.7	77.8	66.7	88.9	88.9	11.1
11	62.5	87.5	62.5	75.0	100.0	0.0
12	42.9	85.7	85.7	100.0	100.0	0.0

Resumen de la zona 4. Nervio óptico (Región pre laminar, laminar y post laminar)

Puntaje del tumor	Nestina +		SOX2 +		Ki67 +		Nestina Valorables		SOX2 Valorables		Ki67 Valorables		Nestina % positivos		SOX2 % positivos		Ki67 % positivos		
	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	
1	1	3	2	3	0	1	3	3	3	3	3	3	3	33.3	100.0	66.7	100.0	0.0	33.3
2	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0
3	1	3	1	2	1	3	3	3	3	3	3	3	3	33.3	100.0	33.3	66.7	33.3	100.0
4	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0.0	100.0	0.0	100.0	NV	NV
5	0	3	0	2	0	0	3	3	2	2	2	2	2	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0
6	0	3	NV	NV	0	1	3	3	NV	NV	3	3	3	0.0	100.0	NV	NV	0.0	33.3
7	1	3	3	3	1	1	3	3	3	3	3	3	3	33.3	100.0	100.0	100.0	33.3	33.3
8	0	3	2	3	0	0	3	3	3	3	3	3	3	0.0	100.0	66.7	100.0	0.0	0.0
9	0	1	1	3	1	0	3	3	3	3	3	3	3	0.0	33.3	33.3	100.0	33.3	0.0
10	0	2	1	2	0	0	3	3	3	3	3	3	3	0.0	66.7	33.3	66.7	0.0	0.0
11	1	3	3	3	3	2	3	3	3	3	3	3	3	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7
12	1	2	2	3	2	0	2	3	2	3	2	3	2	50.0	66.7	100.0	100.0	100.0	0.0

Porcentaje de zonas con células positivas para Nestina, SOX2 y Ki-67 con escala de color. Rojo (0%) y verde (100%).

Caso	Nestina % positivos		SOX2 % positivos		Ki67 % positivos	
	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral	Tumoral	No tumoral
1	33.3	100.0	66.7	100.0	0.0	33.3
2	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0
3	33.3	100.0	33.3	66.7	33.3	100.0
4	0.0	100.0	0.0	100.0	NV	NV
5	0.0	100.0	0.0	100.0	0.0	0.0
6	0.0	100.0	NV	NV	0.0	33.3
7	33.3	100.0	100.0	100.0	33.3	33.3
8	0.0	100.0	66.7	100.0	0.0	0.0
9	0.0	33.3	33.3	100.0	33.3	0.0
10	0.0	66.7	33.3	66.7	0.0	0.0
11	33.3	100.0	100.0	100.0	100.0	66.7
12	50.0	66.7	100.0	100.0	100.0	0.0