



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE MEDICINA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO FEDERICO
GÓMEZ

Variantes moleculares de meduloblastomas
mediante ensayos RT-qPCR en pacientes
del Hospital Infantil de México Federico
Gómez

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
ESPECIALISTA EN:

PATOLOGÍA PEDIÁTRICA

P R E S E N T A:

Dr. Alan Irving Vicenteño León

TUTORA:
DC Maria del Pilar Eguía Aguiar



CIUDAD DE MÉXICO

FEBRERO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

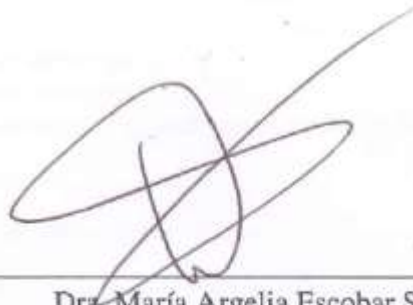
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

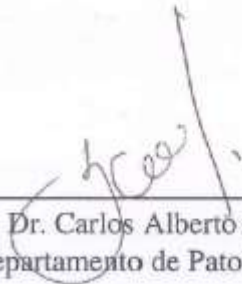
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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



Dra. María de Pilar Eguía Aguilar
Departamento Biología molecular
Dpto. de Patología Clínica y Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dra. María Argelia Escobar Sánchez
Jefa del Departamento de Patología Clínica y Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez



Dr. Carlos Alberto Serrano Bello
Adscrito al Departamento de Patología Clínica y Experimental
Hospital Infantil de México Federico Gómez

Índice

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Generalidades.....	5
1.2 Diagnóstico.....	6
1.2.1 Clasificación histológica.....	7
1.2.2 Clasificación molecular.....	10
1.2.3 Patrones histológicos no reconocidos por la OMS.....	18

Capítulo 2. Marco teórico

2.1 Diagnóstico anatomopatológico integrado.....	19
2.2 Relevancia traslacional.....	20
2.3 Métodos de clasificación molecular.....	22
2.4 Expresión de genes.....	23
2.5 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	26

Capítulo 3. Diseño de la investigación

3.1 Planteamiento del problema.....	29
3.2 Pregunta de investigación.....	29
3.3 Justificación.....	29
3.4 Hipótesis.....	30
3.5 Objetivos.....	30
3.6 Metodología.....	30
3.7 Consideraciones éticas.....	39

Capítulo 4. Resultados preliminares.....

Capítulo 5. Discusión.....

Capítulo 6. Conclusiones.....

Cronograma de actividades.....

Alcances y limitaciones del estudio.....

Referencias.....

Anexo.....

Capítulo 1. Antecedentes

1.1 Generalidades

Los meduloblastomas son los tumores cerebrales malignos más comunes en niños^{1,2,3,4,5,6}. Representan entre 20 y 30% de los tumores cerebrales pediátricos y hasta 8% de todos los tumores cerebrales^{2,3,6,7,8}. Su incidencia se estima entre 5 y 6 casos por millón de niños y hasta 70% de los casos se diagnóstica en pacientes menores de 10 años^{2,3,6,7,8,9}.

A pesar que entre 25 y 30% de todos los meduloblastomas se presenta en adultos, normalmente menores de 40 años^{2,3,8,9}, las características clínicas, evidencia genética y rasgos moleculares sugieren que son tumores diferentes a los que ocurren en niños¹⁰.

En general, son tumores más prevalentes en hombres que en mujeres a razón de 1.5-2:1^{2,3,8,10}. No obstante, existe variación conforme a los diferentes subgrupos de meduloblastomas¹⁰.

Las primeras descripciones de dichas neoplasias ocurrieron en la década de 1920, cuando Harvey Cushing y Percival Bailey lo identificaron como un tumor de células pequeñas y azules del cerebelo^{5,7,8,9}. En un comienzo fue considerado como un glioma cerebelar pediátrico, pero, posteriormente, se reclasificó y se postuló que derivaba de una célula indiferenciada que reviste el epéndimo del cuarto ventrículo denominada “meduloblasto”, sin embargo, todavía no se reconoce que exista tal célula embrionaria^{7,8,9}.

Son los tumores embrionarios pediátricos más frecuentes del sistema nervioso central (SNC) (hasta 90% de los casos¹¹) y se consideran de alto grado de acuerdo con la clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS), grado IV/IV, pues, en general, a pesar de un tratamiento agresivo, hasta 30% de los pacientes fallecen por la enfermedad y las secuelas del tratamiento en los supervivientes afectan de forma considerable la calidad de vida, principalmente secundario a déficits neurológicos permanentes^{2,3,6,7,8,12}.

Las manifestaciones clínicas suelen ser inespecíficas (náuseas, fatiga, retraso en el desarrollo escolar, etc.) y usualmente son consecuentes al aumento de la presión intracraneal por hidrocefalia (cefalea, vómito, papiledema) o a efectos directos del tumor. Los síntomas pueden llegar a ser intermitentes y evolucionar en un periodo de semanas a meses. Entre los

síntomas neurológicos concretos se encuentran la ataxia, las dificultades motoras y los problemas visuales, entre otros^{3,11}.

Las metástasis suelen presentarse hasta en 40% de los casos al momento del diagnóstico inicial, y ocurren vía líquido cerebro espinal afectando principalmente a las leptomeninges, raramente metastatizan a médula ósea, ganglios linfáticos o vísceras^{6,8,9,13}.

1.2 Diagnóstico

Los meduloblastomas corresponden a la mitad de los tumores que ocurren en la fosa posterior⁷, soliendo originar en el vérmix cerebelar (75% de los casos⁹) y ocupar el cuarto ventrículo o, de forma menos común, pueden localizarse en un hemisferio cerebelar^{6,9}.

Mediante estudios de imagen suelen identificarse como lesiones sólidas, raramente quísticas, expansibles, no calcificadas y usualmente sin necrosis, hipointensas en T1, hiperintensas en T2, que realzan al contraste en T1 y que no difunden en la resonancia magnética de difusión¹¹.

Macroscópicamente son lesiones de aspecto “carnoso” color rosa grisáceo, de consistencia friable o masas más circunscritas y firmes dependiendo del tipo histológico⁶. La presencia de hemorragia es variable y en algunos casos puede haber necrosis¹¹.

Microscópicamente son lesiones hipercelulares dispuestas en patrón sólido e infiltrante compuestas por células de tamaño pequeño a mediano con núcleo hiper cromático y escaso citoplasma, se identifica moldamiento nuclear, pleomorfismo moderado y alto índice mitótico (Fig. 1A).

La clasificación histológica de los meduloblastomas se describió por primera vez en la década de 1980 y para el año 2007 la OMS reconoció cinco patrones histológicos. En la actualidad, con base en la clasificación “OMS 2016” se describen cuatro patrones microscópicos: el patrón clásico, el desmoplásico nodular, el meduloblastoma con extensa nodularidad y el anaplásico/células grandes^{5,6,8,9,12,13}.

1.2.1 Clasificación histológica

Meduloblastoma clásico

Es el patrón histológico más común, entre 66 y 72% de los casos, suele presentarse en la línea media y con mayor frecuencia en la niñez^a. Microscópicamente la distribución de la neoplasia es sincitial o en hojas densas (Fig. 1C) compuestas por células indiferenciadas del tipo de células pequeñas, redondas y azules con un radio núcleo citoplasma amplio, presenta mitosis y cuerpos apoptóticos frecuentes, además puede desarrollar diferenciación neurocítica representada por rosetas de Homer-Wright (Fig. 1B). No presenta desmoplasia, excepto cuando hay invasión a las leptomeninges^{6,7,8,9}.

Patrón desmoplásico nodular

Representa 20% de los meduloblastomas. Afecta preferentemente los hemisferios cerebelares, pero también puede ocurrir en la línea media, y se presenta en niños, adolescentes y adultos. En infantes su incidencia llega hasta 57% de los casos y en los adultos hasta 21%. En niños menores de 3 años puede asociarse al síndrome de Gorlin^{6,11}.

Aunque puede recurrir de forma localizada, las metástasis al momento del diagnóstico son menos frecuentes que en los otros patrones histológicos⁶.

Histológicamente se distinguen grupos nodulares densos compuestos por células de aspecto embrionario con variable diferenciación neurocítica y neurópilo, sin presencia de reticulina intercelular (islas pálidas), en la periferia de los nódulos hay células indiferenciadas y depósito pericelular de colágena (desmoplasia), detectable por el depósito de reticulina (Fig. 1D). Las mitosis son más frecuentes en las zonas internodulares y no hay formación de rosetas neuroblásticas^{6,7,8,9}.

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

Patrón con extensa nodularidad

Representa 4.2% de los casos, pero en infantes puede corresponder a 20%. 80% de los casos se presenta en el vérmix cerebeloso y también puede asociarse al síndrome de Gorlin^{6,11}.

En la histología se identifican grupos celulares con diferenciación neurocítica, que frecuentemente coalescen. Las áreas internodulares presentan abundante tejido de tipo neurópilo, lo que le da un aspecto lobular, y escaso componente de tipo reticulina (Fig. 1E). La actividad mitótica es nula o baja en las áreas neurocíticas^{6,7,8,9}.

Patrón anaplásico/células grandes

En conjunto corresponden a 10% de los meduloblastomas. Anteriormente, se describían como patrones histológicos separados, sin embargo, la OMS refiere que el patrón puro de células grandes es extremadamente raro y la mayoría de los casos también contienen áreas anaplásicas, por tanto, los agrupó en el año 2016^{6,7,11}.

La anaplasia se caracteriza por células aumentadas de tamaño (≥ 2 veces el tamaño de las células convencionales¹⁴), con pleomorfismo nuclear marcado, moldamiento nuclear franco, abundantes mitosis y cuerpos apoptóticos, mientras que las células grandes corresponden a células redondas, uniformes, con núcleo vesicular y nucléolo prominente (Fig. 1)^{6,7,8,9}. No existe un consenso en cuanto a la cantidad de mitosis, pero se sugieren más de 10 mitosis por 10 campos a 40x⁷. Para realizar el diagnóstico de este patrón es necesario que 50% del componente neoplásico presente las características de anaplasia o de células grandes¹⁵.

Dentro de este patrón histológico se integran dos variantes morfológicas raras (< 1%) con diferenciación divergente miogénica o melanocítica (conocidos previamente como medulomioblastoma y meduloblastoma melanocítico respectivamente)^{6,7,8,9}.

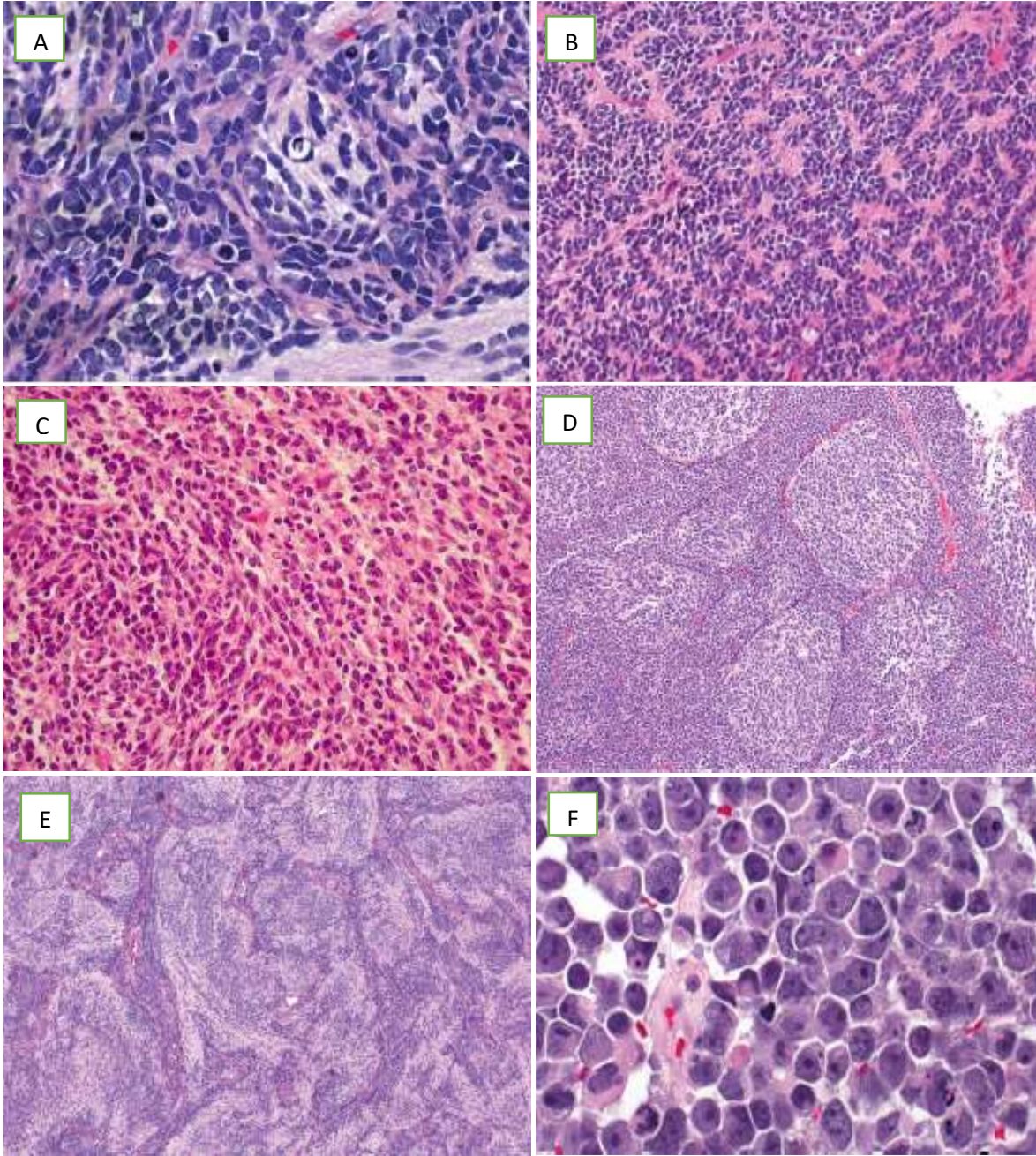


Figura 1. Los meduloblastomas son neoplasias de células indiferenciadas, pequeñas, redondas y basófilas (A), entre las que se observan abundantes mitosis; cuando existe mayor diferenciación pueden observarse rosetas de Homer-Wright (B). LA OMS reconoce cuatro patrones microscópicos: patrón clásico (C), desmoplásico nodular (D), extensa modularidad (E) y células grandes/anaplásico (F). (Tomados de Orr, 2020).

Inmunofenotipo

De forma general, los meduloblastomas son reactivos a vimentina, sinaptofisina, SMARCB1, SMARCA4, enolasa neuronal específica y otros marcadores neuronales como MAP2 y NCAM1, algunos tumores expresan factores de crecimiento de nervio como NGF, BDNF y NT3, así como sus receptores TrkA, TrkB y TrkC, y hasta 10% de los casos expresa proteína ácido glial fibrilar^{6,16}.

Se refiere que una característica celular del patrón de células grandes es la inmunorreactividad tipo “punto” (dot-like) de la sinaptofisina¹⁵.

1.2.2 Clasificación molecular

En clasificaciones previas a la 4ª edición de los tumores del SNC de la OMS se correlacionaban las variantes histológicas de los meduloblastomas con las variables clínicas^{7,9}, no obstante, la correspondencia pronóstica no era constante.

Mediante técnicas genómicas, en el año 2002 se demostró que existen grupos moleculares con expresiones genéticas distintas, las cuales tienen mayor correlación pronóstica que los criterios histológicos o clínicos^{17,18}. Con base en ello, el Grupo de Trabajo Internacional en Meduloblastoma definió en el año 2010 cuatro grupos moleculares: wingless (WNT), sonic Hedgehog (SHH), grupo 3 y grupo 4, cada uno de ellos con características genéticas, correlación demográfica, clínica y pronóstica específicas (fig. 2)^{9,17,19,20,21}.

En el año 2014 se propuso un algoritmo diagnóstico para la clasificación molecular en los cuatro subgrupos y para el año 2015 la OMS reconoció a dichos grupos como entidades biológicas distintas y las introdujo dentro de la clasificación de los tumores del SNC 2016⁵. La importancia de tal hecho radica en que actualmente la clasificación molecular puede ser un mejor indicador pronóstico que el grado de la OMS en la evaluación tanto de la supervivencia global como de la supervivencia libre de recurrencias²².

Subgroup	WNT		SHH				Group 3			Group 4			
	WNT α	WNT β	SHH α	SHH β	SHH γ	SHH δ	Group 3α	Group 3β	Group 3γ	Group 4α	Group 4β	Group 4γ	
Subtype proportion													
Subtype relationship													
Clinical data	Age												
	Histology		LCA Desmoplastic	Desmoplastic	MBCN Desmoplastic	Desmoplastic							
	Metastases	8.6%	21.4%	20%	33%	8.9%	9.4%	43.4%	20%	39.4%	40%	40.7%	38.7%
	Survival at 5 years	97%	100%	69.8%	67.3%	86%	88.5%	66.2%	55.8%	41.9%	66.8%	75.4%	82.5%
Copy number	Broad	e ⁻	9q ⁺ , 10q ⁺ , 17q ⁺		Balanced genome		7 ⁺ , 8 ⁺ , 10 ⁺ , 11 ⁺ , 17q ⁺		8 ⁺ , 17q ⁺	7q ⁺ , 8p ⁺ , 17q ⁺	17q ⁺	7q ⁺ , 8p ⁺ , 17q ⁺ (loss)	
	Focal		MYCN amp, EGFR amp, YAP1 amp	PTEN loss		10q23 ⁺ , 11q23.3 ⁺		OTX2 gain, DDX31 loss	MYC amp	MYCN amp, CDKN6 amp	SIN3A1 dup	CDKN6 amp	
Other events			TP53 mutations			FBX7 promoter mutations		High GF1/YIF expression					

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

Figura 2. Subgrupos moleculares de los meduloblastomas: clínica, histología, alteraciones en el número de copias, vías de señalización y metilación de ADN¹⁹ (tomada de Cavalli F, Remke M, Rampasek L et al., 2017).

Grupo WNT

Representa de 10 a 15% de los casos^{6,7,9,20}, afecta por igual a ambos sexos^{6,9,17,18} y, comúnmente, los pacientes tienen entre 7 y 14 años^{6,7}. En los adolescentes y adultos jóvenes representa hasta 15% de los casos y es poco frecuente en infantes^{6,20}.

Se presenta en la línea media (pedúnculo cerebelar y ángulo cerebelopontino)⁶, y pueden protruir por el foramen de Luschka⁷. El origen se postula de las células madre cerebrales dorsales originadas en el labio rómbico inferior, las cuales recubren el cuarto ventrículo^{5,6,17}. Casi todos los tumores con activación de esta vía presentan histología clásica, raramente se han reportado casos con morfología anaplásica y la variante desmoplásica nodular no se presenta en este grupo⁶.

La activación de la vía WNT (Fig. 3) puede demostrarse con la acumulación nuclear de β-catenina, a diferencia de los otros tipos de meduloblastomas que aunque pueden presentar algún grado de inmunorreactividad para β-catenina esta suele ser citoplasmática. Hasta 90% de los casos presentan monosomía 6 y/o mutación en el exon 3 del gen CTNNB1. Otros genes

mutados son DDX3X (36-50% de los casos), SMARCA4 (19-26.3%), Tp53 (12.5-14%), CSNK2B (14%), KMT2D (12.5%), PIK3CA (11%) y EPHA7 (8%)^{3,5,6,7,9,18,23}.

Existe una rara asociación entre este grupo y la mutación germinal del gen APC, principalmente en los casos que son negativos para la mutación en CTNNB1^{3,7,9,18}. Dicha asociación ocurre debido a que la proteína APC forma parte de un complejo de destrucción que degrada la β -catenina, por lo tanto, la pérdida de la proteína APC deriva en la acumulación citoplasmática y nuclear de la β -catenina. Esto explica el mayor riesgo de los pacientes con poliposis adenomatosa familiar, en quienes hay pérdida funcional del gen APC, de desarrollar meduloblastomas WNT en comparación con la población general^{3,9}.

En este subgrupo la mutación en TP53 no confiere mal pronóstico^{7,9} y no suelen encontrarse amplificaciones de MYC y NMYC, al grado que su presencia puede hacer sospechar de un error en la clasificación molecular⁷.

El estudio subestructural de este subgrupo molecular reveló dos subtipos: WNT α que corresponde a 70% de los casos y predomina en los niños y WNT β de predominio en adultos⁷. Las metástasis son infrecuentes⁵ y el pronóstico de los pacientes menores de 16 años es favorable, pudiendo alcanzar una supervivencia superior a 95% a los 5 años^{3,5,6,12,17,18}. Se refiere que aún los pacientes con histología de células grandes/anaplásicas mantienen el buen pronóstico de este subgrupo^{17,24}. Sin embargo, los pacientes mayores de 16 años suelen tener un pronóstico intermedio⁵ y los adultos un peor pronóstico¹².

Uno de los postulados para el pronóstico favorable es la permeabilidad de la vasculatura, debido a que no hay un desarrollo completo de una barrera hematoencefálica, los medicamentos quimioterapéuticos son accesibles a las células neoplásicas. Esta característica vascular es la que ocasiona el fenotipo hemorrágico de estos tumores durante la cirugía^{3,12,18}.

Grupo SHH

Representa entre 25 y 30% de los casos globales y afecta a todos los grupos de edad, pero se presenta preferentemente en una distribución bimodal, primero en infantes y posteriormente en niños mayores de 16 años y adultos^{6,7,9,12,17,18}. En los adultos es el subgrupo más común, llegando a representar hasta 60% de los casos⁷. La relación hombre-mujer suele ser de 1.5:1⁶.

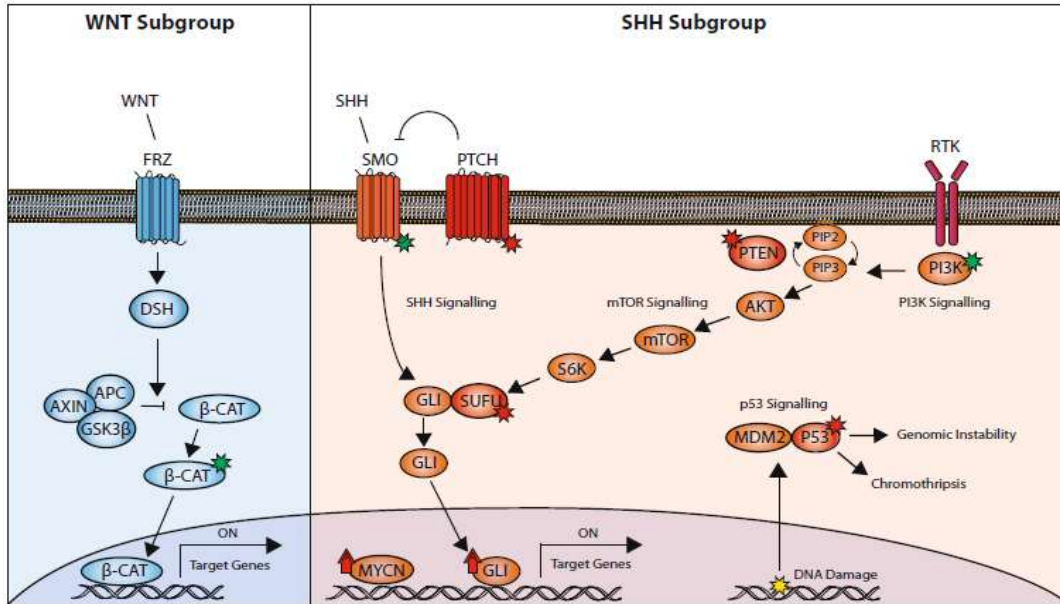


Figura 3. Vías de activación WNT y SHH. En la vía WNT, la acumulación nuclear de la β -catenina promueve la transcripción de genes que regulan procesos como la apoptosis, proliferación y adhesión celular. En la vía SHH, el ligando SHH se une a SMO y activa al factor de transcripción GLI en los cilios primarios, por su parte PTCH tiene como función inhibir a SMO. El aumento en la actividad de los factores que componen la vía ya sea por mutaciones de activación (asterisco verde) o inactivación (asterisco rojo) genera aumento en la transcripción. En ocasiones la vía P13K /mTOR también se encuentra alterada y coopera con la vía SHH ²⁵. (tomado de Skowron P, Ramaswamy V & Taylor M, 2015).

Se localizan principalmente en un hemisferio cerebelar, pero pueden ocurrir también en el vermis^{7,19}. Debido a la predilección por involucrar la porción lateral del cerebelo, se postula que la célula de origen deriva de precursores neuronales granulares de la capa granular externa, células ATOH1 positivo, o de células del núcleo coclear^{6,20}.

Todas las variantes histológicas pueden ocurrir en este subgrupo, pero más de 50% corresponde a la variante desmoplásico-nodular, seguida del patrón clásico y en tercer lugar la variante de células grandes/anaplásicas⁷.

Las principales mutaciones que activan la vía SHH (Fig. 3) ocurren en los genes PTCH1 (43% de los pacientes), TERT (39%), SUFU (10%) y SMO (9%), además se suelen presentar deleciones en PTEN y amplificaciones de GLI-1 o 2 (9%) y N-MYC (7%)^{3,6,7,9,12,17,18,23}.

Las alteraciones citogenéticas más comunes son las pérdidas del 9q y 10q, lo que deriva en pérdida de la heterogenicidad de PTCH1 (9q22) y SUFU (10q24), ambos reguladores negativos de la vía SHH^{3,17}.

Los marcadores de inmunohistoquímica útiles para diagnosticar el grupo SHH son GAB1 y YAP1⁶. GAB1 suele presentarse únicamente en los casos con activación SHH o mutación en PTCH1, mientras que YAP1 se presenta en casos SHH o WNT, pero no en los grupos 3 o 4⁶. La reacción de inmunohistoquímica suele variar dependiendo de la variante histológica, en el patrón desmoplásico nodular la reacción suele ser mayor en las regiones internodulares, mientras que en el resto de los casos suele ser una reacción difusa⁶.

Las metástasis suelen presentarse en 20% de los casos²⁰. El pronóstico general de la variante SHH se aproxima a 70%¹⁸, pero está influido por la presencia de la mutación en el gen TP53⁶, por lo que este subgrupo se divide en dos subclases reconocidas por la OMS: TP53 silvestre y TP53 mutado^{6,9,18}.

Grupo SHH con TP53 silvestre

Generalmente ocurre en pacientes menores de 4 años, adolescentes o adultos jóvenes⁶. La activación de la vía SHH con TP53 silvestre se puede asociar a mutaciones somáticas o germinales con regulación negativa de los genes PTCH1 o SUFU, activación somática de mutaciones en SMO o, raramente, amplificación de GLI-2⁶. El pronóstico de supervivencia se describe entre 76 y 80% a cinco años^{7,18}.

Grupo SHH con mutación en TP53

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

La pérdida del cromosoma 17p, las amplificaciones de GLI-2 o NMYC, y la ausencia de mutaciones en PTCH1, SUFU y SMO se asocian a la mutación en TP53^{6,7,18}.

A pesar que los meduloblastomas SHH suelen presentar menor frecuencia de metástasis que otros grupos, la variante TP53 mutante puede presentar implantes en el neuroaxis⁶. En

adición, la mutación TP53 puede presentarse en casos de recaídas tumorales aun cuando el tumor primario pertenecía al subgrupo SHH con TP53 silvestre⁶.

La mutación en TP53 se asocia con cromotripsis y confiere un mal pronóstico de aproximadamente 40% a cinco años^{6,7,18}.

Subclases SHH mediante metilación de ADN

Además de la subclasificación según el estado de TP53, mediante metilación de ADN y técnicas genómicas se ha subdividido al subgrupo SHH en cuatro subclases^{3,7,18}. El Consorcio Internacional de Avances Genómicos en Meduloblastomas (MAGIC por su nombre en inglés) describe cuatro subclases catalogadas mediante metilación de ADN y arreglos de expresión génica: α , β , γ y δ ^{3,7}.

La subclase α predomina en los niños mientras que la β lo hace en adultos⁷. En los infantes, ocurren las subclases β y γ , pero la primera conlleva peor pronóstico (67% comparado con 88% a cinco años)⁷.

Grupo no WNT/SHH

Los subgrupos WNT y SHH hacen referencia a la vía molecular alterada, sin embargo, en los otros dos subgrupos se desconoce la vía, por ello se designan de forma genérica como subgrupo 3 y subgrupo 4¹⁷.

Debido a la falta de claridad en la vía de lesión y a que los subgrupos 3 y 4 comparten características citogenéticas que se traslapan y que pueden dificultar su diferenciación diagnóstica, la OMS 2016 integró ambos subgrupos en la categoría provisional “no WNT/SHH”^{5,6,7,9}.

El subgrupo no WNT/SHH alberga aproximadamente 60% de los meduloblastomas^{6,7}. La histología clásica es la más frecuente, seguida del patrón de células grandes/anaplásicas (preferentemente en el subgrupo 3), mientras que las variantes desmoplásico nodular y extensa nodularidad no suelen presentarse^{6,7}.

Ocurren en la niñez, afectando preferentemente al sexo masculino 2:1⁹, pero hasta 25% de los meduloblastomas en adultos entran en este subgrupo⁷.

Preferentemente afectan la línea media (cuarto ventrículo) y la inmunohistoquímica es negativa para GAB1 y YAP1 y positiva para β -catenina en el citoplasma^{6,7}.

El pronóstico de este subgrupo es desfavorable comparado con los grupos WNT y SHH y las metástasis al momento del diagnóstico alcanzan hasta 30%^{7,9}.

Debido a variantes de nucleótido único, la biología de este subgrupo no está bien establecida⁷, además se reportan casos con sobreposición molecular entre ambos subgrupos, en los que los estudios de metilación han confirmado su estrecha relación²⁶. Inclusive, con base en dichos estudios se ha propuesto una *zona gris* que podría derivar en una reestructuración entre 4 a 8 subtipos²⁶.

A pesar de ello, hay ciertas características que pueden apoyar la diferenciación entre los subgrupos 3 y 4, además, la relevancia de tal separación surge cuando se considera que la supervivencia de los pacientes del subgrupo 3 varía entre 50 y 60%, mientras que en el subgrupo 4 lo hace entre 70 y 80%.

Grupo 3

Ocurre aproximadamente en 20-30% de los casos y afecta principalmente a niños entre tres y cinco años, en quienes puede representar hasta 45%, es extremadamente raro en adultos^{6,7,8,17,18,24}.

El origen celular se postula de células madre neurales CD133+⁶. Las alteraciones presentes en este subgrupo son el isocromosoma 17q (40-50% de los casos), ganancia de los cromosomas 1q y 7 o pérdida de los cromosomas 8, 10q y 16q, activación de GFI1A/GFI1B, amplificaciones de MYC (17-25% de los casos), OTX2 (7.7%) y NMYC (5%), así como, mutaciones en SMARCA4 (10.5%), KBTBD4 (6%), CTDNEP1 (5%), KMT2D (5%) y LRP1B (4.6%)^{3,5,6,7,12,18,22}.

En general, las metástasis al momento del diagnóstico llegan a presentarse hasta en 40% de los casos y las recurrencias tumorales son frecuentes, especialmente mediante diseminación con lecho tumoral primario libre de lesión^{6,12,18}. La supervivencia global va de 20 a 50%¹⁸; varía según la presencia de factores de mal pronóstico, como: histología anaplásica/células

grandes, enfermedad metastásica, presencia del isocromosoma 17q y amplificación de MYC, en éste último caso la supervivencia llega a ser de 20% a los cinco años^{3,6,7,11,18,27}.

Mediante diferentes métodos moleculares se ha propuesto clasificar al subgrupo 3 en diversos subtipos, primero con base en la expresión génica se propusieron dos subclases: c1 y c5. El grupo c1 se asocia a la amplificación MYC y tiene mal pronóstico, mientras que el grupo c5 se asocia a aneuploidias y tienen un mejor pronóstico³. Otras propuestas han clasificado a éste subgrupo en tres clases: α , β y γ , o en dos clases: bajo riesgo y alto riesgo³.

Grupo 4

Es el subgrupo más frecuente, entre 35 y 40% de los casos^{6,9,12,18,20}. El pico de incidencia es en la niñez tardía y la adolescencia, entre los 5 y los 15 años, siendo menos frecuente en infantes y en adultos^{6,7,9,12}. La relación hombre-mujer suele llegar a ser hasta 3:1^{7,18}.

A pesar de ser el subgrupo más común, sus características biológicas son las menos detalladas^{12,20}. No se conoce la célula de origen, no obstante, las alteraciones citogenéticas identificadas hasta en 80% de los casos involucran al cromosoma 17: delección 17p, ganancia 17q o combinación de ambas en forma de un 17q isodiccéntrico; también se ha asociado con la pérdida del cromosoma 11, mientras que las mutaciones más frecuentes ocurren en PRDM6 (17% de los casos), KDM6A (13%), SNCAIP (10.4%), NMYC (5-10%), GFI1/GFI1B (5-10%), KMT2C (6%), KBTBD4 (6%), OTX2 (6%), CDK6 (6%) y ZMYM3 (6%)^{3,5,6,12,18}. Las mutaciones con pérdida de función de KDM6A, ZMYM3 y KMT2C son mutuamente exclusivas en este subgrupo³.

El pronóstico puede llegar a ser de hasta 95% dependiendo del grupo de riesgo¹⁷, aunque en general el pronóstico es intermedio entre los grupos WNT y grupo 3, pero el pronóstico puede ensombrecerse en los casos metastásicos, que llegan a ser de hasta 40% al momento del diagnóstico. A diferencia del grupo 3, los pacientes con isocromosoma 7 o con pérdida del cromosoma 11 presentan un pronóstico favorable^{5,18}. Las recurrencias suelen deberse a diseminación tumoral con sitio primario libre^{5,6,9,12}.

Patrones histológicos no reconocidos por la OMS

Además de los cuatro patrones histológicos reconocidos por la OMS, previamente descritos, Orr (2020) refiere tres patrones microscópicos y moleculares con relevancia clínica: patrón clásico bifásico, patrón de ganglioneuroblastoma y patrón paucinodular⁷.

El patrón clásico bifásico se compone de células dispuestas en hojas entremezcladas con nódulos celulares con diferenciación neurocítica. Tales nódulos presentan contornos irregulares y no están rodeados por reticulina a diferencia de la variante desmoplásica nodular⁷. Además, a diferencia de la variante desmoplásica nodular que se suele asociarse al subgrupo molecular SHH, el patrón clásico bifásico suele hacerlo al grupo no WTN/SHH⁶, y presenta más frecuentemente alteraciones citogenéticas de mal pronóstico como el isocromosoma 17q y la amplificación MYC o NMYC⁷.

El patrón de ganglioneuroblastoma representa menos de 1% de los meduloblastomas y se compone por grupos de células ganglionares y neurocíticas. Usualmente es de localización supratentorial y dada su rareza no se ha asociado a algún subgrupo molecular específico⁷.

Por último, el patrón paucinodular o meduloblastoma desmoplásico corresponde a un tumor con morfología predominante de células indiferenciadas con estroma desmoplásico con rara formación de nódulos de diferenciación. Es importante diferenciarlo del patrón clásico con invasión a leptomeninges porque el patrón paucinodular se asocia al grupo no WNT/SHH⁷.

Capítulo 2. Marco teórico

2.1 Diagnóstico anatomopatológico integrado

La categoría “diagnóstico integrado” fue acuñada por Louis y colaboradores en la reunión de la Sociedad Internacional de Neuropatólogos realizada en Haarlem, Países Bajos, en 2014, con la intención de reconocer la conexión entre histología y biología molecular^{30,31}.

Tal encuentro marcó las pautas que se adoptarían en la clasificación OMS 2016, entre las que resaltan: 1. Las neoplasias deben de definirse de forma precisa y objetiva con el fin de establecer categorías grupales clínicas y biológicas, 2. La información molecular debe incorporarse a la definición de ciertas neoplasias en las que el mero diagnóstico descriptivo sólo es aceptable cuando no se cuente con métodos de clasificación molecular, 3. Un diagnóstico final estandarizado se constituye por un formato de *niveles*, y 4. La metodología y los parámetros utilizados en los estudios moleculares deberían de incluirse en el reporte con el fin de proveer detalles de significancia interpretativa³¹.

Al respecto, el formato multinivel alude a cuatro estratos estandarizados: la información molecular, el grado de la OMS, la clasificación histológica y el diagnóstico integrado, siendo éste último el estrato más alto³¹. Ejemplos de su aplicación en el estudio de los meduloblastomas se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Ejemplos del uso del formato multinivel y el diagnóstico integrado en los meduloblastomas

Nivel	Ejemplo 1	Ejemplo 2
1. Diagnóstico integrado	Meduloblastoma de tipo clásico, grupo WNT con mutación TP53, Grado IV de la OMS	Meduloblastoma de tipo células grandes/anaplásico, grupo SHH con mutación TP53 y amplificación GLI-2, Grado IV de la OMS
2. Clasificación histológica	Meduloblastoma clásico	Meduloblastoma células grandes/anaplásico
3. Grado de la OMS	IV	IV
4. Información molecular	WNT, mutación TP53	SHH, mutación TP53, amplificación GLI-2

Por lo tanto, el enfoque del diagnóstico integrado y el formato multinivel promueve reducir la variabilidad diagnóstica inter-observador, ayuda a seleccionar mejor la estratificación de riesgo de los pacientes, es más certero en la predicción de la respuesta al tratamiento, puede facilitar el desarrollo de terapias blanco, establece un pronóstico personalizado y apoya al conocimiento de los mecanismos de tumorigénesis^{15,26}.

2.2 Relevancia Traslacional

La clasificación de los meduloblastomas (MB) en cuatro subgrupos moleculares principales ha representado un punto de inflexión en el manejo de los pacientes.

De forma general, el manejo estándar que ha producido la mayor supervivencia se compone de resección quirúrgica máxima seguida de radiación cráneo-espinal y quimioterapia adyuvante (supervivencia promedio de 80% a cinco años en niños sin metástasis y sin tumor residual mediante tomografía, y de 60% en niños con metástasis o tumor residual detectable mediante tomografía $>1.5 \text{ cm}^2$)^{3,20}.

A pesar que los porcentajes de supervivencia puedan ser considerables, el grado de toxicidad es alto y el riesgo de efectos adversos en el neurodesarrollo de niños menores de 3 años tratados con radiación aumenta de manera inversamente proporcional a la edad. Además, otros efectos adversos son la pérdida auditiva, común en pacientes tratados con radiación o agentes con platino, la falla en el crecimiento, prácticamente en la totalidad de los pacientes prepúberes, deficiencias neuroendócrinas, infertilidad, y el desarrollo de neoplasias secundarias al tratamiento, documentadas hasta en 5% de los casos^{3,5,20}.

Debido a tales efectos adversos, diversos trabajos se han propuesto evaluar modificaciones en los regímenes de tratamiento. Estudios como NCT00085202, NCT00085735, NCT01878617, NCT02066220, SJMB03 y ACNS0331 han demostrado que la reducción en el volumen del lecho tumoral aunado a la introducción de radioterapia de protones puede impactar favorablemente en el pronóstico neurocognitivo sin disminuir la supervivencia dependiendo el grupo molecular^{3,5,22}.

Por ejemplo, pacientes con MB WNT, quienes tienen un pronóstico excelente (supervivencia libre de enfermedad a 5 años, más del 90%), actualmente se consideran para la reducción controlada del tratamiento (<https://clinicaltrials.gov>). Además, diversos estudios destacan que pacientes tanto de este grupo como del grupo 4 se han beneficiado de reducciones en la irradiación cráneo-espinal⁵.

En el caso de los MB con la vía SHH activa el pronóstico depende en gran medida de la edad y características genéticas específicas donde los niños con tumores SHH mutados en TP53 tienen peores desenlaces. Actualmente se llevan a cabo ensayos clínicos dirigidos a la estimación de la eficacia de los inhibidores de la vía SHH (por ejemplo, vismodegib) (<https://clinicaltrials.gov>).

Los pacientes con tumores del grupo 3 tienen el peor pronóstico, especialmente cuando se asocia con la amplificación de MYC, mientras que el grupo 4 tiene un pronóstico intermedio. No obstante, no se cuenta con estrategias terapéuticas dirigidas hacia blancos específicos para estos subgrupos actualmente por lo que se necesita mejorar la precisión diagnóstica con celeridad.

La figura 4 expone la propuesta de Ramaswamy y Taylor (2019) con miras a futuros ensayos clínicos basados en estratificaciones de riesgo, tratamientos convencionales y terapias blanco de acuerdo con características moleculares de los meduloblastomas en infantes y niños.

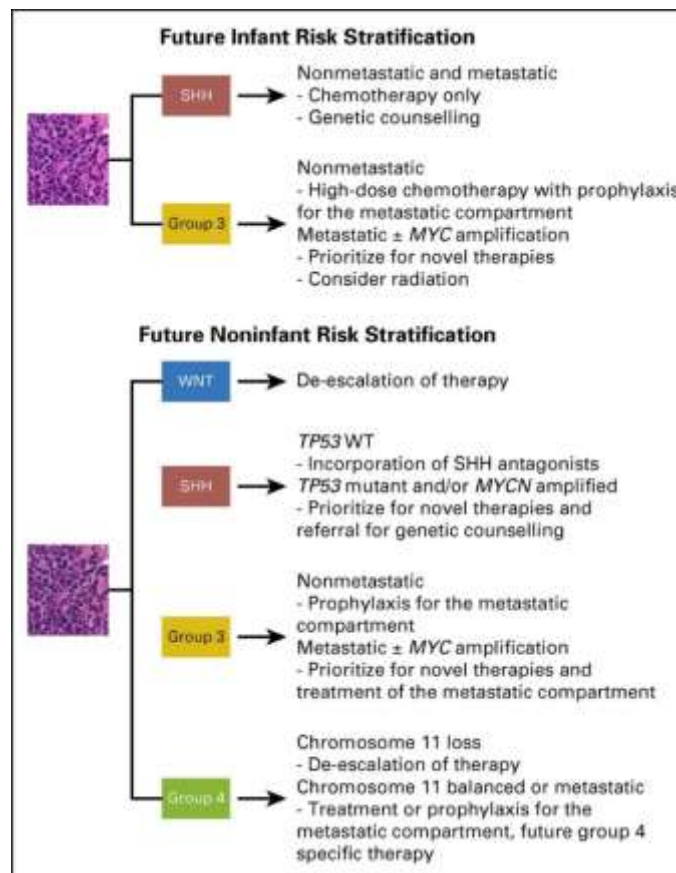


Figura 4. Ejemplo de propuesta de estratificación clínica de riesgo y tratamientos en futuros ensayos clínicos de pacientes con meduloblastoma con base en características moleculares⁵ (Ramaswamy & Taylor, 2019).

Empero, no hay que perder de vista que para el establecimiento del subgrupo molecular se requieren enfoques confiables de clasificación que se puedan aplicar de forma reproducible a los diferentes tipos de material disponible en el entorno clínico, como pequeñas biopsias, material congelado o tejido fijado en formol e incluido en parafina (FFPE), ya sea de tumor primario, metástasis o recidiva.

2.3 Métodos de clasificación molecular

La biología molecular provee información diagnóstica, terapéutica y pronóstica en múltiples áreas de la patología, de forma sobresaliente en el área neuro-oncológica, pero para ofrecer a los pacientes dichos beneficios es importante elegir de forma apropiada el método a utilizar²³. La OMS 2016 no refiere algún método específico para la clasificación molecular¹⁵, la tabla 2 resume las principales ventajas y desventajas de algunos métodos vigentes de clasificación molecular de los meduloblastomas.

Tabla 2. Métodos para clasificación molecular de los meduloblastomas (adaptado de Orr, 2020) ^{7,32} .		
Método	Ventajas	Desventajas
Inmunohistoquímica	<ul style="list-style-type: none"> - Relativamente fácil de implementar. - Costo económico menor. - Disponibilidad amplia en laboratorios de patología. - Utiliza macromoléculas relativamente estables (proteínas). - Puede utilizarse en muestras con poco tejido tumoral. - Puede utilizarse en tejido fijado en parafina. 	<ul style="list-style-type: none"> - Puede ser un reto de interpretación en laboratorios con bajos volúmenes de muestras. - La diferenciación divergente puede dar lugar a clasificaciones indeterminadas. - No diferencia entre los grupos 3 y 4.
Expresión de genes	<ul style="list-style-type: none"> - Distingue entre los cuatro grupos moleculares. - Puede utilizarse en tejido fijado en formol y en tejido congelado. - El costo económico, dependiendo de la técnica va de moderado a alto. 	<ul style="list-style-type: none"> - No está disponible en todos los laboratorios de patología. - Según el método puede utilizarse RNA, una macromolécula relativamente inestable. - Requiere tumor relativamente “puro”.
Metilación de DNA	<ul style="list-style-type: none"> - Distingue entre los cuatro grupos moleculares. - Existen grandes series disponibles. - Puede utilizarse en tejido fijado en formol y en tejido congelado. - Utiliza DNA, una macromolécula relativamente estable. - Puede añadir a la clasificación subtipos dentro de los grupos moleculares y se pueden detectar anomalías relevantes como las amplificaciones de MYC, NMYC y GLI. 	<ul style="list-style-type: none"> - La disponibilidad en los laboratorios de patología es limitada. - El costo económico es alto. - No todas las muestras contienen suficiente cantidad de DNA para la clasificación.
Hibridación <i>in situ</i> Fluorescente	<ul style="list-style-type: none"> - Evalúa las amplificaciones MYC y NMYC. - Los resultados son relativamente rápidos. 	<ul style="list-style-type: none"> - Es de bajo nivel de clasificación porque sólo identifica las amplificaciones en los dos genes mencionados.
Secuenciación de DNA	<ul style="list-style-type: none"> - Puede realizarse en la mayoría de los laboratorios moleculares modernos. - Puede utilizarse en tejido fijado en formol y en tejido congelado. - Utiliza DNA. 	<ul style="list-style-type: none"> - Muchos meduloblastomas no contienen mutaciones definitorias (grupos 3 y 4). - Existen mutaciones cruzadas. - El costo económico es alto.

2.4 Expresión de genes

Fue el primer método descrito para la clasificación molecular de los meduloblastomas y se basó en la tecnología Nanostring N-Counter. Mediante dicha técnica, en el año 2012(2), Northcott y colaboradores desarrollaron un panel validado y reproducible que de acuerdo con la expresión génica pueden clasificar los meduloblastomas en los 4 grupos moleculares (fig. 5)³³.

Gene symbol	Accession	Gene description	Cytoband	Subgroup-specific fold-change
WNT				
<i>WIF1</i>	NM_007191	WNT inhibitory factor 1	12q14.3	236.4
<i>TNC</i>	NM_002160	tenascin C	9q33	65.9
<i>GAD1</i>	NM_000817	glutamate decarboxylase 1 (brain, 67 kDa)	2q31	63.2
<i>DKK2</i>	NM_014421	dickkopf homolog 2 (<i>Xenopus laevis</i>)	4q25	55.9
<i>EMX2</i>	NM_004098	empty spiracles homeobox 2	10q26.1	44.7
SHH				
<i>PDLIM3</i>	NM_014476	PDZ and LIM domain 3	4q35	32.1
<i>EYA1</i>	NM_172059	eyes absent homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	8q13.3	20.8
<i>HHIP</i>	NM_022475	hedgehog interacting protein	4q28-q32	19.9
<i>ATOH1</i>	NM_005172	atonal homolog 1 (<i>Drosophila</i>)	4q22	15.6
<i>SFRP1</i>	NM_003012	secreted frizzled-related protein 1	8p12-p11.1	15.5
Group C				
<i>IMP2</i>	NM_016247	interphotoreceptor matrix proteoglycan 2	3q12.2-q12.3	15.1
<i>GABRA5</i>	NM_000810	gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptor, alpha 5	15q11.2-q12	14.6
<i>EGFL1</i>	NM_198283	eyes shut homolog (<i>Drosophila</i>)	6q12	13.4
<i>NRL</i>	NM_006177	neural retina leucine zipper	14q11.1-q11.2	11.5
<i>MAB21L2</i>	NM_006439	mab-21-like 2 (<i>C. elegans</i>)	4q31	10.9
<i>NPR3</i>	NM_000908	natriuretic peptide receptor C/guanylate cyclase C (atrionatriuretic peptide receptor C)	5p14-p13	8.2
Group D				
<i>KCNA1</i>	NM_000217	potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 1 (episodic ataxia with myokymia)	12p13.32	16.4
<i>EOMES</i>	NM_005442	eomesodermin	3p21.3-p21.2	13
<i>KHDRBS2</i>	NM_152688	KH domain containing, RNA binding, signal transduction associated 2	6q11.1	10.8
<i>RBM24</i>	NM_153020	RNA binding motif protein 24	6p22.3	10.7
<i>UNC5D</i>	NM_080872	unc-5 homolog D (<i>C. elegans</i>)	8p12	10.7
<i>OAS1</i>	NM_016816	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46 kDa	12q24.1	10.5

Figura 5. Panel con 22 genes específicos para categorizar los meduloblastomas en cuatro subgrupos moleculares elaborado por Northcott y cols. (tomada de Northcott P, Shih D, Remke M, Cho Y, et al., 2012)³³.

Utilizando entre 5 y 6 genes específicos para cada subgrupo, crearon un panel final de 22 genes que demostraron una precisión de 98% en la clasificación molecular de los 101 casos de la cohorte original. Dicho panel fue validado en tres cohortes independientes y entre las conclusiones del proyecto se refiere que el ensayo de NanoString es capaz de predecir en 88% el grupo molecular de muestras nuevas de tejidos incluidos en parafina con una precisión grupal de 100%³³. En adición, este método fue reproducido por Leal y colaboradores (2018) en una corte brasileña de 104 muestras en donde 100% fue clasificable³⁴.

Las ventajas del NanoString N-Counter son que distingue entre los cuatro grupos moleculares y que puede utilizar tejido fijado en parafina, pero las principales desventajas son el costo económico elevado del equipo, la variabilidad en las plataformas de perfiles de transcripción al comparar las bases de datos⁷ y que la efectividad disminuye de forma proporcional a los años de almacenamiento de la muestra en bloques de parafina.

Por ello, se han realizado estudios con otros métodos como los ensayos RT-qPCR y los microarreglos para identificar la expresión de los genes propuestos por Northcott y cols.

En 2013 Kunder y colaboradores realizaron un estudio en el que utilizaron RT-PCR para validar la expresión diferencial de 12 genes y 9 microRNAs y obtuvieron una eficacia del 97% en la clasificación molecular de los cuatro grupos. El set de genes y miRNA fue validado contra un grupo de 34 meduloblastomas clasificado mediante NanoString³².

Por su parte, en 2019, Cruzeiro y colaboradores modificaron el panel de 22 genes a uno de 20 genes, a partir del cual clasificaron una muestra brasileña de 92 meduloblastomas en los cuatro subgrupos moleculares mediante arreglos de baja densidad Taqman (TLDA). Para probar el panel utilizaron la muestra de 763 meduloblastomas del estudio de Cavalli y colaboradores (2017) y posteriormente validaron el panel comparando los resultados de 11 muestras aleatorias de la muestra brasileña principal mediante metilación de DNA³⁵.

La asignación de los grupos moleculares resultó efectiva en 94.29% de los casos WNT, en 99.1% de los casos SHH, en 92.36% de los casos del subgrupo 3 y en 95.4% de los casos del subgrupo 4³⁵.

Por lo tanto, la eficacia del NanoString como de los ensayos RT-PCR es similar, no obstante, la segunda es una técnica más económica y accesible en la mayoría de los laboratorios de patología (tabla 3).

Tabla 3. Comparación entre el precio estimado y el tiempo de entrega de resultados de los métodos NanoString, TLDA y RT-PCR para la expresión de genes²⁴

Método	Estudios con metodología propuesta	Precio estimado del equipo	Tiempo de entrega de resultados estimado
NanoString	Northcott y cols.	287,817.60 USD	3-4 días
PCR/TLDA	Cruzeiro y cols.	92,600.00 USD	1 día
PCR	Kunder y cols.	30,000.00 USD	1 día

2.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La PCR es una técnica de biología molecular desarrollada por Kary Mullis en 1986 cuyo efecto es copiar millones de veces una secuencia específica de DNA blanco mediante una catálisis realizada por una DNA polimerasa, de forma que pequeñas cantidades de DNA puedan sintetizarse y copiarse fielmente para un análisis específico³⁶.

Cuando para la reacción se utiliza DNA génico se habla de la PCR convencional, pero si el sustrato es DNA complementario (cDNA) entonces se habla de una PCR con transcriptasa reversa (RT-PCR) a partir de RNA total³⁶.

Los elementos necesarios para la reacción son³⁶:

- Templado: cadena de DNA que funcionaran como molde.
- DNA polimerasa: enzima que sintetiza las nuevas cadenas con la secuencia blanco.
- Primers: secuencias de oligonucleótidos que delimitan y son complementarios a la secuencia blanco. El tamaño suele oscilar entre 15 y 25 pares de bases (pb) y la cantidad de C-G no debe superar 55% de la secuencia. Para la PCR se utilizan dos secuencias de primers, una denominada *forward* (sentido) y otra *reward* (contrasentido), a partir de las cuales se hibrida el templado y se extienden las cadenas de DNA por la Taq polimerasa en dirección 5'-3'.
- Desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs): bases nitrogenadas (adenina, timina, citosina y guanina) con las que la Taq polimerasa construye las nuevas cadenas de DNA.
- Buffer: solución amortiguadora que generalmente está compuesta por Tris-HCL.
- Ión magnesio (Mg⁺): cofactor enzimático, puede estar incluido en el buffer.
- Agua destilada libre de nucleasas: disolvente en la reacción.

Cada reacción consta de tres etapas (fig. 7):

- Desnaturalización: se calientan y se separan las cadenas de DNA a partir de las cuales se obtienen los templados.
- Hibridación: se alinean los primers al extremo 3' del templado e hibridan la secuencia complementaria.
- Extensión: la Taq polimerasa actúa sobre el complejo templado-primer y cataliza la reacción, añadiendo dNTPs complementarios para la creación de cadenas completas de DNA.

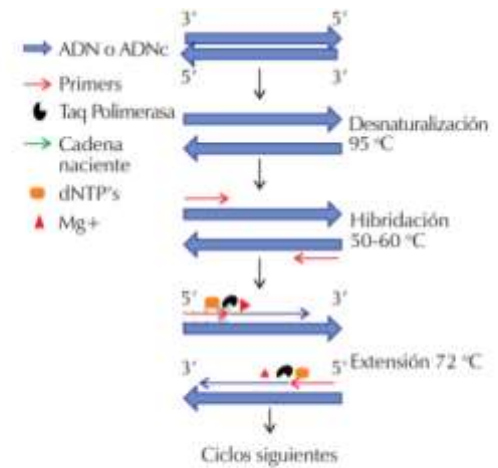


Figura 6. Cada ciclo de la PCR consta de tres etapas (tomada de Tamay de Dios L, Ibarra C y Velasquillo C., 2013)³⁶.

El paso siguiente es el análisis del producto de amplificación. Para ello, se visualizan los amplicones a través de electroforesis en gel de agarosa (fig. 7).



Figura 7. A través del gel de agarosa los amplicones se representan mediante bandas de tamaño específico de acuerdo con los PB que son comparadas con marcadores con peso molecular conocido (tomada de Tamay de Dios L, Ibarra C y Velasquillo C., 2013)³⁶.

PCR en tiempo real

Esta variante de la PCR se caracteriza porque simultáneamente se amplifica y se cuantifica de forma absoluta el producto. Las bases se remontan a los trabajos de Huguichi y colaboradores, quienes videograbaron en tiempo real la incorporación de bromuro de etidio al DNA en cada ciclo de la PCR en 1992³⁶.

La designación de “tiempo real” se refiere a que en cada ciclo de la reacción se detectan los productos amplificados, de forma que es posible cuantificar la cantidad de DNA en la muestra, a diferencia de la PCR punto final. Si se utiliza DNA genómico entonces la designación es qPCR, pero si se utiliza cDNA entonces es RT-qPCR³⁶.

Los elementos utilizados en el PCR punto final son los mismos para la qPCR, pero usualmente se utiliza un “master mix” que contiene ya la polimerasa, dNTPs, Mg⁺, el buffer y el sistema de fluorescencia. Una ventaja de la qPCR es que la cantidad de RNAm que puede detectar puede ser en concentraciones bajas, a diferencia de la PCR punto final³⁶.

Para la detección de los productos amplificados mediante qPCR se pueden utilizar dos tipos de métodos:

- Específicos: pruebas basadas en hidrólisis y por hibridación. Se caracterizan porque utilizan una señal de fluorescencia que detecta los productos amplificados mediante el principio de “transferencia de energía de resonancia fluorescente”, a partir del cual se transfiere la energía desde un donador fluorescente a un *quencher* (receptor)³⁶.
- No específicos: utilizan moléculas intercambiantes que tienen afinidad por el DNA bicatenario y que al oxidarse generan fluorescencia. La molécula más utilizada suele ser el SYBR Green. Su ventaja frente a los métodos específicos es el menor costo, aunque la desventaja suele ser que las moléculas pueden unirse a cualquier DNA bicatenario, incluso el de los primers³⁶.

En cuanto al análisis de los resultados, éste suele realizarse a través de gráficas de la amplificación generadas por un software encontrado en los termocicladores³⁶.

Capítulo 3. Diseño de la investigación

3.1 Planteamiento del problema

El reconocimiento de los meduloblastomas como tumores complejos ha derivado en un cambio de paradigma diagnóstico, pasando del mero patrón microscópico a la necesidad de integrar la clasificación molecular dentro de la práctica anatomopatológica contemporánea.

Los meduloblastomas se subdividen en al menos cuatro subgrupos moleculares con características genéticas específicas que se correlacionan con variables clínico-patológicas. Al ser una neoplasia con marcada heterogeneidad, el estudio molecular puede ofrecer a los pacientes tratamientos personalizados, permite explorar las vías alteradas en este tipo de tumores y favorece el estudio de nuevos marcadores útiles en el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de la enfermedad.

Por ello, este trabajo propone determinar las variantes moleculares de los meduloblastomas en pacientes atendidos en el HIMFG.

3.2 Pregunta de investigación

¿Cuáles son las variantes moleculares de los meduloblastomas de los pacientes del HIMFG?

3.3 Justificación

El retraso en el diagnóstico molecular de los meduloblastomas puede afectar de forma negativa la supervivencia y calidad de vida de los pacientes. No obstante, esto representa un reto, especialmente, en países con recursos económicos limitados, en donde se ha retrasado el diagnóstico molecular y con ello se puede afectar la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.

Proyectos recientes han propuesto clasificar los meduloblastomas en grupos moleculares utilizando técnicas con métodos económicos, robustos y que están disponibles en la mayoría de los laboratorios de patología en todo el mundo. Este trabajo propone utilizar ensayos RT-qPCR para clasificar los tumores de pacientes del HIMFG en cada uno de los cuatro grupos moleculares con base en los genes propuestos por Northcott y colaboradores³³.

3.4 Hipótesis

Los ensayos de RT-qPCR permitirán clasificar los meduloblastomas de pacientes del HIMFG en cuatro grupos moleculares en al menos 97% de los casos.

3.5 Objetivos

3.5.1 Objetivo general: Clasificar mediante ensayos RT-qPCR los meduloblastomas de pacientes atendidos en el HIMFG de acuerdo con los cuatro grupos moleculares.

3.5.2 Objetivos específicos:

1. Integrar los ensayos RT-qPCR para el diagnóstico molecular de los meduloblastomas en el Laboratorio de Patología Clínica y Experimental del HIMFG.
2. Identificar el grupo molecular predominante de meduloblastomas en pacientes del HIMFG con base en ensayos RT-qPCR.
3. Correlacionar el grupo molecular de los meduloblastomas con los parámetros clínico-patológicos del paciente:
 - a. Edad
 - b. Sexo
 - c. Localización
 - d. Tipo histopatológico

3.6 Metodología

3.6.1 Diseño del estudio: transversal, descriptivo y retrospectivo.

3.6.2 Población de estudio: muestras fijadas en formol e incluidas en parafina con diagnóstico histopatológico de meduloblastoma en el HIMFG entre los años 1990-2020.

3.6.3 Muestreo: no probabilístico por conveniencia (105 casos de meduloblastomas y 20 controles de cerebelo de autopsia de pacientes no oncológicos).

3.6.4 Criterios de inclusión: casos con diagnóstico de meduloblastoma con tejido suficiente y viable (necrosis menor de 30%).

3.6.5 Criterios de exclusión: casos sin bloques de parafina, casos con diagnóstico de recidiva y muestras que contengan ácidos nucleicos degradados.

3.6.6 Descripción de los procedimientos:

A. Actualización de la base de datos y obtención de datos clínico-patológicos.

A partir del estudio previo realizado por Eguía Aguilar y Villavicencio Zepeda, se cuenta con una base de datos de los meduloblastomas diagnosticados entre 1990 y 2016³⁷. Para añadir los años restantes propuestos en este estudio se integraron los meduloblastomas diagnosticados entre 2017 y 2020 a partir de la revisión de las libretas del Departamento de Patología Clínica y Experimental del HIMFG del año correspondiente y se obtuvieron los siguientes datos demográficos: edad, sexo, localización del tumor y tipo histológico. Para complementar los datos faltantes y obtener otros datos importantes como extensión, tratamiento, recurrencia y supervivencia se consultaron los expedientes clínicos localizados en el Departamento de Bioestadística del HIMFG.

B. Extracción de RNA

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

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

El paso siguiente fue eliminar la parafina, para ello:

5. Se agregó 1 ml de xilol y se incubó 2 veces en xilol por 3 min a 42 °C con agitación. Se centrifugó en cada ocasión por 1 min.

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

A continuación se digirieron los tejidos:

8. Se agregaron 350 µl de buffer de digestión por muestra y se incubó a 42 °C hasta que no se observó tejido. La tabla 4 se utilizó para colocar el buffer de digestión por muestra. La otra opción fue preparar un volumen mayor, por ejemplo 50 ml, pero solo agregar Tris, EDTA y SDS. En cualquier caso, se guardaron a TA y de esta solución se agregaron 335 microlitros más 15 microlitros de proteinasa K.

Tabla 4. Componentes y volúmenes para buffer de digestión por muestra			
Componentes	Stock	Con. deseada	Vol.
Tris_HCl pH 7.8	1 M	20mM	7 µl
EDTA	0.5 M	10 mM	7 µl
Prot. K	20 mg/ml	500 µg/ml	14 µl
SDS	10 %	1 %	35 µl
H ₂ O			287 µl
Vol. total			350 µl

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

Para continuar se realizó la extracción de RNA:

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

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

Posteriormente se realizó el tratamiento con DNAsa:

16. La pastilla de RNA se resuspendió en 30 μ l de agua libre de nucleasas y se colocó en cada muestra 1 μ l de buffer DNAasa 10X (Thermo Scientific) + 1 μ l de DNasa (1U/ μ l) (cat. EN0521, Thermo Scientific). Se incubó la solución por 30 min a 37 °C y al cabo de ese tiempo se incubó 10 min a 65 °C para inactivar a la DNasa.
17. La determinación de la pureza y concentración de la solución se analizó mediante nanodrop.

C. Ensayo RT-PCR

RT-PCR punto final

Para la síntesis de cDNA se utilizó 1 μ g de RNA de cada tumor y el kit First Strand (cat K1612, Thermo Scientific). La tabla 5 muestra los volúmenes utilizados para la síntesis de una muestra de cDNA.

Tabla 5. Componentes y volúmenes para la síntesis de una muestra de cDNA.	
Componentes	Volumen
RNA	2 μ l
Primer Random Hexámeros 100 μ M , 0.2 μ g/ μ l (6A260 U/mL)	1 μ l
Agua libre de nucleasas	8 μ l
5X Buffer 250mM Tris-HCL (pH8.3), 250 mM KCL, 20 mM MgCl ₂ , 50 mM DTT	4 μ l
Inhibidor de RNAsa (200/ μ l)	1 μ l
10 mM dNTP Mix	2 μ l
M-multiVReverse Transcriptase (20 U*/ μ l)	2 μ l
Total	20 μ l

Las condiciones de incubación fueron a 37 °C por 30 min. Se añadieron 1 μ l 50 mM EDTA y se incubó a 65 °C por 10 min. La hidrólisis del RNA se hizo durante el calentamiento con cationes divalentes en ausencia de agente quelante. Se utilizó la preparación del RNA como templado para la transcriptasa reversa.

La PCR se realizó con el kit Go Taq Flexi DNA Polymerase (cat M8291A, Promega), se utilizaron dos genes endógenos GAPDH y HPRT de 105 y 124 pb, respectivamente. La reacción se realizó como se muestra en tabla 6.

Tabla 6. Componentes y volúmenes para la PCR por muestra.	
Componentes	Volumen
Agua libre de DNAsas y RNAsas REF 10977-015	13.875 μ l
5X Green GoTaq Flexi Buffer	5 μ l
Solución Buffer MgCl ₂ (25 mM)	2 μ l
Nucléotido Mix PCR (10 mM)	0.5 μ l
Foward (10 mM)	0.75 μ l
Reward (10 mM)	0.75 μ l
GoTaq GzFlexi DNA polimerasa (5 u/ μ l)	0.125 μ l
Total	25 μ l

El protocolo de ciclado para la amplificación fue el recomendado por el fabricante (tabla 7):

- Colocar las reacciones en el termociclador precalentado a 95 °C.
- Se realiza un paso inicial de desnaturalización en el que las muestras se calientan a 95 °C por 2 min para asegurarse que el DNA blanco está completamente desnaturalizado. No se recomienda que la duración sea mayor a 2 min.
- El tiempo de extensión debe de ser de al menos 1 min/kb.

Posterior a ello se separan los productos de la PCR mediante electroforesis en el gel de agarosa.

Tabla 7. Condiciones de termociclado para kit Go Taq Flexi DNA Polymerase			
Paso	Temperatura (°C)	Tiempo	Número de ciclos
Desnaturalización inicial	95	2 min	1
Desnaturalización	95	0.5-1 min	25-35
Templanza	42-65	0.5-1 min	
Extensión	72	1 min/kb	
Extensión final	72	5 min	1
Sumersión	4	indefinido	

RT-qPCR

La síntesis de cDNA se realizará con el kit RT2 First strand. Para la qPCR se utilizará el kit RT2 SYBR® Green qPCR Master mix (Qiagen) y los arreglos de 96 pozos Custom RT2 PCR Arrays (Qiagen). La reacción se realizó como se muestra en tabla 8.

Tabla 8. Componentes y volúmenes para el mis de transcriptasa reversa	
Componentes	Volumen
Control P2	1 µl
Agua libre de nucleasas	3 µl
5X Buffer BC3	4 µl
RE3 Reverse Transcriptase Mix	2 µl
Total	10 µl

Las condiciones para la incubación serán: 42 °C por 5 min inmediatamente después detener la reacción mediante incubación d 95 °C por 5 min.

Para preparar el mix para la PCR se ponen los componentes en un tubo de 5 ml según la tabla 9.

Componentes	Volumen
2x RT ² SYBR [®] Green Mastermix	1350 µl
Reacción de síntesis cDNA	102 µl
Agua libre de nucleasas	1248 µl
Total	2700 µl

Las condiciones de ciclado se muestran en la tabla 10.

Ciclos	Temperatura (°C)	Duración	Número de ciclos
1	95	10 min	La DNATaq polimerasa se activa al calentar.
40	95	15 s	Realización de fluorescencia para recolectar datos.
	60	1 min	

La configuración de la placa y los genes propuestos se observan en la figura 8.

Figura 8. Placa de 96 pozos con los genes incluidos para realizar qPCR

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	GAPDH	HPRT1	ETC	NTC	GAPDH	HPRT1	ETC	NTC	GAPDH	HPRT1	ETC	NTC
B	WIF1	TNC	GAD1	DKK2	WIF1	TNC	GAD1	DKK2	WIF1	TNC	GAD1	DKK2
C	EMX2	FOXM3	EYA1	HHP	EMX2	FOXM3	EYA1	HHP	EMX2	FOXM3	EYA1	HHP
D	ATOH1	SFRP1	WFG2	GABRA5	ATOH1	SFRP1	WFG2	GABRA5	ATOH1	SFRP1	WFG2	GABRA5
E	EYS	NRL	MAB21L2	NPR3	EYS	NRL	MAB21L2	NPR3	EYS	NRL	MAB21L2	NPR3
F	ANO2	DISC1	ARHGAP18	OTX2	ANO2	DISC1	ARHGAP18	OTX2	ANO2	DISC1	ARHGAP18	OTX2
G	KCNA1	KHDRB52	BBM24	UNC5D	KCNA1	KHDRB52	BBM24	UNC5D	KCNA1	KHDRB52	BBM24	UNC5D
H	EOMES	GF11	GF18	DDX31	EOMES	GF11	GF18	DDX31	EOMES	GF11	GF18	DDX31

Para la reacción de amplificación se utilizan 2 µl de cDNA. Las condiciones de amplificación son las recomendadas por el fabricante. Se utiliza un termociclador Aria Mx de Agilent. Los genes que se evalúan por RT-qPCR son los 22 genes que han mostrado utilidad para diferenciar entre los cuatro grupos de acuerdo con los estudios de Northcott y cols (2012), Veiga Cruzeiro y cols (2019), Leal y cols (2018) y Kaur y cols (2019).

3.6.7 Plan de análisis de datos:

Para evaluar mediante RT-qPCR los genes descritos en este protocolo se utilizará un termociclador Aria Mx (Agilent). Los valores de Ct (cycle threshold) se registran en una hoja de Excel. Estos valores se analizarán en la plataforma de Análisis Gene Globe de Qiagen. Se utiliza el método de cuantificación relativa con la fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak 2008) donde:

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

Posteriormente, se utilizará el test de Chi cuadrada para determinar las asociaciones entre el panel de genes reportados por Northcott y colaboradores y el diagnóstico molecular en 4 subgrupos de la muestra de pacientes del HIMFG; así como, el diagnóstico molecular por PCR con las características clínico-patológicas (edad, sexo, localización, y tipo histopatológico).

3.6.8 Variables:

A. Variable independiente:

- Alteraciones epigenéticas: modificación en la expresión de genes por modificaciones que no alteran la secuencia del DNA.

Escala de medición: cuantitativa, discreta.

Categoría: Número de copias del gen mRNA.

B. Variable dependiente:

- Variantes moleculares de los meduloblastomas: grupos moleculares reconocidos por la OMS.

Escala de medición: cualitativa, nominal.

Categorías: WNT, SHH, G3 y G4

C. Variables universales

- Edad: edad al momento del diagnóstico según lo expresado en el expediente clínico.

Escala de medición: cuantitativa, discreta.

Categoría: años, meses.

- Sexo: se tomará el género de acuerdo a las notas del expediente.

Escala de medición: cualitativa, nominal.

Categoría: masculino, femenino.

- Localización anatómica de la neoplasia: sitio donde presumiblemente fue el origen del tumor.

Escala de medición: cualitativa, nominal.

Categoría: Fosa posterior, supratentorial, etc.

3.7 Consideraciones éticas:

Con base en el Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud^b, este proyecto se clasifica como investigación sin riesgo debido a que no implica intervenciones directas en individuos³⁸.

Este proyecto cuenta con la aprobación de los comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad del HIMFG (anexo), y como parte de las consideraciones éticas en investigación se salvaguardará la confidencialidad de los datos personales extraídos de los reportes histopatológicos y tanto el protocolo de investigación como los resultados del estudio estarán abiertos al acceso público.

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

Capítulo 4. Resultados preliminares

4.1 Actualización de la base de datos

El trabajo de Eguía Aguilar y Villavicencio Zepeda (2017) obtuvo un universo de estudio de 160 muestras entre 1990 y 2016. En la actualización de dicha base de datos entre 2017 y 2020 se obtuvieron 20 casos. De los cuales tres fueron revisión de laminillas, en tres casos no hubo bloques de parafina, dos casos correspondieron a recidiva tumoral y un caso fue re-clasificado como tumor rabdoide teratoide atípico, por lo que al final se añadieron 11 casos a la base original (tabla 11). Dando un total de 171 casos finales.

Tabla 11. Casos añadidos a la base de datos original	
Q-17-549	Q-19-922
Q-18-67	Q-19-1070
Q-18-704	Q-19-2174
Q-18-2173	Q-20-619
Q-19-539	Q-20-706
Q-19-653	

De los 11 casos añadidos, seis ocurrieron en mujeres y cinco en hombres, por lo que la actualización corresponde a 105 hombres y 66 mujeres. En cuanto a la histología, de los casos nuevos, cinco corresponden a la variante clásica, tres a desmoplásico nodular, dos a la variante con extensa modularidad y uno a la anaplásica/células grandes, por lo que la actualización corresponde a 108 casos clásicos, 45 desmoplásico nodular, 9 nodularidad extensa y 9 anaplásico/células grandes.

Sin embargo, una de las desventajas de trabajar con tejido fijado en formol e incluido en parafina es

4.2 Extracción de RNA

La tabla 12 describe el caso, la concentración y la pureza de las muestras a las que se extrajo el RNA.

Tabla 12. Muestras con extracción de RNA

CASO	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	PUREZA (260/280)	CASO	CONCENTRACIÓN (ng/μl)	PUREZA (260/280)
Q90-1	1511.1	1.89	Q06-1	3606.5	1.68
Q90-2	1019.8	1.83	Q06-2	3241.3	1.87
Q90-3	4624.4	1.87	Q06-3		
Q90-4	605.6	1.8	Q06-4	1140.5	1.83
Q91-1	1472.5	1.94	Q006-5		
Q91-2	3987.9	1.89	Q07-1	2046.9	1.75
Q91-3	3139.7	1.88	Q07-2		
Q91-4	2440.4	1.88	Q07-3	788.6	1.94
Q92-1	3870.9	1.78	Q07-4	693.4	1.89
Q92-2	4674.5	1.9	Q08-1	4171.8	1.84
Q93-1	3805.7	1.87	Q08-2	4534.2	1.82
Q93-2	1262.5	1.87	Q08-3	4388.1	1.87
Q93-3	448.7	1.79	Q08-4		
Q93-4	3900.1	1.81	Q08-5	267.1	1.86
Q93-5	4021	1.82	Q09-1	693.9	1.76
Q93-6	3506.6	1.83	Q09-2	2429.1	1.89
Q94-1	1311.9	1.79	Q09-3	2645.8	1.84
Q94-2	282.7	1.86	Q09-4	301.8	1.77
Q94-5	250.1	1.71	Q10-1		
Q94-6	777.8	1.74	Q10-2	2684.6	1.85
Q94-7	3529.9	1.75	Q11-1	363.3	1.83
Q94-8	2570.9	1.88	Q11-2	3282.4	1.9
Q94-9	492.8	1.9	Q11-3	332.5	1.81
Q95-1	2991.6	1.87	Q11-4	216.8	1.79
Q95-2	3398.5	1.89	Q11-5	4988	1.84

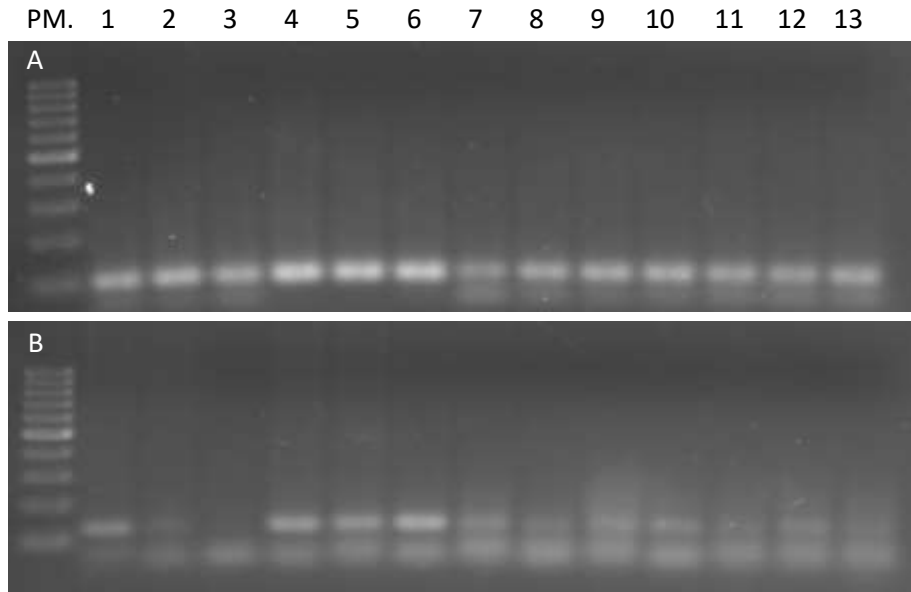
Q96-1	4724.3	1.86	Q11-6	1034.5	1.84
Q96-2	3539.3	1.8	Q11-7	305.2	1.83
Q96-3	402.6	1.81	Q11-8	9588.6	
Q96-4	372.6	1.85	Q12-1	2164.7	1.99
Q96-5	4507	1.8	Q12-2		
Q97-1	1964.2	1.89	Q13-1	9013.1	1.87
Q97-2	3304.3	1.92	Q13-2	2314.6	1.92
Q97-3	845.8	1.84	Q13-3	9688.5	1.85
Q98-1	305.4	1.85	Q13-4	969.3	1.84
Q98-2	513.2	1.88	Q13-5	4943	1.87
Q98-3	3042.5	1.95	Q13-6		
Q98-4	3065.1	1.86	Q13-7		
Q98-5	3945.4	1.95	Q13-8		
Q98-6	122.9	1.66	Q14-1	653.5	1.94
Q99-1			Q14-2		
Q99-2			Q14-3	2017.3	1.87
Q00-1	3012.1	1.91	Q14-4		
Q00-2			Q14-5	1439.2	1.94
Q00-3			Q14-6		
Q01-1	3305	1.78	Q15-1	4393.3	1.9
Q01-2	6846	1.81	Q15-2		
Q01-3	3272.8	1.78	Q15-3	1965.5	1.87
Q01-4	2068.9	1.61	Q15-4	2525.6	1.73
Q01-5	5096.3	1.78	Q15-5		
Q01-6			Q15-6	1559.9	1.83
Q01-7			Q16-1		
Q02-1	7702.2	1.83	Q16-2	1480.3	1.92
Q02-2	3320.1	1.85	Q16-3	3412.9	1.93

Q02-3			Q16-4	9505.9	1.79
Q02-4	5556.9	1.87	Q16-5	2928.4	1.96
Q02-5	9208.6	1.83	Q16-6		
Q02-6	2031	1.78	Q16-7	3657.7	1.85
Q02-7	498.8	1.64	Q16-8		
Q03-1	4291.2	1.84	Q16-9		
Q03-2	5948.8	1.82	Q16-10		
Q03-3	4224.3	1.87	Q17-1		
Q03-4			Q18-1		
Q03-5	382.5	1.92	Q18-2		
Q03-6			Q18-3		
Q03-7	2247.8	1.91	Q18-4		
Q04-1	2849.8	1.9	Q18-5		
Q04-2	5233.2	1.81	Q18-6		
Q04-3	3726.9	1.83	Q19-1		
Q04-4	1397.1	1.61	Q19-2		
Q04-5			Q19-3		
Q05-1	2211.2	1.83	Q19-4		
Q05-2			Q19-5		
Q05-3			Q19-6		
Q05-4			Q20-1		

4.3 RT-qPCR

Se realizó RT-qPCR en 18 muestras aleatorias con genes endógenos GPDH y HPRT para evaluar la calidad e integridad de las muestras.

La siguiente imagen muestra los amplicones en el gel de agarosa mediante el cual se evaluó la amplificación de los genes endógenos A) GAPDH y B) HPRT en una de las muestras.



Debido a que no se terminó el proyecto, éste se continuará y ampliará como trabajo de Maestría en Ciencias Médicas en el Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y de la Salud de la Universidad Nacional Autónoma de México (alumno ya aceptado).

Capítulo 5. Discusión

“Meduloblastoma” es una categoría que integra un espectro de entidades correspondientes a un tumor embrionario de fosa posterior de predominio en la edad pediátrica. La histología por sí sola es un método poco adecuado para la clasificación diagnóstica¹⁶, actualmente es necesario acompañarla de técnicas moleculares, sólo así se podrán dar tratamientos óptimos a cada paciente.

Al personalizar la terapéutica, se mejorará la respuesta frente al tumor y se promoverá una supervivencia con mejor calidad de vida. No existe una pauta para la selección de la prueba para la clasificación molecular de los meduloblastomas, por lo que estudios recientes consideran que al menos dos métodos deben utilizarse, en especial cuando podría haber cambios en el manejo clínico⁵.

Decantarse por una u otra metodología depende de múltiples factores, entre los principales los recursos económicos, materiales y humanos disponibles, pero también de la distribución de los grupos moleculares en la población diana. La tabla 13 resume seis estudios con diferentes metodologías.

Otro aspecto importante a considerar es el tipo de muestra. En general es posible utilizar tejido fijado en formol e incluido en parafina en la mayoría de las metodologías de biología molecular, sin embargo, el tejido congelado ofrece ventajas en cuanto a la ampliación de estudios subsecuentes, además de que puede ser almacenado en bancos de tejidos.

La OMS reconoce cuatro subgrupos moleculares con características genéticas específicas. El grupo WNT y el grupo SHH hacen referencia a la vía molecular alterada, mientras que en los grupos 3 y 4 no está clara la vía de lesión, inclusive, estos grupos comparten características.

El avance continuo de la biología molecular ha permitido reconocer que no sólo entre los cuatro grupos moleculares previamente descritos existen diferencias notables, sino que también dentro de cada subgrupo se presentan variaciones distintivas. En forma de consenso, dichas variaciones se designan con letras griegas mientras que no sea demostrada la alteración específica^{3,7,17,19}.

Tabla 13. Estudios recientes para la clasificación molecular de los meduloblastomas		
Estudio	Metodología	Resultados
Northcott y cols. 2012	NanoString	Se diseñó un panel de 22 genes para diferenciar entre los 4 grupos. La clasificación fue correcta en 98/101 casos (97%).
Kunder y cols. 2013	- PCR - miRNA	Se validó la expresión diferencial de 12 genes (derivados del panel de Northcott y cols) y 9 microRNAs. La eficacia global fue de 97%, con una eficiencia específica por grupo de 100%, 93.3%, 85.7% y 100% en los subgrupos WNT, SHH, 3 y 4, respectivamente
Kaur y cols. 2016	- IHQ - FISH - RT-PCR - miRNA	Se utilizó un panel de 10 IHQ. Se determinó la amplificación de MYC. Se evaluaron 6 genes y 2 miRNA.
Kaur y cols. 2018	- IHQ - CTNNB1 - FISH - Nanostring	- La concordancia ocurrió en 77/87 casos - Los resultados del panel de tres IHQ (GAP1 + YAP1 + B- catenina) fue preciso. - El tiempo de almacenamiento que afecta la calidad de las muestras fue en promedio > 8 años TFFP.
Leal y cols. 2018	Nanostring	Reprodujeron el panel y método de Northcott y cols en una corte brasileña de 104 muestras en donde 100% fue clasificable correctamente.
Veiga Cruzeiro y cols. 2019	- TLDA - PCR	Utilizó 20 genes del panel de Northcott y cols y la asignación grupal resultó efectiva en 94.29%, 99.1%, 92.36% y 95.4% de los casos WNT, SHH, grupo 3 y 4, respectivamente.

De esta forma, en cada grupo se han referido los siguientes subtipos moleculares: WNT α , WNT β , SHH α , SHH β , SHH γ y SHH δ , Grupo 3 α , Grupo 3 β y Grupo 3 γ , Grupo 4 α , Grupo 4 β y Grupo 4 γ .

El reconocimiento de múltiples subtipos plantea la posibilidad de considerar que los cuatro grupos moleculares hasta ahora reconocidos puedan ser simplificaciones de las verdaderas subestructuras moleculares^{28,29}.

Estudios como la meta-análisis internacional elaborada por Sharma y colaboradores en el 2019 ponen de manifiesto la necesidad de un conocimiento más profundo de la complejidad

molecular en la patogénesis de los meduloblastomas. Con un universo de 1501 meduloblastomas, mediante metilación de DNA conjunta de los grupos 3 y 4 describieron un espectro de 8 subtipos moleculares (I a VIII), los cuales pueden correlacionarse con diferentes variables demográficas, histológicas, clínicas, moleculares y de supervivencia (fig. 9). Asimismo, identificaron evidencia que apoya la subdivisión del subtipo VII en VII-A y VII-B²⁹.

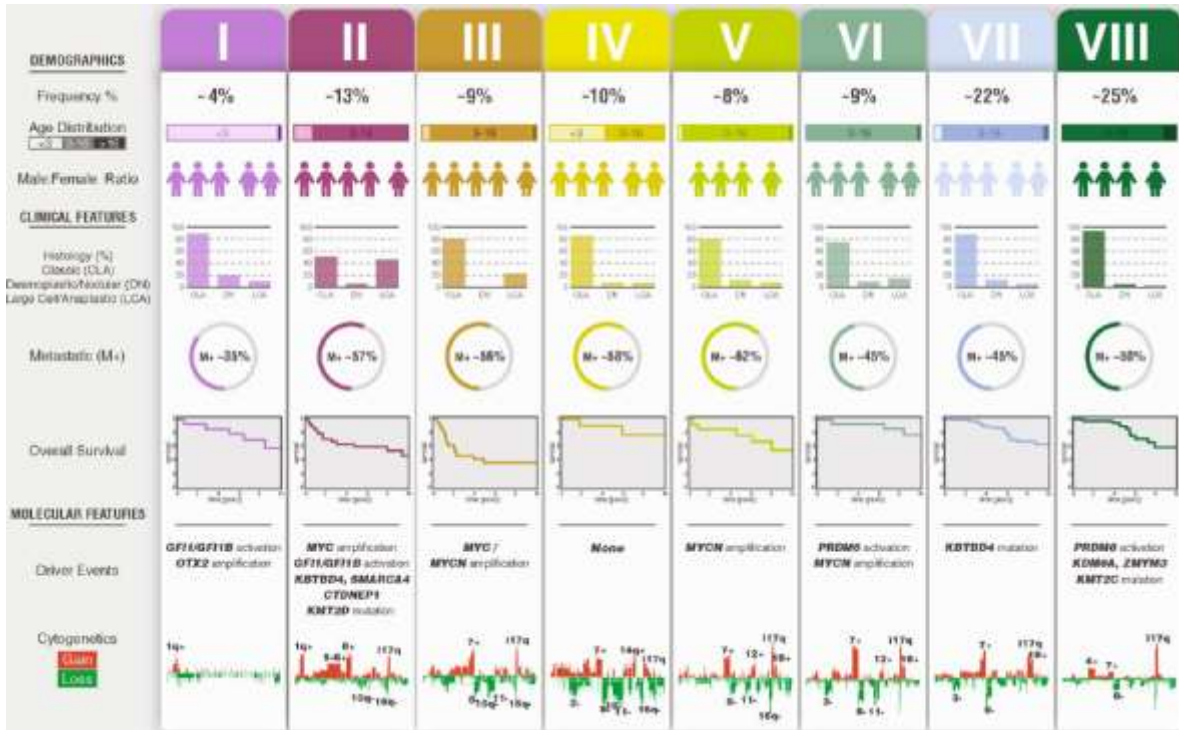


Figura 9. Subtipos moleculares descritos por Sharma y colaboradores, los cuales representan un continuo entre los subgrupos 3 y 4 (tomada de Sharma, Schwalbe E, Williamson D, Sill M et al. 2019).

Capítulo 6. Conclusiones

1. Debido a que el meduloblastoma es una neoplasia con una marcada heterogeneidad intertumoral, proporcionar un diagnóstico molecular permitirá dar tratamientos óptimos a cada paciente personalizando su terapéutica, mejorará la respuesta frente al tumor y promoverá una supervivencia con mejor calidad de vida.
2. La importancia de reconocer los cuatro grupos moleculares de los meduloblastomas radica en que actualmente puede ser un mejor indicador pronóstico tanto de la supervivencia global como de la supervivencia libre de recurrencias.
3. A pesar de los beneficios y aplicaciones del diagnóstico integrado, su desarrollo se ha retrasado en países con recursos económicos limitados, afectando la supervivencia y calidad de vida de los pacientes.
4. Implementar metodologías de biología molecular accesibles como la PCR representa una oportunidad de aplicabilidad en los laboratorios de patología.
5. El avance continuo de la biología molecular ha permitido reconocer variación intragrupal entre los cuatro subgrupos de meduloblastoma. En forma de consenso, dichas variaciones se designan con letras griegas mientras que no sea demostrada la alteración específica.
6. El reconocimiento de subtipos moleculares plantea la posibilidad de considerar que los cuatro grupos moleculares hasta ahora reconocidos puedan ser simplificaciones de las verdaderas subestructuras moleculares.

Cronograma de actividades:

ACTIVIDAD	JULIO 2020	AGOSTO	SEPT	OCT	NOV	DICI	ENERO 2021	FEBRERO	MARZO	ABRIL	MAYO 2021
Selección y delimitación del tema	X										
Realización del protocolo	X	X									
Desarrollo del marco teórico		X	X								
Actualización de base de datos				X	X						
Extracción de RNA	Se pospuso por la contingencia					X	X	X			
Realización de RT-qPCR	Se pospuso por la contingencia								X	X	X
Análisis de resultados preliminares										X	X
Elaboración del manuscrito											X
Revisión del manuscrito por los tutores											X
Entrega de la tesis											X

Alcances del estudio:

Integrar de manera rutinaria los ensayos PCR en el diagnóstico histopatológico de los meduloblastomas en el Departamento de Patología Clínica y Experimental del HIMFG puede abrir la puerta para la aplicación de medicina personalizada.

Conocer la distribución de los subgrupos moleculares de los meduloblastomas atendidos en el HIMFG puede ampliar la línea de investigación.

Limitación del estudio:

De abril a noviembre 2020 se mantuvo cerrado el departamento de biología molecular por lo que se retrasó la extracción del RNA y los ensayos PCR.

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

Referencias:

1. Northcott P, Shih H, Peacock J, et al. Subgroup-specific structural variation across 1,000 medulloblastoma genomes. *Nature* 2012 488:49–56.
2. Juraschka K, & Taylor M. Medulloblastoma in the age of molecular subgroups: a review. *J Neurosurg Pediatr* 2019, 24, 353-363.
3. Northcott P, Robinson G, Kratz C, et al. Medulloblastoma. *Nature reviews: Disease primers* 2019, 5:11.
4. Kaur K, et al. Approach to molecular subgrouping of medulloblastomas: comparison fo NanoString nCounter assay versus combination of immunohistochemistry and fluorescence in-situ hybridization in resource constrained centres. *Journal of Neuro-Oncology* 2019. Springer Nature.
5. Ramaswamy V & Taylor M. Medulloblastoma: From Myth to Molecular. *J Clin Oncol* 2017, 35:2355-2363.
6. Ellison DW, Giangaspero F, Ebehart CG, Haapasalo H, Pietsch T, Wiestler OD. Medulloblastoma (Chapter 8). In: *WHO Classification of Tumors of the Central Nervous* 2016: 183-200.
7. Orr B A. Pathology, Diagnostics, and Classification of Medulloblastoma. *Brain Pathology* 2020. DOI 10.1111/bpa.12837.
8. Quinlan A & Rizzolo D. Understanding Medulloblastoma. *Journal of the American Academy of Physician Assistants* 2017, 30(10):30–36.
9. Millard N & De Braganca K. Medulloblastoma. *J Child Neurol* 2016, 31(12):1341-1353.
10. Northcott P, Dubuc A, Pfister S & Taylor M. Molecular subgroups of medulloblastoma. *Expert Rev Neurother* 2012, 12(7): 871-884.
11. Yachnis A & Perry A. Embryonal neoplasms of the central nervous system, in Perry A & Brat D J (eds). *Practical Surgical Neuropathology. A diagnostic approach*. 2nd ed. Elsevier, 2018: 233-258.
12. Ramaswamy V, Remke M, Bouffet E, et al. Risk stratification of childhood medulloblastoma in the molecular era: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2016. DOI 10.1007/s00401-016-1569-6.

13. Alharbi M, Mobark N, Bashawri Y, Safieh L, et al. Methylation Profiling of Medulloblastoma in a Clinical Setting Permits Sub-Classification and Reveals New Outcome Predictions. *Front Neurol* 2020, 11:167.
14. Kleinschmidt-DeMasters B, Rodríguez F & Tihan T. *Medulloblastoma in Diagnostic Pathology: Neuropathology 2nd ed.* Elsevier 2016: 244-257.
15. Pietsch T & Haberler C. Update on the integrated histopathological and genetic classification of medulloblastoma –a practical diagnostic guideline. *Clinical Neuropathology* 2016, 35(6): 344-352.
16. Armstrong D, Halliday W, Hawkins C & Takashima S. *Pediatric Neuropathology. A text-atlas.* Springer 2007: 312-313.
17. Taylor M, Northcott P, Korshunov A, et al. Molecular subgroups of medulloblastoma: the current consensus. *Acta Neuropathol* 2012, 123:465-472.
18. Archer T, Mahoney E & Pomeroy S. Medulloblastoma: Molecular Classification-Based Personal Therapeutics. *Neurotherapeutics* 2017, 14:265-273.
19. Cavalli F, Remke M, Rampasek L, et al. Intertumoral Heterogeneity within Medulloblastoma Subgroups. *Cancer Cell* 2017, 31, 737–754.
20. Kuzan-Fischer C, Juraschka K & Taylor M. Medulloblastoma in the molecular era. *J Korean Neurosurg Soc* 2018, 61(3):292-301.
21. Kaur K, Kakkar A, Kumar A, et al. Integrating molecular subclassification of medulloblastoma into routine clinical practice: a simplified approach. *Brain Pathology* 2016, 26:334-343.
22. Capper D, Stichel D, Sahm F, Jones D, et al. Practical implementation of DNA methylation and copy-number-based CNS tumor diagnostics: the Heidelberg experience. *Acta Neuropathologica* 2018, 136:181-210.
23. Kristensen B, Priesterbach-Ackley L, Petersen J & Wesseling P. Molecular pathology of tumors of the central nervous system. *Annals of Oncology* 2019, 30: 1265-1278.
24. Northcott P, Korshunov A, Witt H et al. Medulloblastoma comprises four distinct molecular variants. *Journal of Clinical Oncology* 2011, 29(11):1408-1414.
25. Skowron P, Ramaswamy V & Taylor M. Genetic and molecular alterations across medulloblastoma subgroups. *Mol Med* 2015, 93:1075–1084. DOI 10.1007/s00109-015-1333-8.

26. Kumar R, Liu A, Orr B, Northcott P & Robinson G. Advances in the classification of pediatric brain tumors through DNA methylation profiling: from research tool to frontline diagnostic. *Cancer* 2018, doi:10.1002/cnr.31583.
27. Roussel M & Stripay J. Epigenetic Drivers in Pediatric Medulloblastoma. *Cerebellum* 2018, 17:28-36.
28. Northcott P, Buchhalter I, Morrissy A, Hovestadt V et al. The whole-genome landscape of medulloblastoma subtypes. *Nature* 2017, 547(7663):311-317. doi:10.1038/nature22973.
29. Sharma T, Schwalbe E, Williamson D, Sill M et al. Second-generation molecular subgrouping of medulloblastoma: an international meta-analysis of Group 3 and Group 4 subtypes. *Acta Neuropathologica* 2019, 138:309-326.
30. Wood M, Halfpenny A & Moore S. Applications of molecular neuro-oncology- a review of diffuse glioma integrated diagnosis and emerging molecular entities. *Diagnostic Pathology* 2019, 14:29.
31. Louis D, Perry A, Burger P, Ellison W, et al. International society of neuropathology- Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2014, 24(5):429-35.
32. Kunder R, Jalali R, Sridhar E, Moiyadi A, et al. Real time PCR assay based on the differential expression of microRNAs and protein-coding genes for molecular classification of formalin-fixed paraffin embedded medulloblastomas. *Neuro-Oncology* 2013, 15(12):1644-1651.
33. Northcott P, Shih D, Remke M, Cho Y, et al. Rapid, reliable, and reproducible molecular sub-grouping of clinical medulloblastoma samples. *Acta Neuropathol* 2012, 123: 615-626.
34. Leal L, Evangelista A, de Paula F, et al. Reproducibility of the Nano String 22-gene molecular subgroup assay for improved prognostic prediction of medulloblastoma. *Neuropathology* 2018, doi:10.1111/neup.12508.
35. Veiga Cruzeiro G, Bezerra K, Oliveira C, Baumgartner M, et al. A simplified approach using Taqman low-density array for medulloblastoma. *Acta Neuropathologica Communications* 2019, 7:33.

36. Tamay de Dios L, Ibarra C y Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investigación en Discapacidad* 2013, 2(2); 70-78.
37. Villavicencio Zepeda FJ y Eguía Aguilar MP. Clasificación molecular de los meduloblastomas en los pacientes del Hospital Infantil de México Federico Gómez/tesis que para obtener el grado de Especialista en Medicina (Patología Pediátrica) 2017, Universidad Nacional Autónoma de México.
38. Reglamento de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud. Junio 2020, sitio web: <http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>.

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



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

Ciudad de México, a 23 de abril de 2019

DG/1000/ 293 /2019

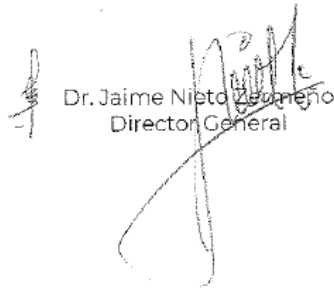
Dra. Pilar Eguía Aguilar
Departamento de Patología Clínica y Experimental
Presente

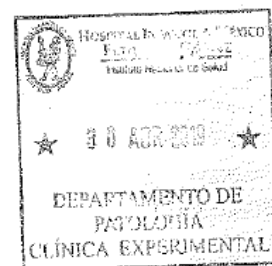
Informo a usted, que los Comités de Investigación, Ética en Investigación y Bioseguridad, después de haber revisado su proyecto HIM-2018-092 FF "CLASIFICACIÓN MOLECULAR DE MEDULOBLASTOMAS PEDIÁTRICOS", han emitido el dictamen de:

APROBADO

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

Atentamente


Dr. Jaime Nieto Zea
Director General



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

JNZ/JGE/MSG/vzn

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

