

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON



**DIAGNÓSTICO “INTEGRADO” DE GLIOMAS DIFUSOS EN
UN PERIODO DE 5 AÑOS EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO, BASADO EN EL ALGORITMO
MOLECULAR DE LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA
ORGANIZACIÓN DE LA SALUD 2016
TESIS**

Dra. Itzel Araceli Ortiz Meza

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALISTA EN ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA**

2020

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

HOSPITAL UNIVERSITARIO

“DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ”

SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA



**DIAGNÓSTICO “INTEGRADO” DE GLIOMAS DIFUSOS EN
UN PERIODO DE 5 AÑOS EN EL HOSPITAL
UNIVERSITARIO, BASADO EN EL ALGORITMO
MOLECULAR DE LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA
ORGANIZACIÓN DE LA SALUD 2016**

PRESENTA

Dra. Itzel Araceli Ortiz Meza

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE ESPECIALISTA
EN ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA**

DIRECTOR: DR. ALVARO BARBOSA QUINTANA.

CO DIRECTOR: DR. MED. JUAN PABLO FLORES GUTIERREZ

MONTERREY, N.L., MEXICO

NOVIEMBRE, 2020

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

HOSPITAL UNIVERSITARIO

"DR. JOSE ELEUTERIO GONZALEZ"

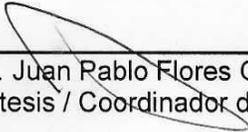
SERVICIO DE ANATOMIA PATOLOGICA Y CITOPATOLOGIA

**DIAGNÓSTICO "INTEGRADO" DE GLIOMAS DIFUSOS EN UN PERIODO DE 5 AÑOS
EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO, BASADO EN EL ALGORITMO MOLECULAR DE
LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE LA SALUD 2016**

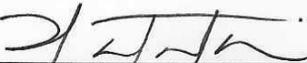
Aprobación de tesis



Dr. Álvaro Barbosa Quintana
Director de tesis



Dr. Med. Juan Pablo Flores Gutiérrez
Co director de tesis / Coordinador de investigación



Dra. Natalia Vilches Cisneros
Coordinador de enseñanza



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe de Servicio



Dr. Med. Felipe Arturo Morales Martínez
Subdirector de Estudios de Posgrado

**DIAGNÓSTICO “INTEGRADO” DE GLIOMAS DIFUSOS EN UN PERIODO DE 5
AÑOS EN EL HOSPITAL UNIVERSITARIO, BASADO EN EL ALGORITMO
MOLECULAR DE LA NUEVA CLASIFICACIÓN DE LA ORGANIZACIÓN DE LA
SALUD 2016**

PRESENTADO POR:

DRA. ITZEL ARACELI ORTIZ MEZA

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL SERVICIO DE ANATOMÍA PATOLÓGICA Y
CITOPATOLOGÍA DEL HOSPITAL UNIVERSITARIO “DR. JOSE ELEUTERIO
GONZALEZ” BAJO LA DIRECCIÓN DEL DR. ALVARO BARBOSA QUINTANA Y LA CO
DIRECCION DEL DR. MED. JUAN PABLO FLORES GUTIÉRREZ



Dra. Med. Oralia Barboza Quintana
Jefe del Servicio de Anatomía Patológica y Citopatología

DICIEMBRE, 2020

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Araceli y Alejandro por encaminar mis pasos y cuidar mi espalda.

A mis maestros, que supieron con su ejemplo mostrarme el mejor lado de la patología.

A mis compañeros y amigos residentes, que hicieron buenos los días malos y excelentes los días buenos.

CONTENIDO

1. RESUMEN	7
2. MARCO TEORICO	9
a) MUTACIONES DE GLIOMAS DIFUSOS.	12
3. ANTECEDENTES	21
4. JUSTIFICACION	24
5. OBJETIVO	26
a) OBJETIVOS SECUNDARIOS	26
6. MATERIAL Y METODOS	26
7. RESULTADOS	34
8. DISCUSION	53
9. ALGORITMO DIAGNOSTICO PROPUESTO	63
10. CONCLUSIONES	63
11. REFERENCIAS	65

RESUMEN

INTRODUCCION Y OBJETIVOS

En 2016 cambió la clasificación histológica por una molecular donde se deben incluir, cuando sea posible los marcadores para gliomas difusos. El objetivo del presente estudio es reportar la graduación e histología de tumores gliales difusos en una serie de casos retrospectiva con estudios moleculares y de inmunohistoquímica.

MATERIAL Y METODOS

En forma retrospectiva analizamos 82 casos de gliomas difusos de 2013 a 2018 en los cuales se incluyó un análisis morfológico y graduación con 3 observadores: dos neuropatólogos y un patólogo quirúrgico general, se tabularon los diagnósticos histopatológicos para cada uno de ellos siguiendo los criterios de la OMS 2016. Se analizaron variables estadísticas entre cada uno de los observadores usando IBM SPSS Statistics y fleiss kappa. Además, se les practico a todos los casos: ATRX, IDH, p53; FISH para codeleción 1p19q para aquellos diagnosticados como oligodendrogliomas, y amplificación de EGFR para los diagnosticados como glioblastoma. Así mismo se hizo correlación entre el diagnostico morfológico y si hubo cambio o no en la clasificación de los gliomas.

RESULTADOS

La concordancia entre tres patólogos respecto al diagnóstico morfológico fue moderada (κ :0.531), pero la reproducibilidad entre el grado histológico entre los patólogos y el diagnóstico integrado fue fuerte (κ : 0.619).

El diagnostico cambio en el 20.8% de los astrocitomas, en 23% de los oligodendrogliomas y 7.3% de glioblastomas.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

A pesar de que morfológicamente la concordancia Inter observador es adecuada, la concordancia en grado histológico es excelente en nuestra experiencia. La peor correlación Inter observador es con los astrocitomas anaplásicos, probablemente causada por la variación en los criterios histológicos de la OMS para distinguir astrocitoma anaplásico y glioblastoma.

En esta serie demostramos que la concordancia entre patólogos experimentados y el diagnostico integrado es buena. Sin embargo, los oligodendrogliomas siguen siendo un reto diagnostico; en nuestra experiencia recomendamos en estos casos dirigir pruebas de FISH, IDH y ATRx. Esto es importante sobre todo en países con acceso limitado a la tecnología como el nuestro.

MARCO TEÓRICO

Los tumores del sistema nervioso central (SNC) representan el 2% de todas las neoplasias a nivel mundial. Actualmente, la tasa de incidencia global de los tumores primarios del SNC es de 10.82 por cada 100 000 personas al año. (1) En América del Norte, según datos de Globocan (2018), se presentan 27062 casos nuevos en ambos sexos, con 19973 muertes al año; convirtiendo a esta región en el cuarto lugar de incidencia y mortalidad debido a tumores de cerebro y sistema nervioso central. Estos parecen ser cada vez más frecuentes, no tanto por un verdadero incremento en su incidencia, sino por el incremento en la expectativa de vida de la población en general y por los avances tecnológicos que permiten un diagnóstico más oportuno con pruebas imagenológicas más avanzadas.

En México, existen pocos registros sobre la prevalencia de estos tumores. Anaya y colaboradores, muestran una cohorte de 20 años agrupando población de todas las edades, sexo y tumores benignos o malignos, lograda en el Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suarez, donde se establece que la mayor prevalencia corresponde a meningiomas (33%) en la población general, y en segundo lugar los gliomas (22%), correspondiendo a 121 pacientes de 511 casos documentados. (26).

En todo el mundo, los tumores malignos primarios más frecuentes del SNC son los gliomas. Se considera que los gliomas se originan a partir de células madre gliales (progenitoras) que desarrollan una característica glial. (2) La mayoría de los gliomas se caracterizan por un crecimiento infiltrado difuso de células tumorales en el parénquima preexistente del SNC. Los gliomas difusos comprenden la mayor parte del "cáncer de cerebro" en adultos.

La clasificación exacta de los gliomas difusos no sólo tiene implicaciones para la atención individualizada de pacientes (al estimar el pronóstico y la terapia guía) y

para la conducta e interpretación de estudios clínicos con nuevos enfoques diagnósticos y terapéuticos, sino también para el análisis y comprensión de los orígenes y comportamientos tumorales, así como para la precisión de las tendencias de las enfermedades basadas en la población que pueden implicar etiologías genéticas. Por lo tanto, las revisiones periódicas de las clasificaciones tumorales tienen efectos diversos e importantes en muchos aspectos de la salud individual y de la población.

Para ello, es indispensable reconocer la tumorigénesis de las lesiones gliales. Durante las últimas décadas, los descubrimientos de varias alteraciones genéticas y vías de señalización anormales han contribuido de manera considerable a nuestra comprensión de la génesis y biología de los gliomas. (3)

Antes de la introducción de las directrices diagnósticas moleculares e histológicas "integradas", los gliomas difusos se clasificaron en una de las siguientes categorías en función de la histología (4): astrocitoma, oligodendroglioma, glioblastoma multiforme o glioma mixto.

Junto con el tipo histológico, los tumores se clasificaron (y aún se clasifican) de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud en grados II, III y IV, que se consideraron como la piedra angular para predecir la agresividad tumoral y la supervivencia del paciente. El criterio diagnóstico para otorgar un grado III es el aumento de características "anaplásicas", que incluyen: aumento en la celularidad, mitosis y anaplasia celular. El criterio para establecer el diagnóstico de grado IV es la proliferación vascular y/o necrosis tumoral, adyacente a datos de "anaplasia". (Figura 1).

Como tal, había mucho margen para la subjetividad y la interpretación variable en los criterios de la OMS anteriores a 2016, que no incluían criterios de corte para distinguir el grado II del grado III.

Además de no tomarse en cuenta una de las características más importantes del glioma difuso: la heterogeneidad en la histología intratumoral. Obligando a establecer el muestreo correcto como factor diagnóstico. Además, otros desafíos y las limitaciones de este esquema se reflejan en subcategorías como "Glioblastoma con componente oligodendroglial", así como "oligoastrocitomas mixtos", que constituyeron una gran proporción de diagnósticos de glioma difuso, anteriores a 2016.

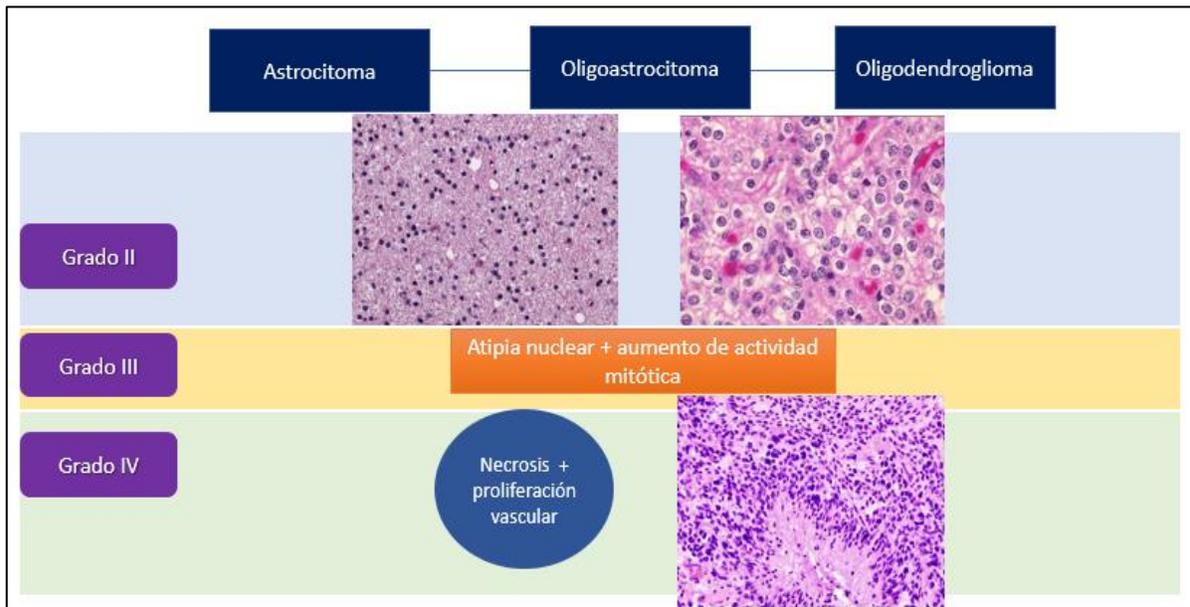


Figura 1. Clasificación de los gliomas difusos en base a su histología (clasificación del 2007).

Como en otros cánceres, los gliomas difusos resultan de alteraciones genéticas que llevan a la inactivación de supresores tumorales y activación de proto-oncogenes.

Los astrocitomas difusos de bajo grado muestran con frecuencia la mutación del gen supresor de tumores TP53 (ubicado en 17p13.1), la pérdida de heterocigosidad (LOH) en el brazo del cromosoma 17p y las ganancias en el brazo largo del cromosoma 7 (7q). En contraste, la pérdida combinada y completa del brazo corto del cromosoma 1 (1p) y del brazo largo del cromosoma 19 (19q) está presente en la gran mayoría de los tumores oligodendrogiales típicos. La

codeleción completa de 1p/19q resulta de una translocación entre los cromosomas 1 y 19. Algunos gliomas diagnosticados histopatológicamente como tumores oligoastrocíticos se parecen genéticamente a los tumores puros de astrocitos u oligodendrogliales. Recientemente, la mutación del gen del isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) (menos comúnmente del gen IDH2) se identificó como un evento común en la oncogénesis de los gliomas difusos anaplásicos y de bajo grado. (Figura 2).

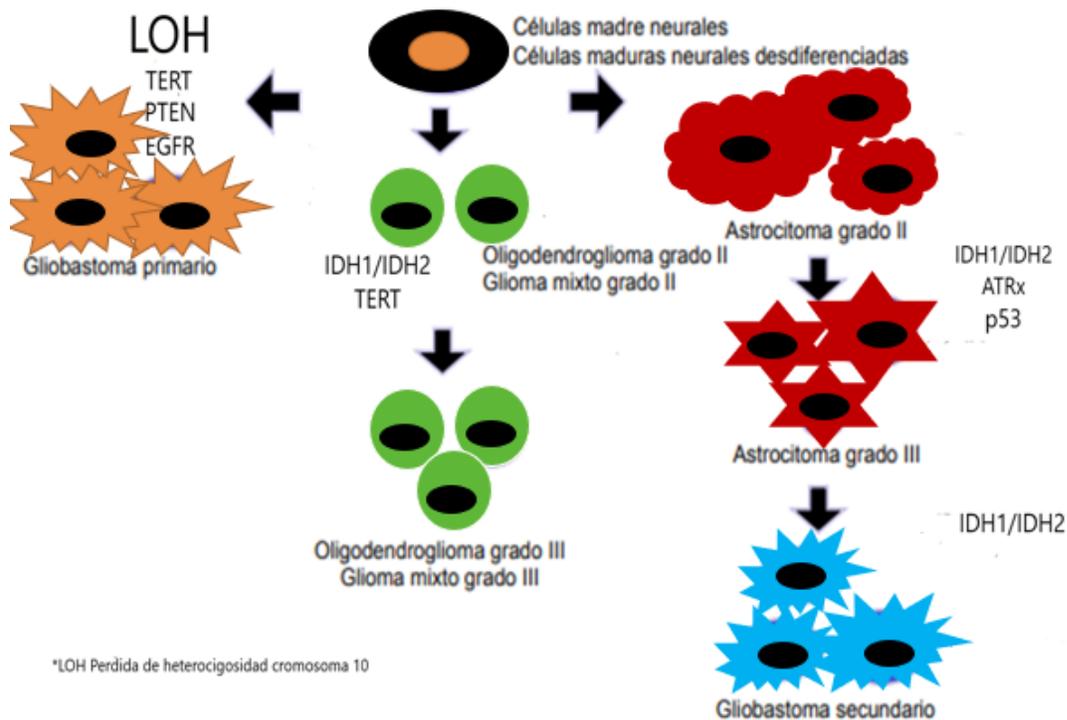


Figura 2. Mutaciones en gliomas difusos.

Mutaciones en gliomas difusos

1. LOH 10q

La pérdida de heterocigosidad (LOH) en el cromosoma 10q ocurre en la mayoría de los glioblastomas, primarios y secundarios en el 60-80%. La pérdida de

heterocigosidad puede definirse como la pérdida en la cual un locus pierde una de las copias de un gen, ya sea por delección o cualquier mecanismo propio. Aunque este es un evento primario para el desarrollo de glioblastoma, debido a su alta frecuencia, no es útil para distinguir uno del otro. (5).

2. IDH1/IDH2

El isocitrato deshidrogenasa-1 (IDH1) es una enzima dependiente de NADP (nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato) que se encuentra en el citoplasma celular (IDH1) y mitocondria (IDH2) (5), la cual normalmente cataliza la

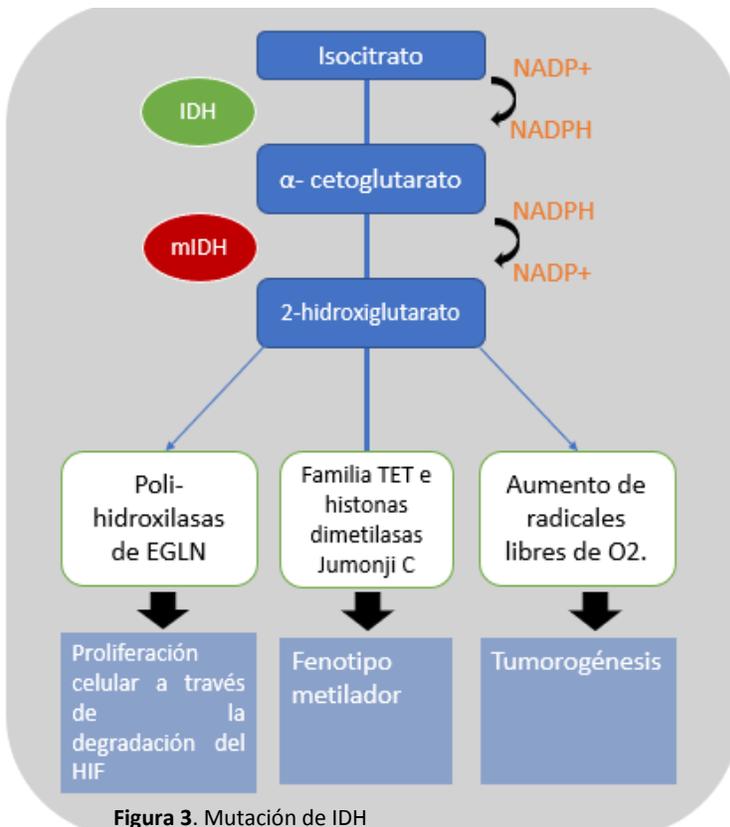


Figura 3. Mutación de IDH

decarboxilación oxidativa de isocitrato, produciendo alfa-cetoglutarato y CO₂, lo cual reduce especies reactivas de oxígeno. Esta enzima tiene 3 isoformas: IDH1, IDH2 e IDH3. (6). Cuando las mutaciones ocurren en IDH1 o IDH2, la enzima mutante desarrolla una afinidad preferencial por el alfa-glutarato en lugar del isocitrato, lo cual lleva a la producción y acumulación de un oncometabolito: 2-

hidroxiglutarato (7); causando una disminución en los niveles de alfa-glutarato y un incremento de radicales libres; estimula la actividad de las polihidroxilasas de EGLN, mejorando la proliferación celular a través de la degradación del factor inducible por hipoxia (HIF); además se incluyen como blanco a las proteínas de la familia TET (TET2) y las histonas dimetilinas Jumonji C. El efecto neto es la

creación de ADN hipermetilado en todo el genoma, denominado “fenotipo metilador de islas CpG en gliomas (G-CIMP)” (8) lo cual favorece la inhibición de genes supresores tumorales. Asimismo, altera otra serie de vías, incluido el incremento del número de células madre, el compromiso en la diferenciación celular y la promoción de la transformación, las cuales favorecen el proceso de formación de tumores (9, 10).

Ambas mutaciones, IDH1 e IDH2 pueden ocurrir en gliomas infiltrantes, mientras que la mutación de IDH2 es mucho menos frecuente que IDH1. Las mutaciones de IDH1 se encuentran aproximadamente en el 70-80% de los gliomas difusos grados II y III y en glioblastomas secundarios. En glioblastomas primarios es menos frecuente (aproximadamente en el 5%). (11). El estado mutacional del isocitrato deshidrogenasa 1 y 2 (IDH1 e IDH2) ahora se reconoce como un discriminador importante de las clases biológicas entre los gliomas difusos. (12).

3. ATRX y PT53.

El gen de ATRX fue descrito por primera vez a través del estudio de pacientes con retraso mental, asociadas al cromosoma X. A partir de entonces, se han realizado múltiples investigaciones para determinar el papel de ATRX en la tumorigénesis de múltiples neoplasias. Se ha encontrado que ATRX se localiza en heterocromatina pericentromérica (PCH), matrices de ADN ribosómico en cromosomas acrocéntricos, telómeros y cuerpos nucleares de leucemia promielocítica (LMP) dentro de células humanas y de ratón. Los cuerpos nucleares de la leucémica promielocítica se han implicado como supresores tumorales, ya que poseen funciones antivirales y posibles reguladores de la replicación de la transcripción del ADN. Por lo tanto, ATRX probablemente juega un papel clave en la regulación de la expresión génica. [46]. Además, juega un papel determinante en el mantenimiento del genoma a través de la interacción con histonas H33.3, en los telómeros y en la heterocromatina pericentromérica. Dentro de los roedores, ATRX previene la activación transcripcional y la accesibilidad a elementos que

dañan el ADN. Se ha visto que en modelos desprovistos de ATRX se han visto asociados con daño al ADN y el estrés replicativo. [47].

Las mutaciones de la proteína remodeladora de la cromatina α -talasemia/síndrome de retraso mental ligado al cromosoma X (ATRX) se han asociado con “alargamiento alternativo de los telómeros” (ALT), un mecanismo independiente de telomerasa usado por las células cancerígenas para superar la senescencia replicativa. (14). Mutaciones sin sentido y truncamiento de ATRX son comunes (90% aproximadamente) en los astrocitomas IDH mutantes, y puede ser detectado por inmunohistoquímica (pérdida de expresión).

Estas mutaciones en gliomas difusos pueden coexistir con mutaciones de TP53 en adultos, y con mutaciones de Histona H³ en niños y adultos jóvenes. Significativamente las mutaciones de ATRX no se han observado en oligodendrogliomas o glioblastomas; esto lo convierte en un marcador útil de linaje astrocítico. Cabe notar, que las mutaciones de ATRX son mutuamente excluyentes con la transcriptasa reversa relacionada a la telomerasa (TERT), las cuales son relacionados con oligodendrogliomas y glioblastomas, con activación de alargamiento telomérico dependiente de telomerasa, en el 78 y 85% de los casos, respectivamente (15,19). Estas mutaciones pueden ser detectadas por secuenciación de ADN.

P53 es una cinasa dependiente de ciclina responsable de la supresión tumoral a través de activación del control de la replicación celular, ubicado en el brazo corto del cromosoma 17 en la banda 13.1 y consta de 11 exones. El gen normal de p53 codifica una fosfoproteína nuclear “p53 kDa” de tipo “salvaje” (wild type), que tiene una vida media muy corta y se encuentra en cantidades tan pequeñas dentro del núcleo celular que no es posible detectarse mediante estudios de inmunohistoquímica. Cuando existen mutaciones del gen, estas dan como resultado la alteración de dicha proteína en forma “mutante”, convirtiéndose en proteínas metabólicas más estables con una vida media más larga, acumulándose en el núcleo y con ello alcanzando un umbral de detección mediante estudios de inmunohistoquímica de rutina. [49, 50, 51].

Aunque no son exclusivas de los gliomas, las mutaciones TP53 son marcadores útiles para el linaje astrocítico en el contexto de las mutaciones IDH. Es más frecuentemente una mutación de sin sentido que resulta en la acumulación de proteína en el citoplasma, resultando en positividad nuclear fuerte en inmunohistoquímica. [16]. La mayoría de los tumores que expresan p53 típicamente tienen un curso más agresivo.

4. Factor de crecimiento epidérmico (EGFR), PTEN

El factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se trata de un miembro de la familia de receptores transmembrana tirosin cinasa que activa las vías de MAPK y PIK3 resultando en proliferación celular. Un grupo separado de deleciones de EGFR y mutaciones puntuales se encuentra con frecuencia en glioblastomas. Las deleciones de EGFR en estos tumores incluyen EGFRvI (delección N-terminal), vII (delección de exones 14-15), vIII (delección de exones 2-7), vIV (delección de exones 25-27), vV (delección de exones 25– 28), entre los que vII y vIII son oncogénicos. [61]. La actividad de tipo quinasa de EGFRvIII es mucho más débil que la del EGFR de longitud completa activado por ligando, y se ha informado que esta débil actividad quinasa constitutiva es suficiente para conferir ventajas de crecimiento a los tumores. La expresión de EGFRvIII se ha encontrado solo en tumores y no en tejido normal, lo que sugiere que es un buen candidato para la terapia dirigida. [62].

Este gen se encuentra amplificado en aproximadamente el 40% de los glioblastomas primarios, comparado con menos del 10% reportado en glioblastomas secundarios, por lo que puede ser usado como apoyo para hacer el diagnóstico diferencial entre glioblastomas primarios y un glioblastoma secundario.

El gen de fosfatasa PTEN normalmente funciona como un regulador negativo de la vía de la cinasa de supervivencia celular PI3K. las mutaciones que inactivan PTEN y deleciones ocurren aproximadamente en el 20% de los glioblastomas. Así mismo, amplificaciones y variaciones de un solo nucleótido en las subunidades

catalíticas reguladoras de la cinasa PI3K (PIK3R, PIK3C, PIK2C2) también pueden encontrarse en aproximadamente el 20% de los glioblastomas. Resultando en una sobreactivación de la vía de PI3K, la cual coopera con otras mutaciones, como EGFR y CDKN2A/B lo cual favorece la oncogénesis y progresión tumoral en el glioblastoma. (11).

5. Codelecion 1p19q

Las deleciones en brazos cromosomales 1p y 19q son las aberraciones genéticas más características de oligodendrogliomas, en el 80% de los oligodendrogliomas clásicos, y en el 60% de los oligodendrogliomas anaplásicos. [17]. Estas deleciones presentan dos papeles de importancia: 1. Como marcador diagnóstico; 2. Como indicador de respuesta a quimioterapia. McNamara y colaboradores [18] demostraron que presentar la deleción ya sea completa, o parcial, confería un aumento significativo de respuesta a quimioterapia con un tiempo de respuesta libre de la enfermedad mayor, sin importar el subtipo histológico.

6. MGMT

Otro determinante molecular con significancia clínica resulta ser el nivel de expresión de MGMT, la cual está determinada en gran parte por el estado de metilación del gen promotor.

El gen MGMT se encuentra en el cromosoma 10q26 y codifica una enzima reparadora del ADN suicida expresada de forma ubicua que elimina los aductos de alquilo de la posición O6 de la guanina. Como la guanina alquilada en O6 conduce a roturas de doble hebra y al mal apareamiento de la base, lo que induce la apoptosis y la muerte celular, la MGMT protege las células normales de los carcinógenos. Desafortunadamente, también protege a las células tumorales de los efectos normalmente letales de la quimioterapia con agentes alquilantes como la temozolomida.

El silenciamiento epigenético de MGMT ocurre en el 40% al 50% de los glioblastomas y puede evaluarse por el estado de metilación de su promotor en pruebas de ADN mediante PCR. La prometilación de MGMT es un predilecto fuerte de la sobrevida a largo término, independiente de otros factores clínicos o tratamiento y se encuentra asociado con una etapa libre de enfermedad más prolongada en pacientes con glioblastomas tratados con quimioterapia y radiación. La metilación ocurre, al igual que la mutación de IDH, en similar frecuencia en gliomas difusos grados II, III y IV. Los glioblastomas secundarios son más frecuentemente relacionados con la metilación del promotor MGMT.

7. *Ki67*

El Ki-67 es una proteína nuclear no histona que se expresa por las células que entran en el ciclo mitótico y se asocia con la transcripción del ARN ribosomal (ARNr) (20). El índice de proliferación es un marcador biológico potente que estima el crecimiento de las neoplasias cuantitativamente y, el porcentaje de expresión es directamente proporcional al grado histológico [21]. Los valores generales de Ki67 reportados por la Organización Mundial de la Salud en su última edición (2016) estiman 4% para astrocitomas difusos, 5-10% para astrocitomas anaplásicos, mientras que los valores promedios para glioblastomas son de 15 a 20% [22].

8. *H3k27m*

La mutación H3K27m es una mutación que convierte lisina en metionina en la posición 27 de la porción N-terminal de la cola de la histona EZH2 es una subunidad de una familia represora polycomb, responsable de la metilación de histona H3 a lisina 27. Su mutación genera una reducción de la metilación en posición 27. Además, su sobreexpresión genera un peor pronóstico en pacientes con gliomas. (27).

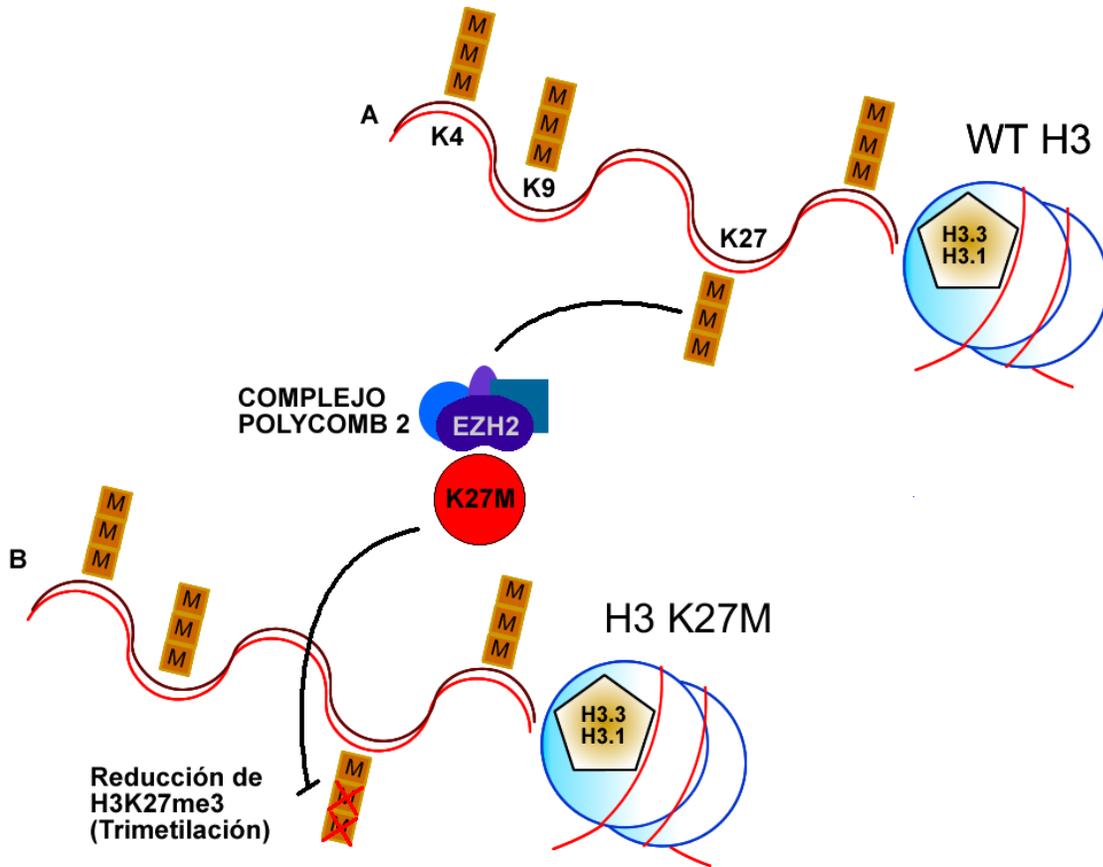


Figura 4. Mutación en Histona 3 (H3k27m)

El glioma difuso de línea media (DMG) mutante H3K27M es diagnóstico recientemente añadido por la OMS (2016). Estos tumores se encuentran en ubicaciones de la línea media como el tronco encefálico, el tálamo, el cerebelo y la médula espinal, y se identifican principalmente en niños. Sin embargo, la presencia de mutación del H3k27m en cualquier astrocitoma, le confiere un grado IV. [29]. Se ha asociado a un mal pronóstico, independientemente del grado histológico. Si bien este tumor es predominante en niños, también puede ocurrir en adultos. Dada la novedad y rareza de la mutación H3K27M en tumores cerebrales adultos, la incidencia y el comportamiento clínico de estos tumores en adultos aún es relativamente desconocida. Ha habido varias series de tumores con mutación H3K27M en adultos que mostraron una incidencia del 50-60% de mutaciones H3K27M en los gliomas de la línea media en adultos localizados en el tronco

encefálico o el tálamo [30]. Sin embargo, la proporción del total de las mutaciones de H3k27m en los gliomas de adultos sigue sin ser clara.

9. *Brachyury*

Se trata de un factor de transcripción necesario para la formación y diferenciación del mesodermo posterior, así como para el desarrollo de la notocorda durante la embriogénesis, y su alteración es asociada con defectos congénitos, la mayoría en tubo neural. Además, promueve la transición epitelial-mesenquimal. Su participación fundamental se conoce en la patogenia de los cordomas, un tumor derivado de la notocorda. Más recientemente, se describió que Brachyury está regulada al alza en varios tumores, incluidos los tumores del estroma gastrointestinal (GIST), mama, pulmón, colorrectal, próstata y cáncer testicular. Es de destacar que Brachyury se informó como un biomarcador independiente de mal pronóstico de estos tumores. [31, 32, 33, 34]. En consecuencia, se encuentra en desarrollo una vacuna antiBrachyury (GI - 6301) [35] y se está probando en un ensayo clínico de fase II (www.clinicaltrials.gov, 2015 - NCT02383498) en pacientes con cordoma. Recientemente, se informó la expresión de Brachyury en aproximadamente el 30% de los gliomas de la base de datos del Atlas Genómico de cáncer (TCGA) [35]. Pinto y colaboradores han descrito que Brachyury se expresa intensamente en tejidos cerebrales normales, pero disminuyen sus niveles en pacientes con gliomas. Además, un estudio por Jezkova y colaboradores, describieron que el tejido cerebral se considera el segundo en mayor expresión de Brachyury. [37].

Pinto y cols [38] demostraron una pérdida de expresión en gliomas, que correlacionaba inversamente respecto al grado de diferenciación, lo que fue correlacionado con la clínica, demostrando que niveles bajos de Brachyury presentan peor pronóstico. Esto se explica debido al papel supresor tumoral del factor de transcripción a través de la introducción de la autofagia y alteraciones en el ciclo de la apoptosis en células de tumores gliales. Sin embargo, es necesaria

una investigación profunda para establecer estas conclusiones recientemente descritas.

ANTECEDENTES

En mayo del 2014 en Haarlem, Holanda, se sembraron las bases para la nueva clasificación mundial de la salud para el abordaje de gliomas difusos en el cual se combina la histología con información genética tumoral para crear un algoritmo de diagnóstico específico e "integrado". Durante este encuentro, se concluyeron ciertas directrices que rigen actualmente la nueva clasificación de la Organización Mundial de la Salud del 2016, en las cuales se establece que el estudio molecular debería ser incorporado en la definición de ciertas entidades.

Además, se concluye lo siguiente:

a) El "diagnóstico integrado" será la línea superior para enfatizar su predominio sobre las otras líneas a pesar de que será la última parte del formato de diagnóstico completo, ya que depende de toda la información de diagnóstico presente. Por lo tanto, se anticipa que el diagnóstico integrado estará "pendiente" durante un período de tiempo entre el examen histológico y la disponibilidad de información molecular.

(b) La "clasificación histológica" es el diagnóstico microscópico estándar que se basa en la tinción con hematoxilina y eosina y técnicas histológicas adicionales como histoquímica, inmunohistoquímica y microscopía electrónica. (23).

(c) El "grado de la OMS" es el grado histológico estándar. Como en el pasado, el grado de la OMS refleja la historia natural después de la cirugía sola, en lugar del pronóstico esperado del paciente después de las terapias adyuvantes actuales. Y se aplicara sobre gliomas difusos astrocíticos con caracteres anaplásicos u oligodendrogliomas; o como glioblastomas a aquellos gliomas difusos astrocíticos

con anaplasia, proliferación vascular y necrosis, de acuerdo con lo establecido por la Organización mundial de la Salud.

El nuevo algoritmo de diagnóstico proporcionado ofrece grandes ventajas: es relativamente sencillo, con alta reproducibilidad y sin ambigüedad.

Primero, la información histológica se usa para identificar un glioma difuso y grado tumoral. Luego, se prueba el estado de la mutación IDH, primero por inmunohistoquímica (IHC) para IDH1 R132H, que incluye alrededor del 90% de todas las mutaciones de IDH, para el cual está disponible el anticuerpo específico de mutante. Si el tumor es negativo para IDH1 R132H, se solicita la secuenciación para identificar otras mutaciones menores de IDH1 / IDH2 (lo cual ocurre en aproximadamente el 10%).

Para los gliomas de bajo grado, mutantes de IDH (grados II y III), un conjunto de parámetros genéticos puede distinguir los astrocitomas de los oligodendrogliomas. Para los oligodendrogliomas (todos son mutantes de IDH), se requiere la demostración de la pérdida de heterocigosidad debida al brazo cromosómico 1p y la delección de 19q. Y como ya se había dicho, la hibridación fluorescente in situ (FISH) es la técnica más comúnmente utilizada para determinar la codelección 1p19q.

Por el contrario, los astrocitomas IDH-mutantes se definen por mutaciones de ATRX y TP53 (y falta de codelección 1p19q). Las mutaciones ATRX y TP53 no están presentes en los oligodendrogliomas. Para los gliomas de grado inferior que carecen de mutaciones de IDH ya sea por IHC o por secuenciación (correspondientes al 20% de astrocitomas), se establece el diagnóstico de astrocitoma de tipo “salvaje” IDH.

Para glioblastomas (antes llamados multiformes), el estado de la mutación IDH se establece por inmunohistoquímica (y por secuenciación si la inmunohistoquímica

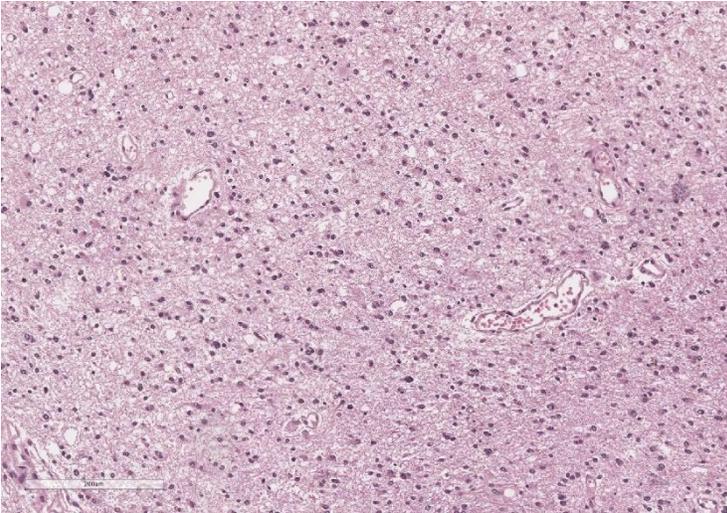
es negativa en pacientes, menores de 55 años). Aunque la mayoría de los glioblastomas son IDH-tipo "salvaje", 5% a 15% de glioblastomas son mutantes de IDH. La mayoría de los Glioblastomas mutantes de IDH son Glioblastomas "secundarios", lo que significa que la mayoría tiene evidencia de progresión de gliomas anteriores de grado más bajo. La mayoría de los Glioblastomas de tipo salvaje de IDH son glioblastomas "primarios", lo que significa que surgieron de Novo.

Es importante destacar que el nuevo diagnóstico integrado basado en las mutaciones ATRX y TP53 y la codeleción de 1p19q como marcadores de linaje de firma para astrocitoma y oligodendroglioma, respectivamente, muestra que los 2 parámetros son mutuamente excluyentes, eliminando así por completo la categoría de oligoastrocitoma mixto. En los casos de morfología no coincidente y parámetros genéticos (es decir, la morfología sugiere un tipo, pero los parámetros moleculares apuntan a otro), el diagnóstico integrado final dependerá de los determinantes moleculares.

Estudios anteriores han reevaluado gliomas difusos, con interesantes cambios respecto al diagnóstico integrado molecular. Demostrar la presencia o la ausencia de alteraciones genéticas características es esencial en el diagnóstico actual de la patología y se está convirtiendo en un importante manejo para el correcto diagnóstico. [24].

Con base en la nueva edición de las clasificaciones de tumores cerebrales de la OMS, un porcentaje de los diagnósticos de tumores cerebrales ahora se basará en AMBOS análisis microscópicos y análisis moleculares. Esto significa que los diagnósticos de muchos tumores cerebrales serán mucho más precisos y le dará al médico tratante una mejor idea de qué manejo integral brindar.

Por ejemplo:



Diagnóstico histológico:
Astrocitoma difuso.

Grado histológico: II de la
WHO.

Información molecular:

IDH mutante, 1p19q
negativo, pérdida de ATRX:

Astrocitoma difuso.

IDH mutante, 1p19q positivo, ATRX intacto: Oligodendroglioma.

IDH no mutado: Astrocitoma difuso IDH no mutado o salvaje (Comportamiento más similar a Glioblastoma).

JUSTIFICACIÓN

Nuevos hallazgos e investigación sugieren que, en comparación con los datos clasificados históricos tumores gliales, basados en histología solamente, existe la posibilidad de resultados falsos positivos en los ensayos terapéuticos contemporáneos de gliomas difusos clasificados molecularmente. De manera crítica, los resultados de los ensayos clínicos de gliomas difusos, los estudios basados en el registro y las cohortes históricas que utilizan esquemas previos de la OMS basados solo en la histología deben ser reinterpretados con cautela. Basándonos en resultados de índole internacional, destaca la necesidad apremiante de diseñar investigaciones preclínicas, ensayos clínicos y registros nacionales de cáncer que incorporen datos moleculares clave en todos los tipos de cáncer.

En un esfuerzo por recopilar sistemáticamente datos de pacientes con cáncer en los Estados Unidos, incluido el de pacientes con glioma, las normas de informes de registro de cáncer fueron desarrolladas y empleadas por la Asociación de

Registros Centrales del Cáncer de Norteamérica, incluida la base de datos nacional del cáncer del Colegio Estadounidense de Cirujanos (NCDB), el programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales del Instituto Nacional del Cáncer, y el Programa Nacional del Centro de Control de Enfermedades para Registros de Cáncer y Registro de Tumores del Cerebro Central de los Estados Unidos. La cual es de suma importancia para entender el comportamiento epidemiológico de estas neoplasias. Para los tumores del SNC, la 4ª edición se publicó en 2007 y los gliomas difusos clasificados se basaron únicamente en su aspecto histológico. En consecuencia, los datos del registro de cáncer no pueden diferenciar actualmente entre gliomas difusos de tipo IDH-mutante e IDH-salvaje. Además, muchos de los ensayos clínicos clave de gliomas difusos, así como los estudios que utilizan cohortes históricas, se basaron en esquemas de clasificación de histología más antiguos. Sin embargo, la magnitud de los posibles errores de codificación y las malas interpretaciones diagnósticas en estas bases de datos no se aprecian ni se tienen en cuenta. (25)

En 2019, Iorgulescu y colaboradores, realizaron un estudio retrospectivo para clasificar gliomas difusos, del 2010 al 2015, estableciendo estatus de IDH, codeleción 1p19q, ATRX y p53, concluyendo que las tasas de clasificación errónea de oligodendrogliomas, astrocitomas y glioblastomas codificados histológicamente son ~ 21-35%, ~ 6-9% y ~ 9%, respectivamente; con implicaciones clínicas significativas, solamente en base a la población de Estados Unidos (25).

En México, no existen bases de datos referentes a gliomas difusos, y resulta difícil poder establecer el status de estas mutaciones para lograr el diagnóstico integrado de los mismos, motivo por el cual resulta de suma importancia, siendo el Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González de Monterrey, Nuevo León, un centro de referencia, para la nueva ventana epidemiológica y de investigación en nuestro país respecto a estas entidades, preocupantemente en aumento entre individuos de menor edad.

OBJETIVO

Reportar la graduación e histología de tumores gliales difusos en una serie de casos retrospectiva con estudios moleculares y de inmunohistoquímica

Objetivos secundarios:

- Correlacionar hallazgos histológicos con comportamiento molecular.
- Evaluar la correlación Inter observador entre patólogos quirúrgicos generales y patólogos experimentados en neuropatología en el área de gliomas difusos de sistema nervioso central.
- Establecer una base de datos con el diagnóstico integrado de tumores gliales difusos diagnosticados en el Hospital Universitario “Dr. Eleuterio González” en el periodo comprendido entre 2013 a 2018.

MATERIAL Y MÉTODOS

Tipo de estudio:

- Transversal.
- Descriptivo.
- Retrospectivo.

Se realizó una búsqueda en retrospectiva a través de la base de datos Pathox (TESI INFORMATICA) en un periodo de tiempo comprendido del año 2013 al 2018 de casos diagnosticados como: Astrocitoma, Oligoastrocitoma, Oligodendroglioma y Glioblastoma, en biopsias o resecciones tumorales.

Posteriormente, se obtuvieron bloques de tejido embebidos en parafina fijados con formalina y laminillas con tejido teñidas con hematoxilina y eosina de pacientes con diagnósticos de gliomas difusos en el período de enero 1 de 2013 al 1 de agosto de 2018.

Por primera vez, la búsqueda arrojó 111 casos compatibles con los criterios de búsqueda primarios, comprendidos en el tiempo de estudio establecido y bajo los diagnósticos descritos previamente.

Posteriormente y de acuerdo con los criterios de inclusión, exclusión y eliminación se alcanzaron 82 casos.

A.- Criterios de inclusión: Bloques y laminillas con diagnóstico de glioma difuso.

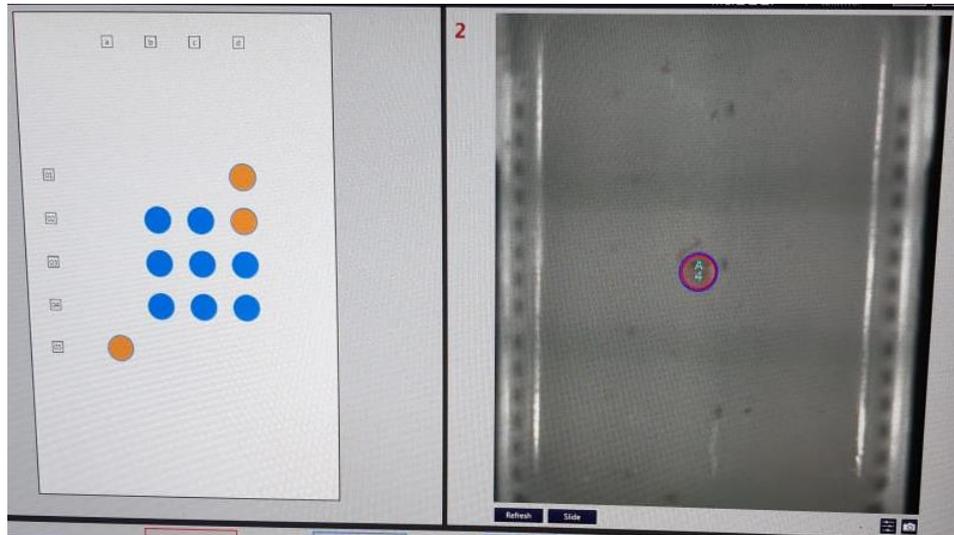
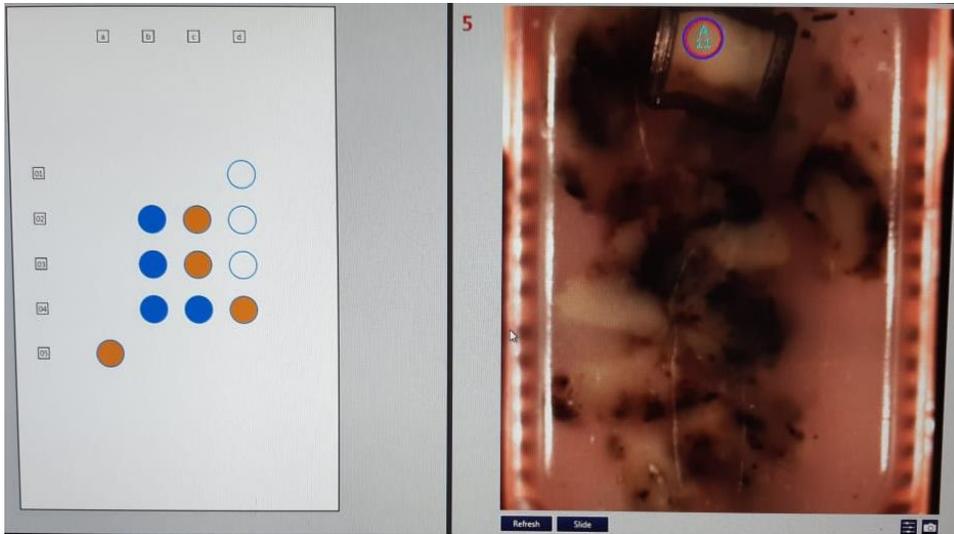
B.- Criterios de exclusión: Tejido no adecuadamente preservado.

C.- Criterios de eliminación: Pacientes sin material para estudio.

Los casos fueron reevaluados por tres patólogos, dos neuropatólogos y un patólogo quirúrgico general: solamente con tinción de hematoxilina y eosina, sin datos adicionales, salvo edad y localización, para ser clasificados por morfología como lo dictamina de la Organización mundial de la Salud (2016), evitando el término de oligoastrocitoma, y asignándose un grado histológico en base a variantes morfológicas previamente establecidas acorde a la revisión de la Organización Mundial de la Salud del año 2016.

Variante morfológica	Estatus	Grado
Hiper celularidad: Aumento de la celularidad comparado con tejido cerebral sano.	Presente	II
Atipia: Alteraciones en la forma, tamaño y aspecto del núcleo celular.	Presente	II/III
Mitosis: no es criterio por sí mismo de malignidad.	Presente	III
Proliferación vascular: La hiperplasia microvascular es la proliferación de células endoteliales y perivasculares formando ovillos similares a los glomérulos renales.	Presente	III/IV
Necrosis: Hay necrosis con y sin empalizada de las células en la periferia.	Presente	IV

Posteriormente, se seleccionaron áreas tumorales representativas y viables para la realización automatizada de microarrays de tejido a través del equipo TMA Master de 4 micras de diámetro mayor. En las cuales fue usado tejido tiroideo compatible con tiroiditis crónica de Hashimoto como guía, y además 10 microarrays de tejido en orden previamente establecido con “mapas” de distribución.



Figuras 5 y 6. Ejemplos de tejido obtenidos mediante el sistema automatizado.



Figura 7. Bloques de parafina, resultado final.

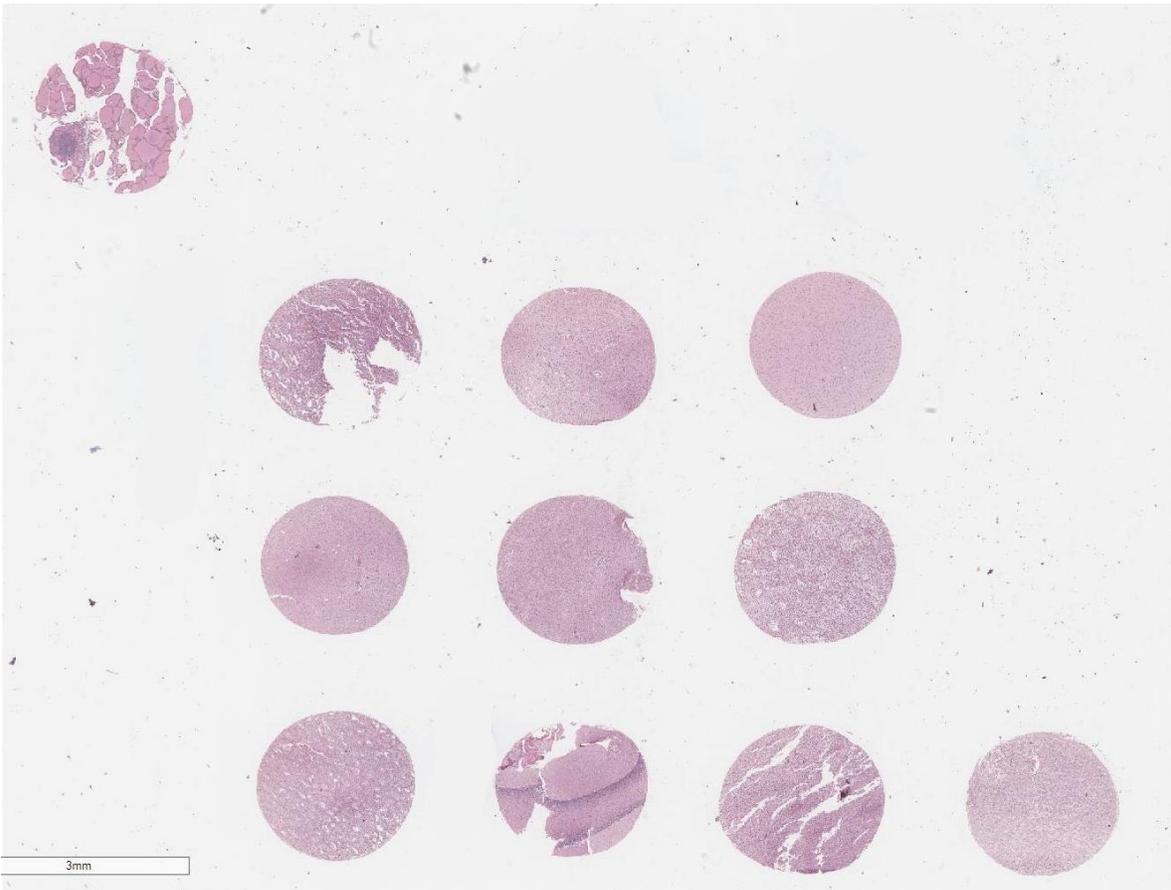


Figura 8. Ejemplo de histoarreglos teñidos con hematoxilina y eosina.

La inmunotinción se realizó en el sistema de tinción de inmunohistoquímica automatizada Ventana Medical System. Y todas las secciones se tiñeron en la misma corrida o en corridas, una tras otras.

I. inmunohistoquímica

ATRx

Todas las secciones se inmunotiñeron con un anticuerpo policlonal disponible comercialmente Gene Tex, clon: [C3], C-term. Dilución (1:3000).

La pérdida de la expresión nuclear de ATRX se calificó como específica si los núcleos de las células tumorales no estaban teñidos, mientras que los núcleos de las células no neoplásicas como endotelios, microglia, linfocitos y astrocitos reactivos fueron muy positivos.

IDH

Las secciones de tejido se incubaron con sobrenadante de cultivo de anticuerpo monoclonal de ratón anti-R132H-IDH1, Gene Tex. Dilución (1:500).

Fue considerado mutado cuando se obtiene positividad citoplasmática granular y/o positividad nuclear, en al menos en el 10% de las células (40).

P53

La tinción inmunohistoquímica para p53 se realizó usando un anticuerpo monoclonal de ratón (Clon [Bp53-11]) usando el protocolo estándar. (Dilución 1:1).

Se considera positivo la tinción fuerte y nuclear en más del 10% de las células tumorales, en base a estudios previos que revelan este punto de corte como el más adecuado para predecir la mutación. (39).

H3k27M

Se realizó tinción de inmunohistoquímica para H3k27m usando clona mAbcam 6002. (Dilución 1:100).

Se considera presenta la mutación al presentar positividad fuerte y difusa nuclear.

Brachyury

La tinción para inmunohistoquímica se realizó utilizando BioSB clon [RB-TBXT]. (Dilución 1:100).

La positividad fue considerada si cualquier número de células fue positiva nuclear, y se reportara el porcentaje de células positivas.

Todas las pruebas de inmunohistoquímica fueron interpretadas por un patólogo experto.

II. Pruebas moleculares

Los casos a través de diagnóstico histológico fueron divididos en dos grupos: aquellos con morfología más astrocítica y oligodendrogial; y los de alto grado con aspecto de glioblastoma. Al primer grupo se realizó la codelecion de 1p19q y al segundo fue realizada la prueba por FISH para la búsqueda de amplificación de EGFR.

A través de cortes de 4 micras se monta el tejido en laminillas silanizadas a 42 a 44°C, se secan las laminillas en estufa de 56 a 60° por 12 hrs y se deja enfriar a temperatura ambiente. Se realiza desparafinizacion e hidratación de las laminillas en jarras coplin a través del proceso descrito en manual de protocolo para FISH del Hospital Universitario Dr. José Eleuterio González.

Se colocan las laminillas en una solución de pretratamiento a 80°C por 30 minutos, en el baño de agua de temperatura controlada, enjuagar las laminillas con agua bidestilada por 1 minuto y se aplica buffer lavado 2 veces. Se realiza digestión enzimática para posteriormente sacar la sonda del congelador y dejarla por 10 minutos, 10 microlitros y colocarla en el Hybridizer y correr el programa correspondiente (ver Manuel DOE-HU-641-43) para hibridar toda la noche (5 minutos a 95°C/80°C, seguido de 16 horas a 37°C).

EGFR

Se realizará además la amplificación de EGFR a través de pruebas fluorescencia de hibridación in situ con sondas específicas para amplificación de el GEN-FACTOR de crecimiento epidérmico LSI (7q12) y sonda de control de cromosoma (CEP) 7: Ambas pruebas son una prueba de Path Vyssion de EGFR que se utiliza y es elaborada por VYSIS.

Se revisa el tejido control dispuesto en la misma laminilla del caso problema, observándose positividad con señales rojas y verdes, con amplificación de los casos positivos ya conocidos y no amplificación de los casos controles negativos ya conocidos. A nivel del caso problema se observa una media de señales rojas que representan las señales del gen EGFR de 2.2 y una media de señales verdes que representa la región centromérica del cromosoma 7 de 2.05, la división entre ambos nos da un rango de 1.07.

Positividad de la prueba se define como: copias de EGFR >2 cuando menos en el 10%, CEP 7 >2 cuando menos en el 40% o ambas > o iguales a 2 cuando menos en el 10% de las células neoplásicas. Según las directrices publicadas (Varella-Garcia et al., 2009) [41].

Codelecion 1p19q

Para estudio se utilizan 4 sondas, LSI 1p36/LSI 1q25 y LSI 19p13/LSI 19p13 regiones específicas del cromosoma 1 y 19 respectivamente.

Se desparafinizan las secciones seguidas de digestión y pretratamiento con controles positivos y negativos, los cuales son incubados con el sistema de detección de Vysis, el kit tiene dos pares de pruebas las cuales son realizadas en

dos laminillas por separado. La primera prueba incluye la región 1p36 (spectrum Orange), y la segunda región 1q25 (spectrum grreen) y la segunda prueba contiene la región 19q13 (spectrum Orange) y la segunda 19p13 (spectrum green). Se realiza un análisis cuantitativo de ambas pruebas en las áreas elegidas por el patólogo.

La interpretación fue realizada por un patólogo experto. Un caso positivo es definido como un caso en el cual el rango 1p36/1q25 y 19q13/19p13 es menor que 0.7 y 0.8 respectivamente.

Análisis estadístico

La estadística descriptiva se reportará en medidas de dispersión y tendencia central. Para la correlación se utilizó la prueba de Kappa fleiss. Para diferencia de proporciones se utilizará prueba Chi Cuadrada de Pearson o Prueba exacta de Fisher. Un valor de $P < .05$ se considerará estadísticamente significativo. El análisis estadístico se realizará en el entorno de programación SPSS versión 23.

RESULTADOS

Los datos epidemiológicos se resumen en la tabla 1. De los 82 casos estudiados, el mayor porcentaje de casos estudiados corresponde a masculinos (56%) comparado con las pacientes femeninas (44%), la edad promedio fueron los 50

años, con una mínima de 8 años y una máxima de 82 años. La localización más frecuente fue en región frontal con un 25% de los casos.

SEXO	FRECUENCIA
HOMBRES	46
MUJERES	36
Total	85
EDAD	
MINIMA	8
MAXIMO	82
MEDIA	50
LOCALIZACION	
FRONTAL	25
TEMPORAL	18
PARIETAL	16
OCCIPITAL	1
FRONTOTEMPORAL	4
FRONTOPARIETAL	6
CEREBELO	2
TALAMO	2
CUARTO VENTRICULO	1
OTROS	7
Total	82

Tabla 1. Datos epidemiológicos de pacientes con gliomas difusos

Las mutaciones observadas en cada diagnostico integrado según la Organización Mundial de la Salud se resumen en la tabla 2.

Las pruebas de inmunohistoquímica para la detección de mutaciones de IDH fueron interpretadas por un patólogo experto, siendo diagnosticadas como positivo si la expresión fue citoplasmática, nuclear, o ambas. ATRX fue interpretada como positivo en ausencia de expresión nuclear, y el corte positivo para detectar mutaciones de p53 fue el 10%. Casos diagnosticados con codeleción 1p/19q fueron definidos como oligodendroglioma, y gliomas con ausencia de esta codeleción, fueron diagnosticados como astrocitoma o glioblastoma dependiendo de la presencia de criterios histológicos enunciados en la OMS y a través de un consenso general entre los patólogos participantes.

	ASTROCITOMA DIFUSO	ASTROCITOMA ANAPLASICO	OLIGODENDROGLIOMA	OLIGODENDROGLIOMA ANAPLASICO	GLIOBLASTOMA IDH MUTANTE	GLIOBLASTOMA IDH WILDTYPE
GRADO	II	III	II	III	IV	IV
CASOS	12	9	6	8	26	14
IDH	11	7	5	6	26	0
PERDIDA DE ATRX	4	6	1	1	2	1
CODELECCION 1p19q	0	0	6	6	0	0
CODELECCION DE 1p O 19q	2	1	0	0	1	0
p53	9	7	2	4	19	10
AMPLIFICACION EGFR	0	0	0	0	5	3
H3k27m	7	4	0	0	14	4
BRACHYURY	0	0	0	1 (40%)	1 (20%)	0

Tabla 2. Mutaciones observadas en el diagnostico integrado de gliomas difusos.

Astrocitomas difusos

Fueron diagnosticados previamente 13 casos como astrocitoma difuso.

ID	DX INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRX	P53	H3K27M	BRACH	Cod1p19q
1	AD	II	AD	II	O	II	AD	II	1	0	1	0	0	0
2	AD	II	AD	II	AD	II	O	II	1	0	0	0	0	-1
3	AA	III	AD	II	AD	II	AD	II	1	0	1	1	0	0
4	AD	II	O	II	O	II	O	II	1	1	1	1	0	0
5	AA	III	AD	II	G NOS	III	AD	II	1	1	1	1	0	0
7	AD	II	O	II	AD	II	O	II	1	1	1	1	0	3
12	AD	II	AD	II	AD	II	AD	II	1	1	1	1	0	0
13	AD	II	AD	II	O	II	AD	II	1	1	0	0	0	0
14	AD	II	AD	II	AA	III	AD	II	1	1	1	1	0	0
16	AD	II	AD	II	NA	-1	NA	-1	1	1	1	0	0	3
17	AD	II	AD	II	NA	-1	NA	-1	1	0	1	1	0	-1
40	O	II	O	II	O	II	O	II	-1	-1	-1	-1	0	0

Tabla 3. Resultados obtenidos en el diagnostico integrado "Astrocitoma difuso". AA: astrocitoma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. O: oligodendrogloma. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable. 3: delección 19q.

Posterior a las pruebas moleculares se obtuvieron 12 casos, de localización preferencial en lóbulo temporal y frontal; la edad mínima fue de 17 años, la máxima de 57 años y como promedio 31 años. 6 casos fueron hombres, y 6 fueron mujeres. 11 de 12 casos (91%) fue positivo para IDH, un caso no pudo ser valorado por defectos del tejido. 33.3% tuvo pérdida de ATRX, el 75% tuvo mutación de p53 y el 58.3% para H3k27m. Ninguna de las muestras presentó positividad para Brachyury.

Caso para resaltar es el número 40, que tuvo una morfología de tipo oligodendroglial ante todos los patólogos, quienes de forma unánime reportan un grado II en la neoplasia, sin embargo, a pesar de que el tejido no fue evaluable para IDH, la negatividad para la codeleción 1p19q lo cataloga como un astrocitoma difuso grado II.

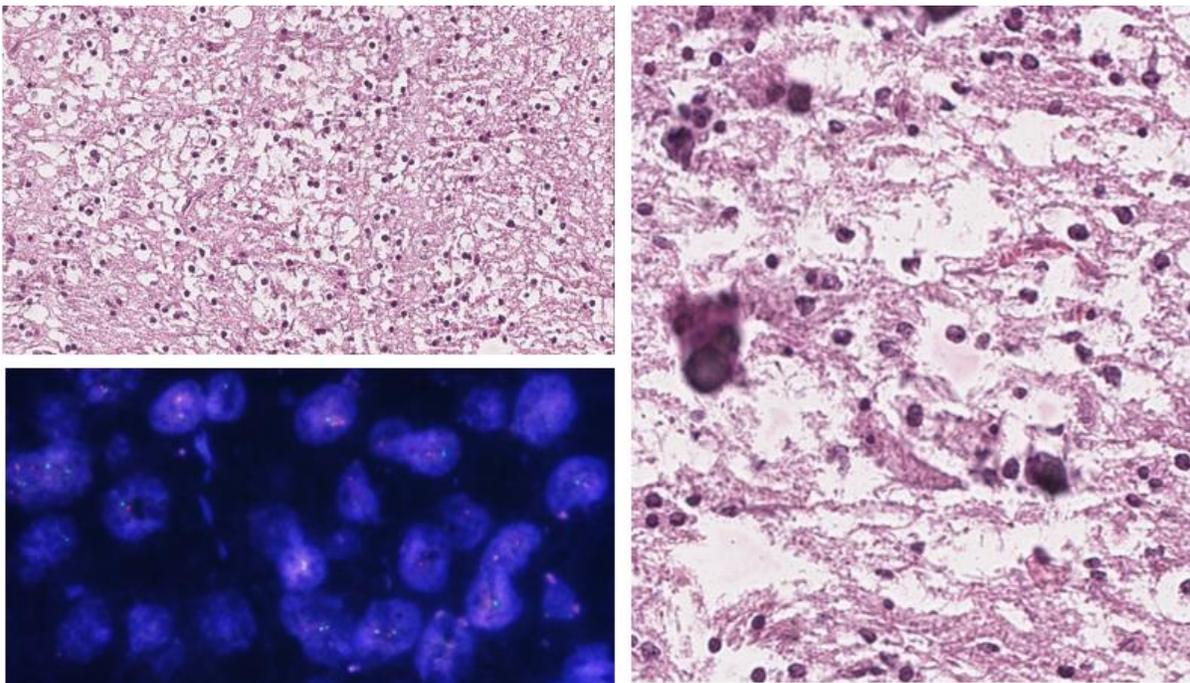


Figura 9. Caso 40. Se observa una neoplasia celular con células pequeñas y un halo periférico, con calcificaciones. Los estudios de FISH para codeleción 1p19p resultaron negativos.

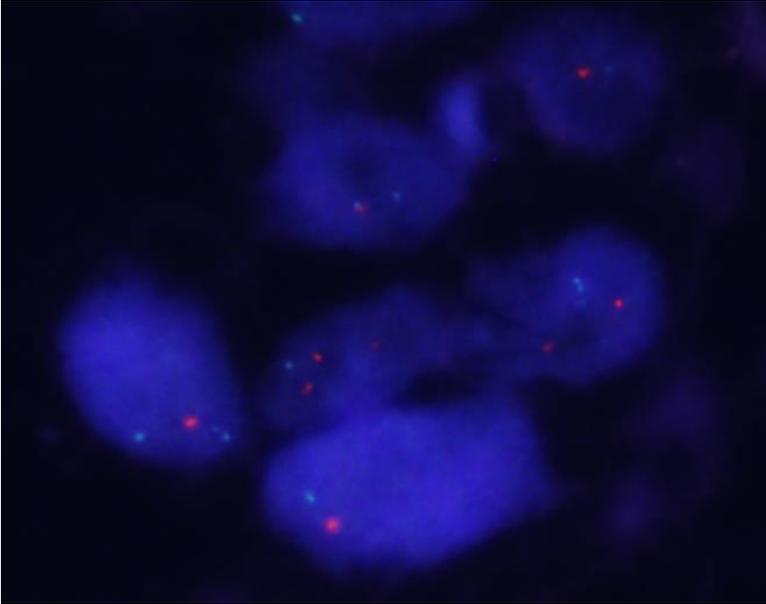
Astrocitoma anaplásico

El astrocitoma anaplásico se define según criterios de la OMS por su morfología *astrocítica* acompañada de anaplasia y mitosis.

ID	DX INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRX	P53	H3K27M	BRACH	Cod1p19q
6	AD	II	AA	III	OA	III	AA	III	1	0	1	0	0	0
9	AA	III	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	0	1	0	0	-1
10	AA	III	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	0	-1	1	0	0
18	AA	III	AA	III	G NOS	IV	OA	III	1	0	1	1	0	-1
19	AA	III	AA	III	G NOS	IV	AA	III	0	0	1	0	0	-1
23	AA	III	AA	III	G NOS	IV	AA	III	1	1	1	1	0	-1
27	OAA	III	AA	III	OA	III	AA	III	1	1	1	1	0	0
28	OA	III	OA	III	OA	III	AA	III	1	1	1	0	0	3
33	OA	III	OA	III	O	III	OA	III	-1	0	0	-1	0	0

Tabla 3. Resultados obtenidos en el diagnostico integrado “Astrocitoma anaplásico”. AA: astrocitoma anaplásico. AD: astrocitoma difuso. OA: Oligodendroglioma anaplásico. OAA: oligoastrocitoma anaplásico. G NOS: Glioblastoma NOS. GB: Glioblastoma. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable. 3: delección 19q.

Se obtuvieron 9 casos de astrocitomas anaplásicos, la edad máxima de 74 años, mínima de 24, con una edad promedio de 50 años. 6 de los 10 casos fueron en hombres, 4 en mujeres, y la localización más frecuente resultó ser el lóbulo frontal. 70% de los casos fueron positivos para IDH, 1 de 9 casos fue IDH wild type. Este caso fue diagnosticado por dos de los patólogos morfológicamente como astrocitoma anaplásico, diagnostico sustentado por la pérdida de ATRX, más frecuente en astrocitomas, y generalmente retenida en los glioblastomas, así como mutación de p53 y ausencia de mutación de H3K27m.



La pérdida de ATRX fue del 67% y del 78% para p53. Solo 4 casos presentaron mutaciones para H3k27m, lo que representa un 44% y ninguno expreso Brachyury de forma nuclear.

La codeleción fue negativa en todos los casos, salvo en un caso

con deleción en 19q.

Figura 10. Caso 28, con deleción de 1p.

Oligodendroglioma

De 9 casos previamente diagnosticados como oligodendroglioma, 6 fueron confirmados mediante estudios moleculares. La mayoría de los casos fueron mujeres (4 casos de 6), con edad máxima de 58 años, mínima de 25 y en promedio 41 años en la muestra. Las localizaciones fueron heterogéneas, en lóbulo parietal, temporoparietal, frontal y temporal.

Todos los casos fueron positivos para codeleción 1p19q. 5 de 6 casos presentaron mutación de IDH, el único caso no positivo, fue tejido no valorable al momento de realizar la prueba. Solo un caso perdió ATRx y solo dos de los casos fueron positivo para p53 (30%).

No se observaron mutaciones en H3k27m o brachyury en los casos diagnosticados como oligodendroglioma.

ID	DX INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRX	P53	H3K27M	BRACH	Cod1p19q
24	AD	II	OS	NA	OS	II	OS	II	1	1	-1	-1	-1	1
25	OAS	II	AD	II	O	II	AD	II	-1	0	-1	-1	-1	1
29	O	II	AD	II	AD	II	AD	II	1	1	1	0	0	1
31	O	II	O	II	O	II	O	II	1	1	0	0	0	1
32	O	II	OA	III	O	II	O	II	1	1	1	0	0	1
34	OAS	II	AD	II	O	II	O	II	1	1	0	0	0	1

Tabla 3. Resultados obtenidos en el diagnostico integrado "Oligodendroglioma, grado II". OS: Otro. AD: astrocitoma difuso. O: Oligodendroglioma, OA: Oligodendroglioma anaplásico. OAS: Oligoastrocitoma difuso. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable.

Es de llamar nuestra atención el caso número 24, el cual fue diagnosticado en 2013 como Astrocitoma difuso. Posteriormente, los 3 patólogos dieron otros diagnósticos alejados del glioma difuso. Uno mencionó la posibilidad de un Schwannoma y dos de ellos en base a las características morfológicas sugirieron un xantoastrocitoma pleomórfico, grado dos. Sin embargo, al momento de realizar pruebas moleculares, se observa mutación de IDH, retención de ARTX y codeleción de 1p19q, dando un diagnostico integrado de Oligodendroglioma, cuyas características morfológicas lo limitaban a un grado II según la Organización Mundial de la Salud.

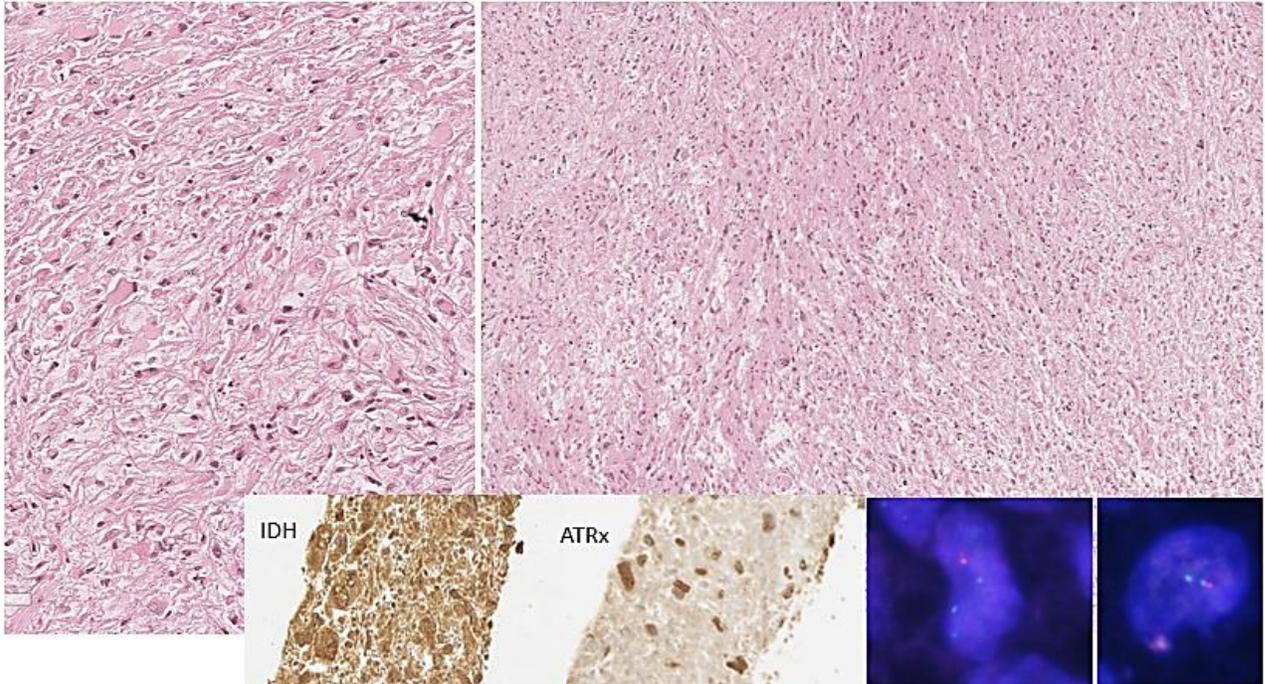


Figura 11. Caso 24. Se observa una proliferación celular de aspecto fibrilar con células grandes de citoplasma amplio eosinofílico con ligera vacuolización; sin mitosis, necrosis o proliferación vascular. IDH mutante, ATRx conservado y delección de 1p19q.

En esta categoría se pudieron esclarecer dos de los llamados oligoastrocitomas. En ambas situaciones los tres patólogos no fueron unánimes respecto a la morfología, sin embargo, la codelección fue un dato mandatorio. Llama la atención, además, la pérdida de ATRX en uno de los casos; en literatura previamente descrita se consideran casi mutuamente excluyentes. Rara vez ocurre pérdida de ATRX en oligodendrogliomas puros, pero han sido publicados reportes de pérdida, sobre todo en oligodendrogliomas anaplásicos [53].

Oligodendrogliomas anaplásicos

Se diagnosticaron 8 casos como oligodendrogliomas anaplásicos, se trataron de pacientes de 26 a 61 años, con una edad promedio de 51 años. Más de la mitad fueron hombres (5 de 8 casos) y las localizaciones más frecuentes fueron frontoparietal y frontal.

ID	DX INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRX	P53	H3K27M	BRACH	Cod1p19q
20	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	-1	-1	0	-1	1
21	AA	III	OS	II	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	1	1
35	O	II	OA	III	OA	III	OA	III	1	1	0	0	0	-1
36	OA	III	OA	III	OA	III	OA	III	1	1	0	0	0	-1
37	O	II	OA	III	OA	III	OA	III	-1	0	1	0	0	1
38	O	NA	OA	III	OA	III	OA	III	1	1	1	0	0	1
41	OA	III	OA	III	OA	III	OA	III	-1	1	1	-1	0	1
42	OA	III	OA	III	OA	III	OA	III	1	1	0	0	0	1

Tabla 4. Resultados obtenidos en el diagnostico integrado “Oligodendroglioma anaplásico, grado III”. OS: Otro. AA: astrocitoma anaplásico. O: Oligodendroglioma, OA: Oligodendroglioma anaplásico. G NOS Glioblastoma NOS. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable.

Todos los casos tuvieron la codeleción, excepto dos, los cuales por condiciones del tejido no fue evaluable; así mismo ocurrió con IDH, teniendo 6 casos positivos de 8 por defectos del tejido durante la técnica histológica. Al igual que en los oligodendrogliomas grado II, la pérdida de ATRX ocurrió en un caso, y la expresión de p53 aumento al 50% de los casos, como lo comenta la literatura; a pesar de no estar completamente aceptado, se ha intentado relacionar la expresión de p53 con el grado histológico siendo ligeramente mayor en los oligodendrogliomas anaplásicos, en comparación con los tumores de grado II, 31.25% y 23%, respectivamente [52].

En estos casos tampoco hubo mutación de H3k27m, y solo un caso mostro positividad para Brachyury en el 40% del tejido.

Es para resaltar el caso número 20, diagnosticado inicialmente como astrocitoma anaplásico, el cual por los tres patólogos fue valorado como un glioblastoma NOS; sin embargo, la mutación para IDH, y codeleción para 1p19q fue lo que inclino hacia el diagnostico de oligodendroglioma anaplásico.

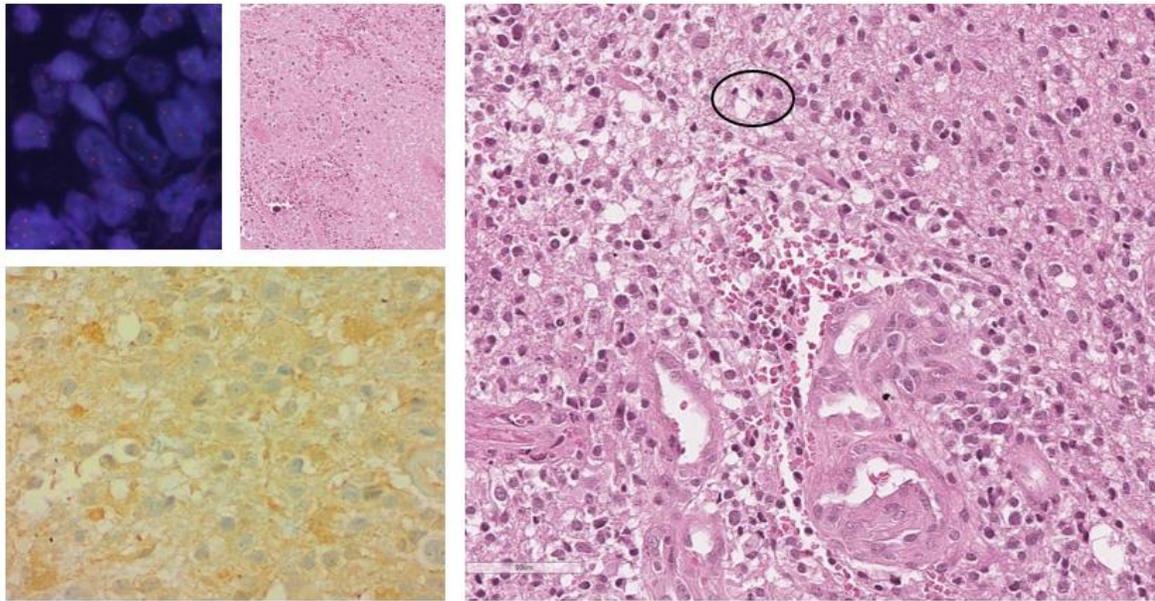


Figura 12. Caso 20, se observa una neoplasia celular con anaplasia, mitosis presentes, proliferación vascular y mitosis (circulo). Las células son ligeramente ovaladas con citoplasmas claros. La mutación para IDH estuvo presente, así como la codeleción de 1p19q.

Así mismo el caso 21, diagnosticado como astrocitoma anaplásico, fue reevaluado como glioblastoma NOS por dos patólogos y uno de ellos lo catalogo como ganglioglioma, por los caracteres ganglionales de la lesión.

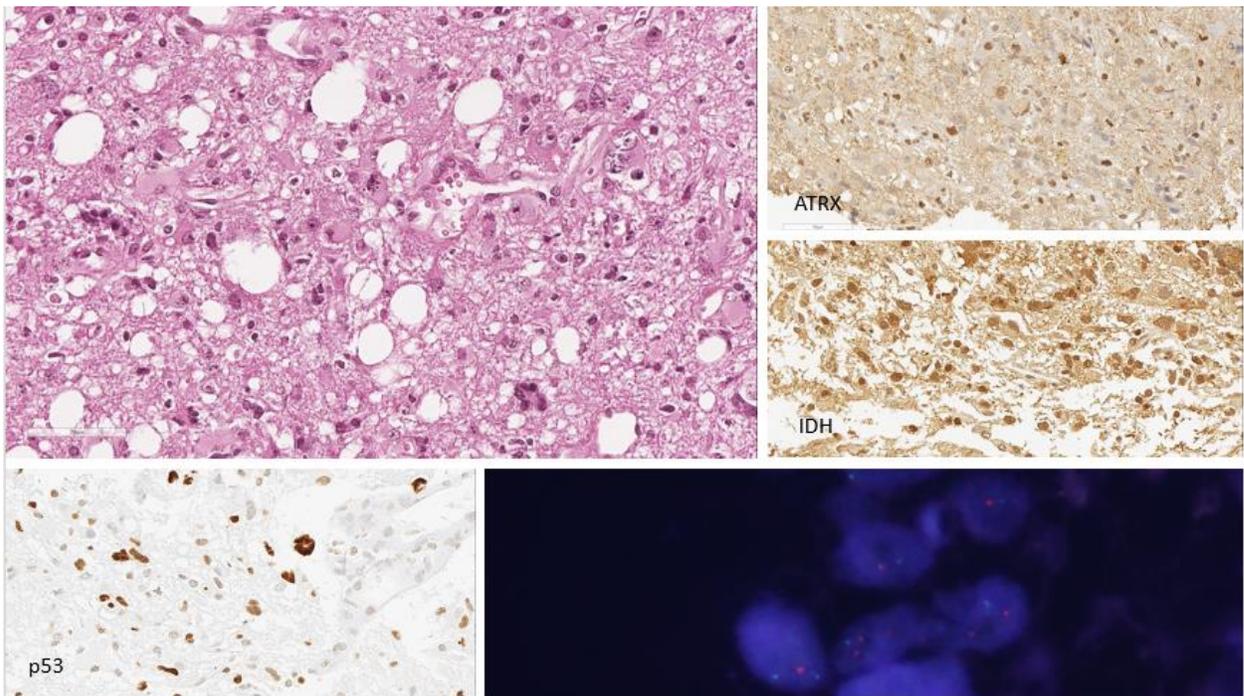


Figura 13. Caso 21, se observa una proliferación de células de aspecto anaplásico con mitosis atípicas en un fondo fibrilar; la mutación para IDH estuvo presente, así como retención de ATRX y p53. Codelecion 1p19q.

Sin embargo, los hallazgos moleculares son consistentes con oligodendroglioma, que en base a los caracteres histológicos se posiciona como grado III en la escala de OMS.

Todos los casos diagnosticados como oligodendroglioma en el diagnóstico integrado final, fueron positivos para IDH, concordante con lo descrito en la literatura.

Glioblastomas IDH mutante

El grupo diagnosticado como glioblastoma IDH mutante, es el más amplio de la lista.

Considerado en base a su carcinogénesis como glioblastoma secundario, esta categoría tuvo 26 casos. La mayoría fueron previamente diagnosticados como Glioblastomas multiforme. Término ya no empleado por la nueva clasificación de la Organización Mundial de la salud. Solo dos casos tuvieron diagnóstico histológico previo de oligodendroglioma anaplásico y oligoastrocitoma anaplásico.

Los casos presentan edades que oscilan entre los 31 y los 87 años, con un promedio de 58 años. 7 de los 26 casos, se presentaron en pacientes menores de 45 años, que es la incidencia mundial promedio reportada en el libro azul de la OMS.

La mayor incidencia fue en hombres con 16 de 26 casos. Con tendencia a localizarse en los lóbulos, el más frecuente el temporal, seguido muy de cerca por el lóbulo parietal.

Tabla 5. Resultados obtenidos en el diagnostico integrado "Glioblastoma IDH mutante,

ID	DIAGNOSTICO INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRX	P53	H3K27M	BRACH	EGFR	Cod1p19q
26	OA	III	G NOS	IV	OA	III	G NOS	IV	1	1	0	0	0		3
39	OAA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	0		0
43	G NOS	IV	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	0	1	
47	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	0	0	0	0	
49	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	0	-1	
50	G NOS	IV	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	1	0	
53	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	-1	
54	G NOS	IV	OA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	0	1	1	0	0	
57	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	0	0	
58	G NOS	IV	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	0	
62	G NOS	IV	AA	III	AA	III	AA	III	1	1	1	0	0	0	
63	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	0	
65	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	0	0	
67	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1		0	0	
69	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	0	0	1	
71	G NOS	IV	OA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	0	0	0	1	
72	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	0	0	0	0	0	
73	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	1	
74	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	0	
75	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	0	1	0	0	
76	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	0	
77	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	1	
79	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	0	
80	G IDHm	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	0	1	0	0	
81	G IDHm	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	0	1	0	0	
82	G IDHm	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	1	1	1	1	0	0	

grado IV". OAA: Oligoastrocitoma anaplásico. AA: Astrocitoma anaplásico. OA: Oligodendroglioma anaplásico. G NOS Glioblastoma NOS. G IDHm: Glioblastoma IDH mutante. OS: otro. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable.

Todos los casos fueron IDH mutante, solo el 7.6% tuvo perdida de ATRX, el 73% presento mutaciones para p53 y el 53% para H3k27m.

Cabe resaltar que los dos casos previamente diagnosticados como oligodendroglioma anaplásico y oligoastrocitoma anaplásico no presentaron codeleción de 1p19q por lo que las características histológicas y el perfil molecular fueron concordantes con un glioblastoma IDH mutante.

La amplificación de EGFR fue vista en 5 de los 26 casos, lo que representa el 19.2%; valor más alto que lo reportado en la literatura en estos tumores, también llamados glioblastomas secundarios. Si bien, la amplificación puede ser encontrada hasta la mitad de los casos en glioblastomas primarios o IDH no mutantes, llama la atención que en nuestro caso encontramos este porcentaje más elevado, además, las características epidemiológicas también son de notar.

El caso 43 se trata de una femenina de 54 años, la única mujer en la serie, con un tumor frontal diagnosticado como Glioblastoma NOS, en el consenso, solo un patólogo sugirió un astrocitoma anaplásico, el resto se valoró como glioblastoma grado IV con mutación de IDH, ATRX preservado, p53 en el 90% del tejido y negativo para H3k27 y Brachyury.

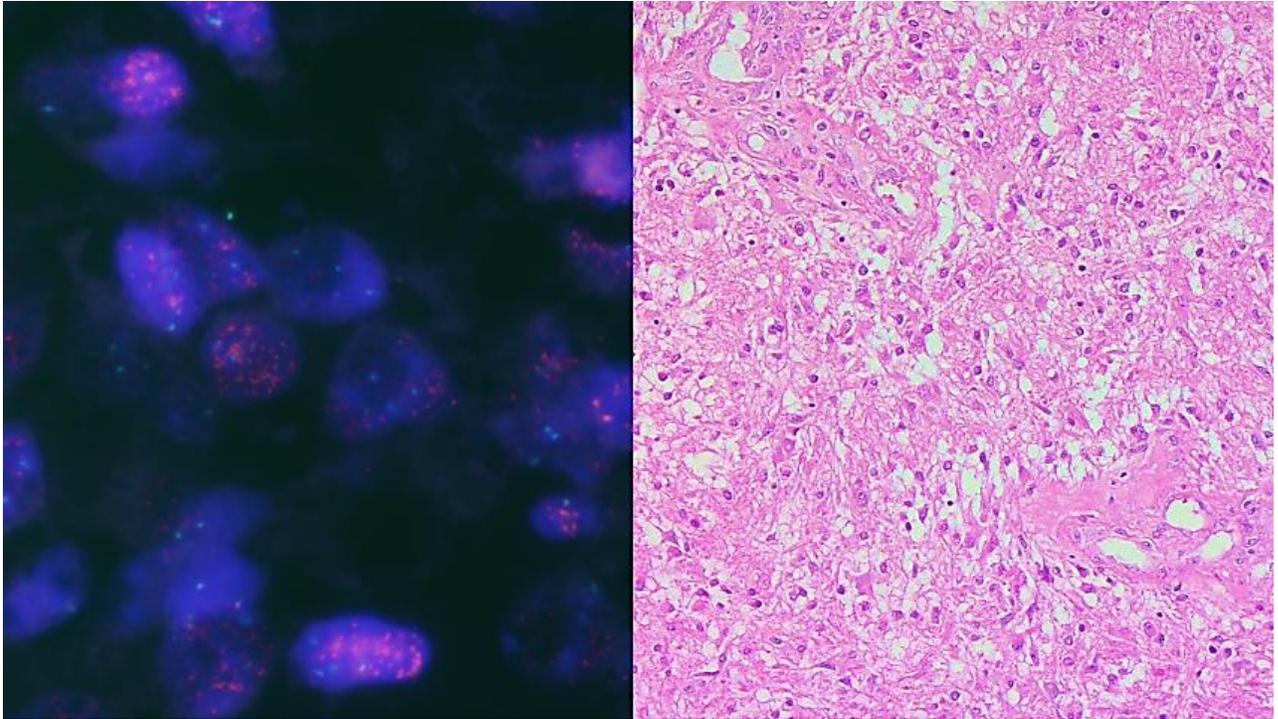


Figura 14. Se observa un tumor altamente celular con anaplasia y proliferación vascular de tipo glomeruloide. La morfología y la amplificación para EGFR lo cataloga como glioblastoma.

Los casos 69, 73 y 77 se tratan de masculinos. De 44 a 51 años, con lesiones en región parietal, temporal y frontotemporal, respectivamente. Por consenso todos se trataron de un glioblastoma grado IV; los cuales presentan el mismo perfil molecular: mutación de IDH, expresión nuclear de ATRX y p53. Caso 73 y 77 fueron positivos para H3k27m, pero Brachyury no se expresó en ninguno de los tumores.

El caso 71 se trata de un paciente de 43 años con un tumor temporal con diagnóstico histológico de glioblastoma, que a diferencia de los demás, fue negativo para p53, expresando positividad nuclear en solo el 5% de las células. Consistente con glioblastoma, grado IV.

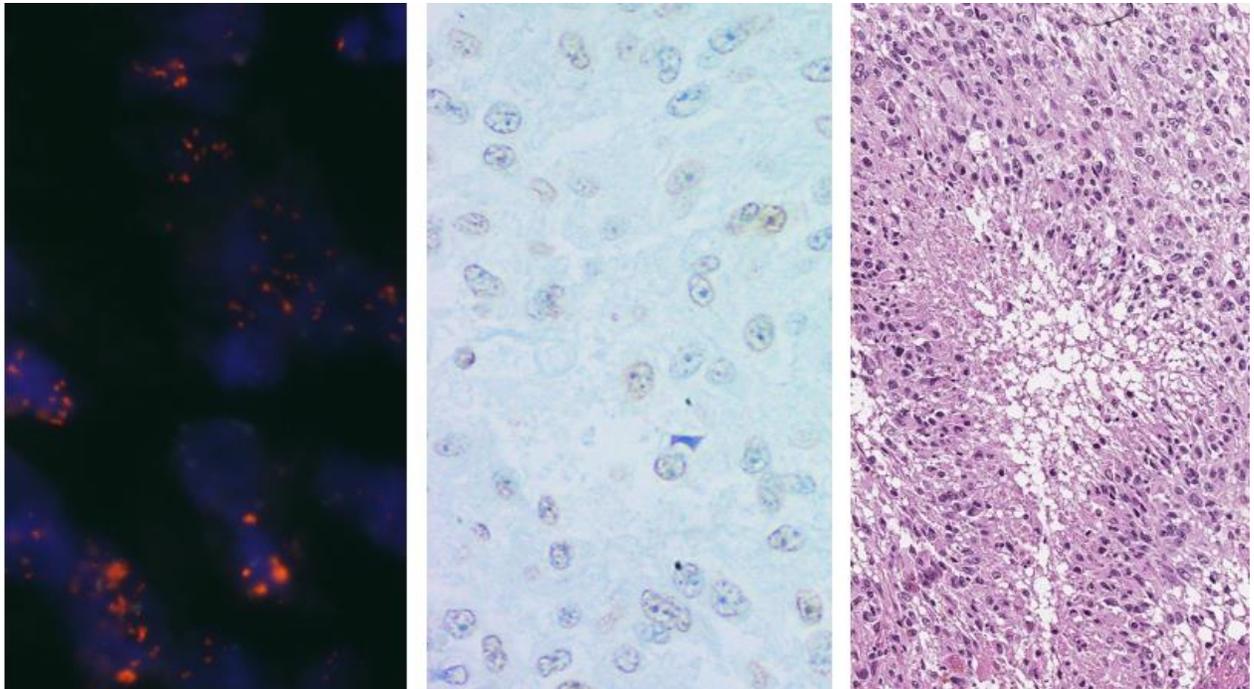


Figura 15. Se observa una proliferación celular en empalizada con células que presentan anaplasia y un centro necrótico. Amplificación de EGFR y negatividad para p53.

Glioblastomas IDH “Wild type” o salvaje

Estos tumores también se conocen como glioblastomas primarios y tienden a ocurrir en personas mayores a 55 años, con una media de 64 años [54], en Estados Unidos. En este estudio se identificaron 13 glioblastomas primarios en pacientes de edades de los 34 a los 69 años, con una edad promedio de 55. 4 pacientes, menores de 55 años.

7 de los 13 casos se trataron de masculinos y la localización más frecuente fue en el lóbulo parietal.

Tabla 6. Resultados obtenidos en el diagnostico integrado “Glioblastoma IDH WILDTYPE,

ID	DIAGNOSTICO INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRAX	P53	H3K27M	BRACH	EGFR	Cod1p19q
22	AA	III	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	0	0		0
44	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	1	0	0	
45	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	0	0	0	-1	
46	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	0	0	0	-1	
48	G NOS	IV	OA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	1	0	1	
51	G NOS	IV	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	0	0	0	0	0	0	
56	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	0	0	1	
60	G NOS	IV	G NOS	IV	OS	IV	OS	IV	0	1	1	0	0	0	
61	G NOS	IV	OA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	0	0	0	0	
64	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	0	0	0	
68	G NOS	IV	G NOS	IV	AA	III	G NOS	IV	0	1	1		0	-1	
70	G NOS	IV	G NOS	III	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	0	0	1	
78	G IDHw	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	0	1	1	1	0	0	
52	G NOS	IV	AA	III	G NOS	IV	G NOS	IV	0	0	1	0.20	1	0	

grado IV”. AA: Astrocitoma anaplásico. OA: Oligodendroglioma anaplásico. G NOS Glioblastoma NOS. G IDHw: Glioblastoma IDH wild type. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable.

En este caso todos los tumores presentaban una morfología de lesión glial de alto grado, todos fueron negativos para IDH, la pérdida de ATRX solo se observó en uno de los casos, mientras que la mutación de p53 fue en el 69.2%. La mutación para H3k27m solo fue observada en 3 tumores y Brachyury fue negativo nuclear en todos los casos.

La amplificación de EGFR fue en 3 de los 13 casos, representando un 23% de la muestra.

Los casos con amplificación para EGFR corresponden al caso número 48, correspondiente a un masculino de 42 años con una lesión parietal que presenta

expresión nuclear de ATRX, positividad nuclear del 20% del tejido para p53 y, como única diferencia respecto a los otros dos casos, positividad para la mutación de H3k27m.

El caso 56 y 70 corresponden a una femenina y a un masculino de 56 y 59 años respectivamente.

Aunque fue mayor el porcentaje de EGFR amplificado en glioblastomas IDH no mutante (23%) en comparación a aquellos glioblastomas IDH mutante (19%), no correlaciona completamente con la literatura internacional que indica, la amplificación de EGFR en glioblastomas primarios suele ser en el 57.4% comparado a 8% en los secundarios o IDH mutantes. Así mismo, y aunque la mayoría mostraba apenas el punto de corte (10%) para determinar mutación de p53, casi todos los casos de amplificación de EGFR mostraban esta mutación; lo cual tampoco concuerda con la literatura. Este estudio tiene limitantes, probablemente la muestra que no permite correlacionar estadísticamente estos hallazgos.

Otros

Dos casos fueron clasificados como “otros”. En la siguiente tabla se describe el perfil molecular de ambos casos.

ID	DIAGNOSTICO INICIAL	GRADO	DX 1	GRADO 1	DX 2	GRADO 2	DX 3	GRADO 3	IDH	ATRX	P53	H3K27M	BRACH	EGFR	Cod1p19q
8	AD	II	O	II	OS	I	OS	I	0	-1	-1	-1	-1		3
55	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	G NOS	IV	-1	1	1	1	0	0	

Tabla 7. Resultados obtenidos en casos determinados como “Otros”. AD: Astrocitoma difuso. O: Oligodendroglioma. G NOS Glioblastoma NOS. OS: Otros. 0: negativo. 1: positivo. -1: No valorable.

El caso numero 8 representa una lesión cerebelosa de un paciente masculino de 8 años, con diagnóstico inicial de astrocitoma difuso. Posteriormente, tras la evaluación inicial, uno de los patólogos lo considero oligodendroglioma, sin

embargo, solo tuvo delección del cromosoma 19q; el resto de los patólogos dio como posibilidad diagnóstica un glioma grado I, concordante con astrocitoma pilocítico. A favor se obtiene IDH negativo; el resto de los marcadores no pudieron ser evaluados. Se agregó estudio de BRAF v600, por inmunohistoquímica que no fue contribuyente por caída del tejido.

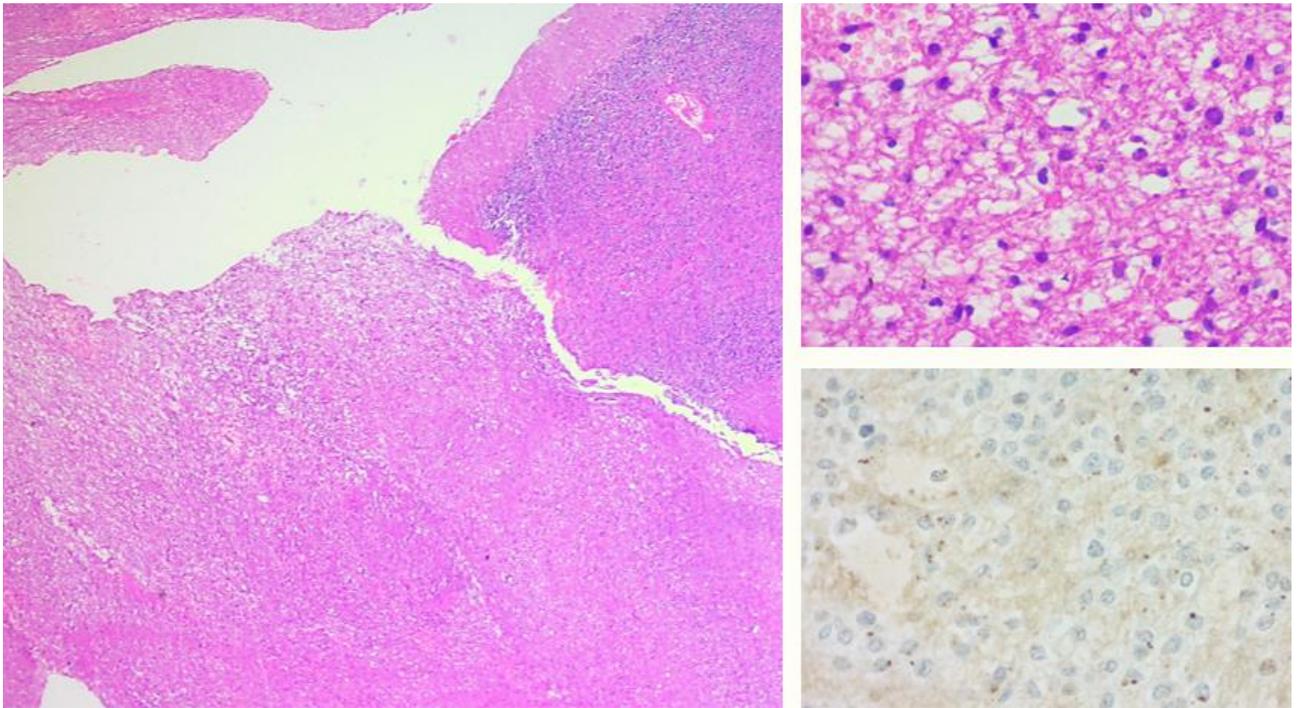


Figura 16. Caso 8, se observa una proliferación adyacente a cerebelo, difusa con fondo glial de células pequeñas con halo claro perinuclear y vasos delgados. Negativo para IDH.

El caso número 55 se trata de una femenina de 44 años de edad con un tumor en el lóbulo frontal diagnosticado inicialmente y por el resto de los patólogos tras la nueva evaluación como Glioblastoma, grado IV, sin embargo, a pesar de presentar inmunorreactividad para ATRX, p53 y H3k27m; el tejido para la realización de IDH no fue valorable; además, la amplificación de EGFR en este paciente fue ausente, por lo que adaptando a las nuevas guías del año 2016 al no conocer el status de IDH se denomina glioblastoma NOS.

Reproducibilidad Inter observador

La reproducibilidad Inter observador entre los 3 patólogos involucrados (dos neuropatólogos experimentados y un patólogo quirúrgico general) tuvo un rango moderado (κ :0.531).

La reproducibilidad en el grado histológico entre todos los patólogos comparado con el grado histológico final fue fuerte (κ : 0.619).

Mientras que la correlación Inter observador entre los diagnósticos histológicos fue ligera para astrocitoma anaplásicos, pero casi perfecta en el caso de los glioblastomas (κ : 0.308, y κ :0.831), respectivamente.

Diagnostico integrado

El diagnostico cambió en el 20.8% de los astrocitomas, en 23% de los oligodendrogliomas y 7.3% de glioblastomas posterior a las pruebas moleculares.

	DIAGNOSTICO INTEGRADO								Total
	No valorable	ASTROCITOMA DIFUSO	ASTROCITOMA ANAPLASICO	O	OA	GLIOBLASTOMA IDH MUTANTE	GLIOBLASTOMA IDH WILD TYPE	OTROS	
ASTROCITOMA DIFUSO	1	9	1	1	0	0	0	1	13
ASTROCITOMA ANAPLASICO	1	2	5	0	2	0	1	0	11
OLIGODENDROGLIOMA	1	1	0	3	3	0	0	0	8
OLIGODENDROGLIOMA ANAPLASICO	0	0	1	0	3	1	0	0	5
GLIOBLASTOMA IDH MUTANTE	0	0	1	0	0	4	0	0	5
GLIOBLASTOMA IDH WILD TYPE	0	0	0	0	0	0	1	0	1
OTROS	0	0	1	2	0	1	0	0	4
GLIOBLASTOMA NOS	2	0	1	0	0	20	12	1	35
Total	5	12	9	6	8	26	14	2	82

Tabla 9. Cambios observados entre el diagnóstico inicial con el diagnostico integrado de los 82 casos, incluidos los casos no valorables.

DISCUSION

En nuestro estudio a pesar de que morfológicamente la concordancia Inter observador es adecuada, la concordancia en grado histológico entre los tres patólogos es excelente en nuestra experiencia.

La peor correlación Inter observador fue en la categoría de astrocitomas anaplásicos. Sin embargo, correlaciona con estudios previos en la literatura entre los cuales, aun entre un grupo de neuropatólogos expertos (5 neuropatólogos) las puntuaciones de κ a través de un esquema modificado de Ringertz para la clasificación de 30 astrocitomas, aun no excedía el 0.63. [60]. La concordancia en el diagnóstico de astrocitomas anaplásicos entre los revisores expertos fue la categoría más débil para la concordancia, y probablemente sea causada por la variación de pautas de la OMS para distinguir astrocitomas anaplásicos de glioblastomas. Los criterios para distinguir el astrocitoma de bajo grado de Astrocitoma anaplásico y astrocitoma anaplásico de glioblastoma siguen siendo problemáticos. En el sistema actual de la OMS (OMS 2016), basado en los criterios de St. Anne-Mayo, que sirvió de base para la clasificación previa de 2007; en esta los astrocitomas de grado bajo se diferencian de los astrocitomas anaplásicos según el aumento de la densidad celular, el pleomorfismo nuclear y la actividad mitótica. Debido a que la característica del pleomorfismo nuclear es difícil de definir, esta delimitación es propensa a la variabilidad Inter observador. Por lo tanto, no es sorprendente que la característica del pleomorfismo nuclear no haya mostrado poder discriminativo en una revisión reciente, incluso entre el panel de expertos [60]. Respecto a la proliferación vascular incipiente, este criterio por si solo puede verse en astrocitomas anaplásicos, por lo que no es un criterio fuerte para definirlo morfológicamente como glioblastoma, pero si lo es la necrosis tumoral; así como la proliferación vascular evidente; por lo que tener estos datos histológicos si justifica el diagnostico de glioblastoma frente al astrocitoma anaplásico.

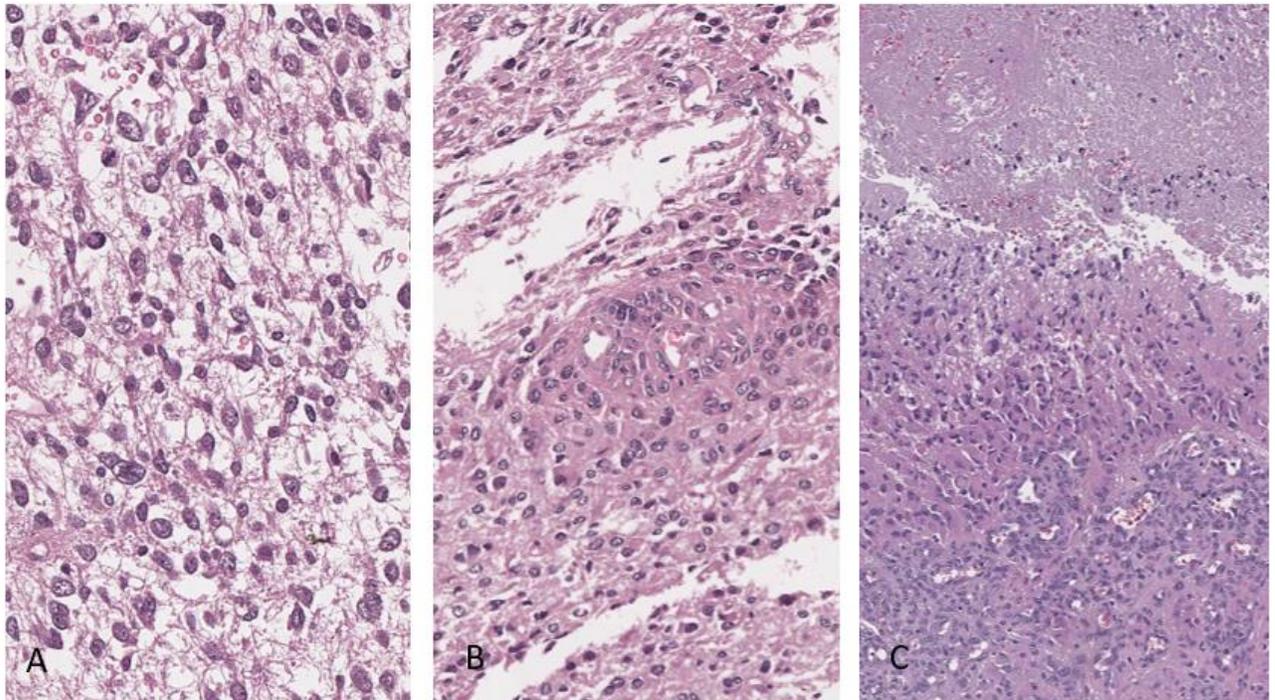


Figura 17. Aspectos morfológicos entre Astrocitomas anaplasicos (A y B) y glioblastoma (C). Se observa anaplasia y mitosis (A), proliferación vascular incipiente (B). En el ejemplo C observamos lo anterior, además de necrosis.

En este estudio el diagnóstico cambió en el 20.8% de los astrocitomas, en 23% de los oligodendrogliomas y 7.3% de glioblastomas.

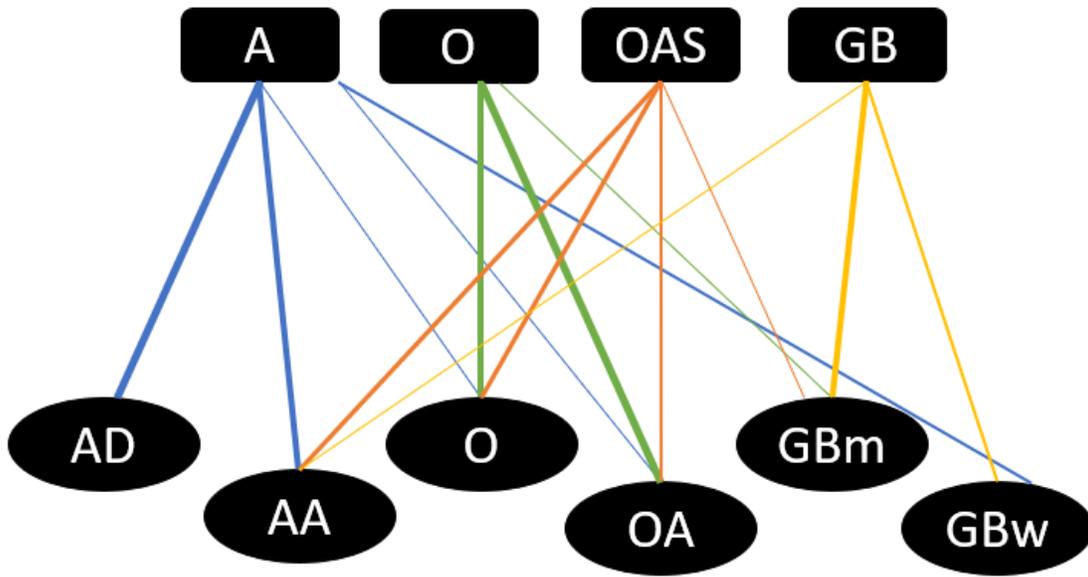


Figura Numero 18. Comparación entre los diagnósticos iniciales, con los diagnósticos integrados posterior a las pruebas moleculares. A: Astrocitoma, AD: Astrocitoma difuso. AA: astrocitoma anaplásico, O: Oligodendroglioma, OA: oligodendroglioma, OAS: Oligoastrocitomas, GB: Glioblastoma, GBm: Glioblastoma IDH mutante, GBw: Glioblastoma IDH wild type.

La más reciente actualización de la Organización Mundial de la salud, del año 2016 marco un gran cambio de la organización previa respecto a no solo tomar en cuenta el aspecto morfológico, sino agregar firmas moleculares con la inclusión del cromosoma 1p y la codelecion 19q como parte de la "firma molecular" del oligodendroglioma y mutaciones en IDH1 o IDH2 como el principal factor pronóstico y diagnóstico molecular para los astrocitomas del adulto.

IDH

Mutaciones sin sentido de IDH1 en posición 132 de la arginina, es menos frecuente que las mutaciones en el homólogo de arginina en posición 172. Sin embargo, en general, las alteraciones en IDH1 e IDH2 ocurren en el 80 a 90% de los astrocitomas infiltrantes grado II y grado III, oligodendrogliomas y glioblastomas secundarios. [42]

La mutación más frecuente de IDH es una mutación de sin sentido en IDH convirtiendo arginina en posición 132 a histidina. La proteína mutada es detectable por mediante un anticuerpo sensible y específico. La inmunopositividad para IDH es suficiente para clasificar un glioma como “IDH mutante”. [43]. Acuerdo a los nuevos criterios de la Organización Mundial de la Salud, se recomienda que la histología similar a un astrocitoma, demostrar la mutación IDH1, con pérdida de expresión nuclear de ATRX y/o una fuerte expresión difusa de p53 por inmunohistoquímica es suficiente para realizar un diagnóstico de **Astrocitoma IDH**.

Los astrocitomas IDH “wild type” o no mutados son una entidad controversial actualmente, diversos estudios y autores consideran que es posible establecer un diagnóstico molecular integrado a través de amplificación de EGFR, TERT o mutaciones de H3k27m o H3-G34 H3F3A-G34; o glioblastomas difusos de la línea media para así establecer el tipo correcto de glioblastoma: clásico, H3 o difuso de la línea media. En nuestro estudio solo un caso quedó asignado posterior a pruebas moleculares como Astrocitoma anaplásico, grado III IDH no mutante o wild type. Este caso carecía de mutación H3k27m y presentaba pérdida de patrón nuclear de ATRx.

ATRx

La inactivación de ATRX dentro de los gliomas puede ser causado por mutaciones, deleciones, fusión de genes o un conjunto de estas causas. Se ha demostrado que la pérdida de la expresión de esta proteína puede ser verificada mediante inmunohistoquímica; simplificando significativamente la incorporación de la deleción del estado de ATRX en la práctica clínica, dado que los métodos de secuenciación masiva serían difíciles de aplicar para un gen tan grande como ATRX. [44]. Las mutaciones de ARTX son más frecuentes en grados II y III de astrocitomas. La pérdida de expresión se ha detectado en el 41% de los astrocitomas anaplásicos, y en el 27% de los astrocitomas difusos. En este

estudio, en gliomas difusos hubo pérdida de expresión nuclear en el 33% y en astrocitomas anaplásicos en el 67%, lo que corresponde a la tendencia internacional que establece la pérdida de ATRx como un factor relacionado al grado. Sin embargo, han sido poco frecuentes en tumores oligodendrogiales con lo que se puede concluir el papel primordial del ATRX para definir un linaje astrocítico, sobre uno oligodendrogial. En este estudio, solo dos de 14 oligodendrogliomas mostraron pérdida de expresión de ATRx. Respecto a glioblastomas y ATRX, este gen fue detectado por primera vez en glioblastomas pediátricos asociados a mutaciones H3F3A, en adultos la pérdida de ATRX es poco frecuente, y parece estar fuertemente asociada con mutaciones de IDH y p53. En este estudio el 62.5% de los tumores mutados para ATRX presentaban mutaciones para IDH y para p53 y solo 4 casos correspondían a glioblastomas.

Fue estadísticamente significativo la asociación entre ATRX y el grado histológico; demostrando que, a mayor grado histológico, mayor es la posibilidad de que se mantenga la expresión nuclear de ATRX ($p=0.045$).

P53

En tumores con mutación en IDH y ATRX es frecuente encontrar que estos presentan mutación de TP53 hasta en el 94%. [45]. Estudios anteriores han detectado mutación en la proteína p53 mediante inmunohistoquímica en aproximadamente el 15 a 40% de los astrocitomas difusos, del 35 al 60% de los astrocitomas anaplásicos y el 35 a 70% de los glioblastomas. Todo esto parece indicar que la inactivación del gen supresor tumoral, p53, es un evento genético temprano que favorece la tumorigénesis en lesiones astrocíticas en el adulto. En nuestro estudio fueron 52 de 82 casos positivos para la mutación de p53; 16 casos correspondientes a astrocitomas (30.7%), de estos 9 fueron astrocitomas difusos y 5 astrocitomas anaplásicos. 29 casos (55.7%) diagnosticados de forma integrada como glioblastoma presentaron mutación de p53, de los cuales el 65% fueron glioblastomas IDH mutante. Datos que correlacionan directamente con estudios

previos en los cuales se ha detectado por inmunohistoquímica p53 en 15 al 40% de los astrocitomas difusos, 35 a 60% en los astrocitomas anaplásicos y del 35 al 70% de los glioblastomas. [55]. Actualmente están bien establecidas diferentes vías para la tumorigénesis de glioblastomas, de acuerdo a Verhaak y colaboradores de acuerdo al datos del Atlas del genoma del cáncer donde se analizaron perfiles de expresión génica, se identificaron 840 genes que permitieron establecer 4 subtipos moleculares de glioblastomas: el de tipo 1) proneural, que se asemeja más a un oligodendrocito y presenta mutación en IDH1 y TP52; afecta a pacientes más jóvenes y presenta mejor supervivencia; se asocia a glioblastomas secundarios; el tipo 2) neural que se asemeja más a una neurona madura y no tiene una vía dominante en su biología; 3) el clásico y el 4) mesenquimal son los que se asemejan más a los astrocitos y están dominados por la amplificación y activación de la mutación de EGFR; además presenta pérdida del cromosoma 10, delección de CDKN2A y ausencia en general del resto de las alteraciones como p53 e IDH. El tipo mesenquimal es dominado por pérdida de NF1.[56]. La mutación de p53 se ha observado en el 10 al 35% de los glioblastomas primarios y en el 65 a 90% en glioblastomas secundarios; datos que correlacionan con nuestro estudio (65% mutantes y 35% glioblastomas IDH wild type).

Solo 6 casos de oligodendrogliomas correspondientes al 11.5% mostraron mutación de p53, la mayoría de ellos como oligodendrogliomas anaplásicos (4 casos de 6). Estudios previos de Nayak y colaboradores [52] demostraron que solo el 28.5% de los oligodendrogliomas mostraban positividad para la proteína p53. Lo que correlaciona con estudios anteriores que han demostrado mutaciones del gen p53 en solo el 10 al 15% de estos tumores. Aunque se ha intentado relacionar con grado histológico, siendo ligeramente mayor en los oligodendrogliomas anaplásicos, en comparación con los tumores de grado II, 31.25% y 23%, respectivamente [52]. Sin embargo, de forma general no existe correlación estadísticamente significativa entre el grado histológico y la mutación de p53.

En este estudio fue significativa la correlación entre p53 y el grado histológico ($p=0.007$), concluyendo mayor tendencia a la positividad en grados altos en correlación con los de bajo grado.

Codeleción 1p19q

El oligodendroglioma, es otra forma de glioma difuso que está caracterizado por mutaciones de IDH y la codeleción de 1p/19q, que suelen afectar a todo el brazo cromosómico en ambos sitios. Se detectan hasta en el 80% de los oligodendrogliomas de bajo grado y aproximadamente en el 60% de los oligodendrogliomas anaplásicos. [48]. En general, el FISH se considera el método más adecuado para la detección de deleciones cromosómicas, incluso en comparación con PCR. El estudio mediante FISH es más sensible al detectar deleciones en muestras de celularidad mixta, y es capaz de detectar deleciones en poblaciones de células tumorales que representan tan solo entre el 15% y el 30% de todas las células de la muestra en comparación con un requisito del 60% al 90% de contenido de células tumorales para los estudios de PCR de pérdida de heterocigosidad. [57].

La pérdida aislada en 19q puede ocurrir en astrocitomas; así mismo, pero de forma menos frecuente se puede obtener una pérdida aislada de 1q en este tipo de gliomas difusos. Otras anomalías moleculares han sido reportadas en los tumores oligodendrogliales, incluyendo la ganancia de cromosoma 7, pérdida de 22q, y 9; así como polisomía de cromosoma 1 y/o el cromosoma 19. Una polisomía puede ser definida como más de 2 señales en 1q o en 19p que equivalgan en más de 30% de las células las cuales presenten al final una codeleción de 1p/19q. En nuestro estudio observamos una polisomía de 1q en el caso identificado como número 41, el cual pertenece a un paciente masculino de 50 años, con diagnóstico integrado de oligodendroglioma anaplásico, grado III de la OMS con codeleción demostrada por FISH para 1p19q.

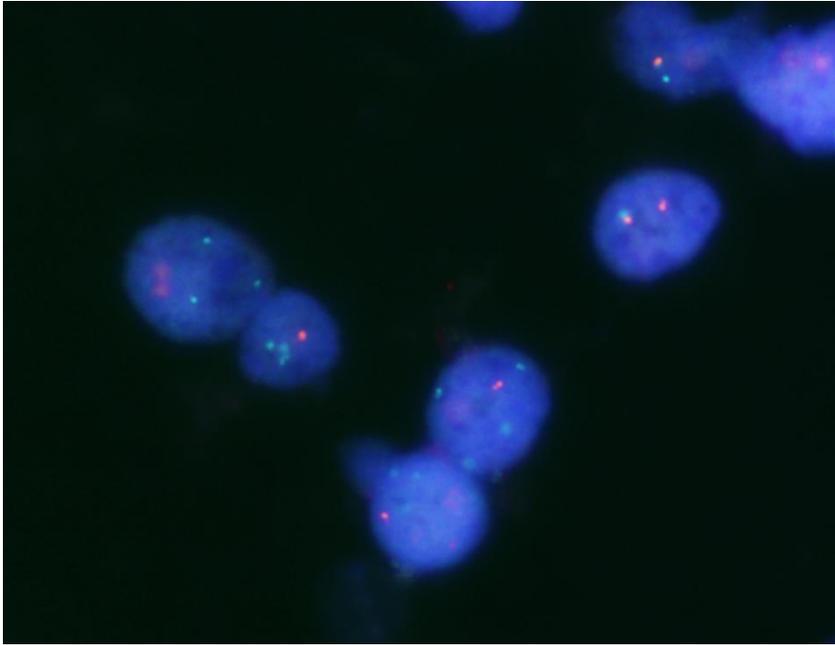


Figura 17. Caso 41, en el que se observa polisomía de 1q.

Ren y colaboradores mostraron la serie más grande de oligodendrogliomas en el cual se realizaron estudios de FISH a todos los casos, con el objetivo

de evaluar la importancia pronóstica de la co-polisomía del cromosoma 1q y 19p en tumores oligodendrogiales codificados con 1p/19q, de forma estadísticamente significativa, la prevalencia de polisomía se asoció con mayor frecuencia en oligodendrogliomas de grado alto. Y tras seguimiento clínico se llegó a la conclusión que la co-polisomía se asoció de forma independiente con una supervivencia libre de progresión y una supervivencia general más cortas en los oligodendrogliomas codificados con código 1p / 19q, independientemente de los grados del tumor.[58]. Es interesante como correlaciona nuestro caso siendo un oligodendroglioma de alto grado; sin embargo, y una limitante de nuestro estudio es la falta de seguimiento en nuestros pacientes.

EGFR

El FISH para la amplificación de *EGFR* generalmente se considera un estándar de oro para el diagnóstico de amplificación de *EGFR*, pero no está claro qué valores de corte (el porcentaje de núcleos positivos y la proporción óptima de *EGFR* frente a centrómero 7) deben usarse. Recientemente, estudios han intentado determinarlo, mediante el uso de datos de > 1000 muestras, proporcionamos evidencia de que el límite para determinar la amplificación del gen *EGFR* por FISH

debe aumentarse, preferiblemente a > 50% de los núcleos amplificados con *EGFR*. [59].

La amplificación de *EGFR* ocurre en 57.4% de los glioblastomas primarios comparado al 8% de los glioblastomas secundarios. En este estudio solamente el 23% de los glioblastomas IDH no mutante fueron positivos. Y no fue posible establecer una correlación entre la amplificación y la edad del paciente. Aunque la amplificación es un fenómeno frecuente y es determinante para el diagnóstico de glioblastomas, no es completamente necesario para el diagnóstico integrado según la clasificación de la OMS del 2016; hasta este momento, el diagnóstico de glioblastoma solo debe ser completado con el estatus de IDH. El mayor impacto de esta amplificación tiene que ver con el manejo y pronóstico de los pacientes con glioblastomas, con la posibilidad de otorgarles terapia anti-*EGFR*.

En esta serie no fue posible establecer la importancia de esta amplificación, pues la principal limitante es la falta de seguimiento clínico.

H3K27m

El glioma difuso de la línea media con mutación H3 K27M es una nueva entidad dentro de los glioblastomas, introducida por primera vez en la clasificación de la OMS en el año 2016. Fue identificado por primera vez en los gliomas pontinos intrínsecos pediátricos; este subgrupo se define por mutaciones de ganancia de función en genes que codifican la histona H3 (*H3F3A*, *HIST1H3B*, *HIST1H3C* o *HIST1H3I*) que dan como resultado una sustitución de aminoácidos Lisina > Metionina en la posición 27. Esta alteración, que aparece precoz y homogéneamente, también se identificó en adultos con gliomas difusos, predominantemente aquellos con edades tempranas de aparición y tumores en localizaciones de la línea media como la médula espinal, tálamo, tronco encefálico y cerebelo. Aunque la clasificación histológica de estos tumores suele ser de bajo grado, su resultado clínico es malo.

En este estudio fue significativa la correlación entre expresión de H3k27m (p=0.003), con mayor tendencia a la positividad en gliomas de alto grado.

Brachyury

El factor de transcripción BRACHYURY (TBXT) es un factor de transcripción de la familia T-box con un rol central en la especificación de la notocorda y mesodermo, y su alteración es asociada con defectos congénitos, la mayoría en tubo neural.

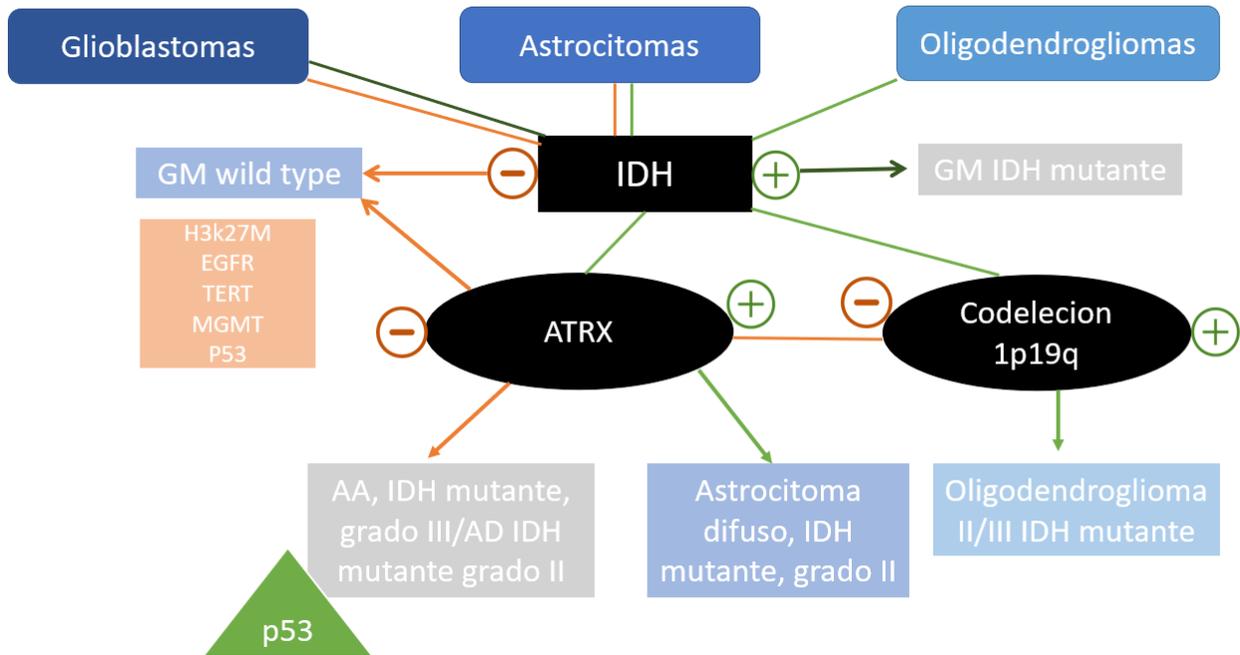
Pinto y colaboradores (2020), demostraron en su estudio que la pérdida de brachyury es un biomarcador importante de mal pronóstico en los gliomas y sugiere fuertemente un papel supresor tumoral, expresándose de forma nuclear en gliomas de bajo grado y conforme aumentaba el grado, irse perdiendo.

En este estudio, solo dos casos mostraron positividad nuclear, no siendo posible establecer ninguna correlación al respecto.

Limitantes del estudio

De forma general, las limitantes de este estudio se confinan al tamaño de la muestra; de 82 casos, cinco fueron no valorables. Además, la falta de seguimiento clínico no nos permite en este momento establecer el pronóstico real y su correlación con los biomarcadores necesarios para el diagnóstico integrado de la Organización Mundial de la Salud del 2016.

Algoritmo diagnostico propuesto



CONCLUSIÓN

En conclusión, la nueva clasificación molecular del 2016 en tumores gliales difusos por la Organización mundial de la Salud (OMS), exige la realización de pruebas especializadas para la determinación del diagnóstico integrado adecuado, con severas consecuencias pronosticas para el paciente.

Si bien, la base morfológica es el inicio del abordaje de estos tumores, en este estudio pudimos observar que la concordancia entre la morfología observada por patólogos experimentados y los estudios de biología molecular es buena.

La tasa mayor de cambio entre el diagnóstico inicial y el integrado fue a nivel del grupo de los oligodendrogliomas que requieren de pruebas de FISH (codeleción 1p19q), IDH y ATRx para confirmar este diagnóstico en todos los casos.

El resto de las entidades tuvo buena concordancia, de hecho, en glioblastomas el cambio fue mínimo y la correlación entre patólogos expertos fue excelente. Así mismo, en el grado histológico fue muy alta, lo que nos puede ayudar a concluir que los casos revisados por al menos 2 patólogos experimentados puede proporcionar una certeza diagnóstica adecuada; esto cobra importancia en países con acceso limitado a recursos, para utilizarlos en los casos de mayor impacto pronóstico en nuestra población.

Se sugieren realizar estudios en la población mexicana para correlacionar los hallazgos moleculares con seguimiento clínico y valorar así el impacto de la clasificación molecular en nuestra población.

REFERENCIAS

1. Central Brain Tumor Registry of the United States (CBTRUS). CBTRUS Fact sheet 2016. CBTRUS; 2016. <http://www.cbtrus.org/factsheet/factsheet.html>.
2. Pieter Wesseling, Johan M. Kros, Judith W.M. Jeuken, The pathological diagnosis of diffuse gliomas: towards a smart synthesis of microscopic and molecular information in a multidisciplinary context, *Diagnostic Histopathology*, Volume 17, Issue 11, 2011, Pages 486-494.
3. K. Masui, T. F. Cloughesy and P. S. Mischel (2012) *Neuropathology and Applied Neurobiology* 38, 271–291. Molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies
4. Hegi, M.E., Diserens, A.C., Gorlia, T., et al., 2005. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* 352 (10), 997–1003.
5. Frank Y. Shan, E. Castro, Amelia Sybenga, Sanjib Mukherjee, Erxi Wu, Karming Fung, The Li, Ekokobe Fonkem, Jason H. Huang and A. Rao. *Molecular Diagnostics and Pathology of Major Brain Tumors*. IntechOpen. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.80856>.
6. Christina L. Appin, Daniel J. Brat. Biomarker-driven diagnosis of diffuse gliomas. *C .L. Appin, D.J. Brat/Molecular Aspects of Medicine* 45 (2015) 87–9.
7. Dang, L., White, D.W., Gross, S., et al., 2009. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462 (7274), 739–744.
8. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, et al. Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell*. 2010;17(5):510–522.
9. Cairns RA, Mak TW. Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations: Mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer Discov.* 2013;3:73041. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-0083>

10. Labussiere M, Sanson M, Idbaih A, Delattre JY. IDH1 gene mutations: new paradigm in glioma prognosis and therapy? *Oncologist*. 2010;5:196-9. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2009-0218>.
11. Sunhee C. Lee, MD. Diffuse Gliomas for Nonneuropathologists. The new integrated molecular diagnostics. *Arch Pathol Lab Med*—Vol 142, July 2018.
12. Parsons, D.W., Jones, S., Zhang, X., et al., 2008. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 321 (5897),1807–1812.
13. Marco Antonio Alegría-Loyola, Javier Andrés Galnares-Olalde, Moisés Mercado. Tumores del sistema nervioso central. *Rev Med Inst Mex Seguro Soc*. 2017;55(3):330-40.
14. Guyen DN, Heaphy CM, de Wilde RF, et al. Molecular and morphologic correlates of the alternative lengthening of telomeres phenotype in high-grade astrocytomas. *Brain Pathol*. 2013;23(3):237–243.
15. Eckel-Passow JE, Lachance DH, Molinaro AM, et al. Glioma groups based on 1p/19q, IDH, and TERT promoter mutations in tumors. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2499–2508.
16. Yemelyanova A, Vang R, Kshirsagar M, et al. Immunohistochemical staining patterns of p53 can serve as a surrogate marker for TP53 mutations in ovarian carcinoma: An immunohistochemical and nucleotide sequencing analysis. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2011;24:1248-1253. DOI: 10.1038/modpathol.2011.85.
17. Jeuken JWM, von Deimling A, Wesseling P. Molecular pathogenesis of oligodendroglial tumors. *Journal of Neuro-Oncology*. 2004;70:161-181. DOI: 10.1007/s11060-004-2748-1.
18. McNamara MG, Jiang H, Lim-Fat MJ, et al. Treatment outcomes in 1p19q co-deleted/partially deleted gliomas. *Canadian Journal of Neurological Sciences*. 2017;44:288-294. DOI: 10.1017/cjn.2016.420.

19. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110(15):6021-6.
20. A. Alkhaibary, A. H. Alassiri, F. AlSufiani et al., Ki-67 labeling index in glioblastoma; does it really matter?, *HematolOncol Stem Cell Ther*,<https://doi.org/10.1016/j.hemonc.2018.11.001>.
21. Thotakura, et al.: Ki- 67 labeling index in astrocytomas. *Journal of Cancer Research and Therapeutics* - July-September 2014 - Volume 10 - Issue 3.
22. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (Eds.). WHO classification of Tumours of the central nervous system. 4th Ed. revised. Lyon: IARC; 2016
23. Louis DN1, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleihues P, Korshunov A, Kros JM, Beatriz Lopes M, Ng HK, Ohgaki H, Paulus W, Pietsch T, Rosenblum M, Rushing E, Soylemezoglu F, Wiestler O, Wesseling P; International Society Of Neuropathology--Haarlem. International Society Of Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol*. 2014 Sep;24(5):429-35. doi: 10.1111/bpa.12171. Epub 2014 Sep 10.
24. E. Reuss, David & Kratz, Annkathrin & Sahm, Felix & Capper, David & Schrimpf, Daniel & Koelsche, Christian & Hovestadt, Volker & Bewerunge-Hudler, Melanie & T. W. Jones, David & Schittenhelm, Jens & Mittelbronn, Michel & Rushing, Elisabeth & Simon, Matthias & Westphal, Manfred & Unterberg, Andreas & Platten, Michael & Paulus, Werner & Reifenberger, Guido & Tonn, Joerg-Christian & von Deimling, Andreas. (2015). Adult IDH wild type astrocytomas biologically and clinically resolve into other tumor entities. *Acta Neuropathologica*. 130. 10.1007/s00401-015-1454-8.
25. Iorgulescu JB, Torre M, Harary M, Smith TR, Aizer AA, Reardon DA, Barnholtz-Sloan JS, Perry A. The Misclassification of Diffuse Gliomas: Rates and Outcomes.

Clin Cancer Res. 2019 Apr 15;25(8):2656-2663. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3101. Epub 2019 Jan 11.

26. Gustavo Anaya-Delgadillo, Pedro Pablo de Juambelz-Cisneros, Basilio Fernández-Alvarado, Fernando Pazos-Gómez, Andrea Velasco-Torre, Rogelio Revuelta-Gutiérrez Prevalence of central nervous system tumours and histological identification in the operated patient: 20 years of experience *Cirugía y Cirujanos* (English Edition), Volume 84, Issue 6, November–December 2016, Pages 447-453.

27. Zhang Y, Yu X, Chen L, Zhang Z, Feng S: EZH2 overexpression is associated with poor prognosis in patients with glioma. *Oncotarget* 8: 565–573, 2017.

28. Purkait S, Sharma V, Jha P, et al.: EZH2 expression in gliomas: Correlation with CDKN2A gene deletion/ p16 loss and MIB-1 proliferation index. *Neuropathology* 35: 421–431, 2015.

29. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW (2016) The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: a summary. *Acta Neuropathol* 131:803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.

30. Feng J, Hao S, Pan C, Wang Y, Wu Z, Zhang J, Yan H, Zhang L, Wan H (2015) The H3.3 K27M mutation results in a poorer prognosis in brainstem gliomas than thalamic gliomas in adults. *Hum Pathol* 46:1626–1632. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2015.07.002>

31. Pinto F, Campanella NC, Abrahao-Machado LF, et al. The embryonic Brachyury transcription factor is a novel biomarker of GIST aggressiveness and poor survival. *Gastric Cancer* 2016; 19: 651–659.

32. Palena C, Roselli M, Litzinger MT, et al. Overexpression of the EMT driver brachyury in breast carcinomas: association with poor prognosis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: pii: dju054.

33. Haro A, Yano T, Kohno M, et al. Expression of brachyury gene is a significant prognostic factor for primary lung carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013; 20(Suppl 3): S509–S516.
34. Roselli M, Fernando RI, Guadagni F, et al. Brachyury, a driver of the epithelial-mesenchymal transition, is overexpressed in human lung tumors: an opportunity for novel interventions against lung cancer.
35. Hamilton DH, Litzinger MT, Jales A, et al. Immunological targeting of tumor cells undergoing an epithelial-mesenchymal transition via a recombinant brachyury-yeast vaccine. *Oncotarget* 2013; 4: 1777–1790.
36. Shah SR, David JM, Tippens ND, et al. Brachyury-YAP regulatory Axis drives stemness and growth in cancer. *Cell Rep* 2017; 21: 495–507.
37. Jezkova J, Williams JS, Pinto F, et al. Brachyury identifies a class of enteroendocrine cells in normal human intestinal crypts and colorectal cancer. *Oncotarget* 2016; 7: 11478–11486.
38. Pinto, F., Costa, Â, Santos, G., Matsushita, M., Costa, S., Silva, V. Reis, R. (2020, April 04). The T-box transcription factor brachyury behaves as a tumor suppressor in gliomas. Retrieved September 03, 2020, from <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.5419>.
39. Takami H, Yoshida A, Fukushima S, et al. Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry--A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain Pathol.* 2015;25(3):256-265. doi:10.1111/bpa.12173.
40. Takano S, Tian W, Matsuda M, et al. Detection of IDH1 mutation in human gliomas: comparison of immunohistochemistry and sequencing. *Brain Tumor Pathol.* 2011;28:115–123.
41. Varella-Garcia M, Diebold J, Eberhard DA, et al. EGFR fluorescence in situ hybridisation assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *J Clin Pathol.* 2009;62(11):970-977. doi:10.1136/jcp.2009.066548.

42. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med*. 2009;360(8):765–73.
43. Cancer Genome Atlas Research N, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, et al. Comprehensive, integrative genomic analysis of diffuse lower-grade gliomas. *N Engl J Med*. 2015;372(26):2481–98.
44. Utility of ATRX immunohistochemistry in diagnosis of adult diffuse gliomas. Ikemura M, Shibahara J, Mukasa A, Takayanagi S, Aihara K, Saito N, Aburatani H, Fukayama M. *Histopathology*. 2016 Aug; 69(2):260-7.
45. Jiao, Y., Killela, P.J., Reitman, Z.J., et al., 2012. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* 3 (7), 709–722.
46. Gibbons RJ, TL M, Raman S, DM O, Garrick D, Ayyub H, et al. Mutations in ATRX, encoding a SWI/SNF-like protein, cause diverse changes in the pattern of DNA methylation. *Nat Genet* (2000) 24(4):368–71.10.1038/74191
47. Nandakumar P, Mansouri A, Das S. El papel de ATRX en la biología del glioma. *Front Oncol* . 2017; 7: 236. Publicado el 29 de septiembre de 2017. doi: 10.3389 / fonc.2017.00236.
48. M.J. Riemenschneider, J.W. Jeuken, P. Wesseling, G. Reifenberger. Molecular diagnostics of gliomas: state of the art. *Acta Neuropathol*, 120 (2010), pp. 567-584
49. Fulci G, Ishii N, Van Meir EG. p53 and brain tumors: From gene mutations to gene therapy. *Brain Pathol* 1998; 8:599-613.
50. Louis DN, von Deimling A, Chung RY, et al. Comparative study of p53 gene and protein alterations in human astrocytic tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 1993;52:31-8.
51. Newcomb EW, Madonia WJ, Pisharody S, et al. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 1993;3:229-35.

52. Nayak A, Ralte AM, Sharma MC, Singh VP, Mahapatra AK, Mehta VS, Sarkar C. p53 protein alterations in adult astrocytic tumors and oligodendrogliomas. *Neurol India*. 2004 Jun;52(2):228-32. PMID: 15269478.
53. Martin Hasselblatt, MD, Mohammed Jaber, MD, David Reuss, MD, Oliver Grauer, MD, PhD, Annkatrin Bibo, Stephanie Terwey, MD, Uta Schick, MD, Heinrich Ebel, MD, Thomas Niederstadt, MD, Walter Stummer, MD, Andreas von Deimling, MD, Werner Paulus, MD, Diffuse Astrocytoma, IDH-Wildtype: A Dissolving Diagnosis, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 77, Issue 6, June 2018, Pages 422–425, <https://doi.org/10.1093/jnen/nly012>.
54. Testa U, Castelli G, Pelosi E. Genetic Abnormalities, Clonal Evolution, and Cancer Stem Cells of Brain Tumors. *Med Sci (Basel)*. 2018;6(4):85. Published 2018 Oct 2. doi:10.3390/medsci6040085.
55. Fulci G, Ishii N, Van Meir EG. p53 and brain tumors: From gene mutations to gene therapy. *Brain Pathol* 1998; 8:599-613.
56. Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*. 2010 Jan 19;17(1):98-110.
57. Fuller CE, Perry A. Fluorescence in situ hybridization (FISH) in diagnostic and investigative neuropathology. *Brain Pathol*. 2002;12:67–86.
58. Ren, X., Jiang, H., Cui, X., Cui, Y., Ma, J., Jiang, Z., Sui, D., & Lin, S. (2013). Co-polysomy of chromosome 1q and 19p predicts worse prognosis in 1p/19q codeleted oligodendroglial tumors: FISH analysis of 148 consecutive cases. *Neuro-oncology*, 15(9), 1244–1250. <https://doi.org/10.1093/neuonc/not092>.
59. Pim J French, Marica Eoli, Juan Manuel Sepulveda, Iris de Heer, Johan M Kros, Annemiek Walenkamp, Jean-Sebastien Frenel, Enrico Franceschi, Paul M

Clement, Michael Weller, Peter Ansell, Jim Looman, Earle Bain, Marie Morfouace, Thierry Gorlia, Martin van den Bent, Defining *EGFR* amplification status for clinical trial inclusion, *Neuro-Oncology*, Volume 21, Issue 10, October 2019, Pages 1263–1272.

60. Johan M. Kros, MD, PhD, Grading of Gliomas: The Road From Eminence to Evidence, *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, Volume 70, Issue 2, February 2011, Pages 101–109

61. Furnari FB, Cloughesy TF, Cavenee WK, Mischel PS. Heterogeneity of epidermal growth factor receptor signalling networks in glioblastoma. *Nature reviews Cancer*. 2015;15:302–310.

62. Congdon KL, Gedeon PC, Suryadevara CM, Caruso HG, Cooper LJ, Heimberger AB, et al. Epidermal growth factor receptor and variant III targeted immunotherapy. *Neuro-oncology*. 2014;16(Suppl 8):viii20–25.