

Facultad de Medicina Universidad de Antioquia
Especialización en Patología

Proyecto

Detección de la mutación de la isocitrato deshidrogenasa en gliomas difusos
grados II, III y IV

Investigadores

Pablo Naranjo Botero, Leiby Alejandra Medina Zuluaga, Residentes de Patología,
Universidad de Antioquia.

Coinvestigador

Carlos Mario Muñetón, Msc, Grupo de Genética Médica-LIME, Facultad de
Medicina, Universidad de Antioquia.

Director

Juan Carlos Arango Viana, MD, PHD, profesor Departamento de Patología,
Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia

Asesor metodológico

Sigifredo Ospina Ospina. MD Epidemiólogo, Profesor Facultad de Medicina,
Universidad de Antioquia

Detección de la mutación de la Isocitrato deshidrogenasa en gliomas difusos grados II, III y IV

Detection of isocitrate dehydrogenase's mutation in diffuse gliomas, grades II, III and IV

Pablo Naranjo Botero¹, Leiby Alejandra Medina Zuluaga², Carlos Mario Muñetón³, Juan Carlos Arango Viana⁴, Sigifredo Ospina Ospina⁵.

^{1,2}. Residentes de patología, Universidad de Antioquia (pablo.naranjob@udea.edu.co, leiby.medina@udea.edu.co)

³. Biólogo, . Msc, grupo de genética Médica, Facultad de medicina, Universidad de Antioquia (carlos.muneton@udea.edu.co)

⁴. MD, PHD, Profesor del Departamento de Patología Universidad de Antioquia (jcarlos.arango@udea.edu.co)

⁵. MD, Epidemiólogo, Profesor de la Facultad de Medicina Universidad de Antioquia (doctorsigifredo@gmail.com).

RESUMEN

Introducción: Los tumores gliales son las neoplasias malignas primarias más frecuentes del sistema nervioso central, asociadas con gran mortalidad y morbilidad dada su localización y comportamiento biológico. Históricamente se han clasificado según su morfología, con pobre correlación con el pronóstico y comportamiento del tumor. Recientemente se identificaron mutaciones en los genes de la Isocitrato Deshidrogenasa (IDH) 1 y 2 como pieza clave en el proceso de tumorigénesis y a su vez, como uno de los principales factores pronósticos en estas neoplasias. Debido a esto, la Organización Mundial de la Salud, dentro de su actual clasificación (2016), incluyó al estado de IDH dentro del algoritmo diagnóstico en gliomas, dividiéndolos en IDH mutados y no mutados.

Objetivo: Determinar la presencia de mutaciones de la enzima Isocitrato Deshidrogenasa (*IDH1* e *IDH2*) mediante inmunohistoquímica y secuenciación Sanger en una población de pacientes con diagnóstico de glioma difuso grado II, III y IV, y su correlación con el tiempo de supervivencia.

Materiales y Métodos: Se realizó un estudio descriptivo, prospectivo y retrospectivo. La población de estudio estuvo conformada por pacientes entre los 18 y 45 años con diagnóstico de glioma difuso grado II, III y IV, atendidos en el Hospital San Vicente Fundación de Medellín en el periodo comprendido entre los años 2012 y 2017, en quienes se realizó un análisis de mutaciones en los genes *IDH1* e *IDH2*, por secuenciación Sanger y tinción de inmunohistoquímica (R132H) a partir de muestras de tejido fijadas en formol y embebidas en parafina.

Resultados: Se incluyeron 14 pacientes, la edad promedio fue 37 años (rango 24 – 45) y el 57% fueron del sexo masculino. Glioblastoma fue la neoplasia más

frecuente, diagnosticada en 42.9% de casos. La sobrevida fue de 1 a 102 meses, con media de 44 meses. El 71% de los pacientes presentó mutación de IDH1 por inmunohistoquímica, 7% mostraron mutación de IDH2 por secuenciamiento Sanger y 14% tuvieron IDH normal.

Conclusiones: los gliomas difusos grado II, III, y IV predominan en el sexo masculino, y de ellos el más frecuente es el Glioblastoma. 78.6% de casos presentó IDH mutada con promedio de sobrevida de 48 meses; de estos, 9% presentaron mutación de *IDH2*. Estos hallazgos sugieren que los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores, con gran variabilidad genética, la cual impacta en su comportamiento. La detección de mutación de los genes *IDH1* e *IDH2* en los tumores gliales puede contribuir a orientar el pronóstico de los pacientes. Es necesario realizar estudios con una muestra de mayor tamaño, de rango etario más amplio para confirmar estos resultados.

Palabras clave: Isocitrato deshidrogenasa, inmunohistoquímica, secuenciamiento sanger, glioma.

ABSTRACT

Introduction: glial tumors are the most frequent primary malignant neoplasia in the central nervous system. They are associated with high morbidity and mortality, due to their location and biological behavior. Historically they have been classified according to morphology, with poorly correlation between prognosis and evolution of the tumor. Recently, the isocitrate dehydrogenase (IDH) 1 and 2 genes mutation has been identified as a key prognostic factor in these neoplasia. Because of this, the World Health Organization, within its current classification (2016), included IDH status within the glioma's diagnostic algorithm, dividing them into IDH mutated and wild type.

Objective: Determine the presence of the isocitrate dehydrogenase enzyme mutation (IDH1 and IDH2) by immunohistochemistry and Sanger sequencing in a population of patients diagnosed with grade II, III and IV diffuse gliomas, and their correlation with survival time.

Materials and methods: A descriptive, prospective and retrospective study was conducted. The study population consisted of patients between the age of 18 and 45 years with diagnosis of diffuse glioma grades II, III and IV, attended at the Hospital San Vicente Foundation of Medellin in the period from 2012 to 2017, in whom the detection of IDH mutation was assessed by Sanger sequencing and immunohistochemistry staining (R132H) over formalin fixed tissue, embedded in paraffin.

Results: 14 patients were included in the study. the mean age was 37 years (range 24 – 45) and 57% were male. Glioblastoma was the most frequent neoplasia, diagnosed in 42.9% of cases. The overall Survival was between 1 to 102 months, with an average of 44 months. 71% of patients were positive for IDH1 mutation by immunohistochemistry, 7% show mutation in IDH2 by Sanger sequencing and 14% had wild type IDH.

Conclusions: diffuse grade II, III, and IV gliomas predominate in males, and the most common of these is Glioblastoma. 78.6% of cases presented mutated IDH with an average survival of 48 months; of these, 9% had an IDH2 mutation. These findings suggest that gliomas are a heterogeneous group of tumors, with great genetic variability, which impacts their behavior. Detection of IDH1 and IDH2 in glial tumors can help guide the prognosis of patients. Studies with a larger sample, of a broader age range, are necessary to confirm these results.

Key Words isocitrate dehydrogenase, immunohistochemistry, sanger sequencing, glioma.

Introducción

Los tumores gliales son neoplasias frecuentes del sistema nervioso central (SNC). Estas representan aproximadamente el 24.1% de todas las neoplasias primarias del SNC y el 80.8% de las neoplasias malignas primarias a este nivel, según estadísticas del “Central Brain Tumor Registry” de los Estados Unidos, publicadas en el año 2020(1). Estos representaron, según datos recopilados en el 2018 por la “International Agency for Research on Cancer”, un 3,6% de los diagnósticos de novo de cáncer en Colombia y fueron responsables de un 2,1% del total de muertes por cáncer(2). Estas neoplasias se asocian con una gran mortalidad y morbilidad, dada su localización y su comportamiento biológico, e históricamente se han clasificado según su morfología, clasificación que ha tenido pobre correlación con el pronóstico y comportamiento de la neoplasia, su respuesta al tratamiento clásico, sumado a una baja reproducibilidad interobservador(3,4).

Gracias a la aplicación de técnicas de biología molecular, se han identificado mutaciones conductoras (es decir aquellas que inician y guían el proceso de tumorigénesis), como la alteración del gen que codifica la enzima Isocitrato Deshidrogenasa (IDH) 1 y 2; éstas modifican la biología y el comportamiento de los gliomas y son actualmente consideradas como uno de los principales factores pronósticos en estas neoplasias(5). Dichas mutaciones se han encontrado en aproximadamente el 70% de los gliomas difusos grados II y III y representan un factor pronóstico favorable en cuanto a sobrevida general y respuesta al tratamiento, comparado con las variantes no mutadas(4,6). Esto llevó a que en la nueva clasificación propuesta por la Organización Mundial de la salud (OMS) en el año 2016, integrara el estado de IDH dentro de la clasificación de los gliomas,

separándolos en IDH mutado y no mutado (WT por su sigla en inglés de “wildtype”), como entidades diferentes, cada una con comportamiento y pronóstico particular(3).

La isocitrato deshidrogenasa es una enzima codificada por los genes *IDH1* e *IDH2*, ubicados en las regiones cromosómicas 2q33.3 y 15q26.1 respectivamente, la cual cataliza la carboxilación del isocitrato a alfa-cetoglutarato (α-KG); reduciendo NADP⁺ a NADPH durante el proceso(7). La mutación de la cadena de aminoácidos en el sitio 132 o 172 en la *IDH1* e *IDH2* respectivamente, lleva al debilitamiento de su unión al isocitrato y a una ganancia de función teniendo como nuevo producto el D-2-hidroxiglutarato (D-2HG), sintetizado a expensas de NADPH, el cual inhibe de forma competitiva las dioxigenasas e hidroxilasas dependientes del α-cetoglutarato(6)(8)(9); esto lleva a hipermetilación de islas CG, desregulación de HIF-1α y a un aumento del estrés oxidativo de la célula(6). La mutación de IDH no es exclusiva de gliomas, y se ha visto relacionada a algunas neoplasias de estirpe hematolinfoides(10)(11) y tumores sólidos como colangiocarcinomas, melanomas y condrosarcomas(12)(13).

En Colombia, en el año 2016, un estudio realizado en la ciudad de Bogotá por el grupo de Patología Molecular de la universidad Nacional de Colombia, evaluó 26 pacientes con gliomas difusos, encontrando la mutación de IDH 1 o 2 en 57,1% de todos los pacientes evaluados, y en el 100% de los oligodendrogliomas, pero solo en el 36,1% de los astrocitomas(14). En Antioquia el estado de IDH de los gliomas no ha sido estudiado, ya que el mismo es poco asequible en el medio, lo que limita las posibilidades de llegar a un diagnóstico completo. El propósito de este estudio fue determinar la presencia de la mutación IDH 1 y 2 en pacientes adultos entre los 18 y los 45 años con gliomas difusos grados II, III, y IV, y su correlación con sobrevida.

Materiales y métodos

Se realizó un estudio descriptivo, retrospectivo y prospectivo. La población de estudio estuvo conformada por todos los pacientes entre los 18 y 45 años de edad, con diagnóstico de glioma difuso grado II, III y IV, a quienes se les realizó la detección de la mutación de IDH por secuenciamiento tipo Sanger y tinción de inmunohistoquímica a partir de muestras fijadas en formol y embebidas en un bloque de parafina, cuyas muestras hubieran sido procesadas en el laboratorio de patología de la Universidad de Antioquia, entre los años 2012 y 2017. Fueron excluidos aquellos pacientes con datos clínicos incompletos y aquellos que no pudieron ser contactados.

Las variables consideradas dentro del estudio fueron la edad al diagnóstico, sexo del paciente, diagnóstico morfológico realizado con hematoxilina eosina, tiempo de sobrevida luego del diagnóstico y el estado de los genes *IDH1* y *IDH2*. Para el estudio del estado de *IDH1* e *IDH2*, fueron realizadas coloraciones de inmunohistoquímica

para la mutación R132H del gen de *IDH1*, utilizando el clon H09 para *IDH1*-R132H; y secuenciamiento genético tipo Sanger de los genes *IDH1* e *IDH2*. Estos estudios se realizaron sobre tejido tumoral proveniente de los bloques de parafina almacenados en el Departamento de Patología de la Universidad de Antioquia (El procedimiento detallado se describe en el anexo). Para determinar la positividad de la tinción de inmunohistoquímica, se usó como punto de corte la tinción citoplasmática en más del 10% de las células tumorales(15,16). Los amplicones utilizados para el secuenciamiento fueron obtenidos por PCR utilizando primers específicos de los genes *IDH1* e *IDH2* diseñados por el grupo de genética médica de la Universidad de Antioquia; las secuencias obtenidas se compararon con las referencias publicadas en el GenBank para ambos genes.

Para el análisis de las variables cuantitativas se utilizaron medidas de tendencia central como la media con su desviación estándar o la mediana con su rango intercuartílico, según la distribución de los datos por Shapiro Wilk. Para las variables cualitativas se utilizaron distribuciones de frecuencias absolutas y relativas de cada una de las categorías de las variables. Para la creación de la curva de Kaplan Meier se utilizó el paquete de expansión de Microsoft Excel “*real statistics*”, comparando población de IDH mutado Vs IDH no mutado.

Esta investigación fue evaluada y avalada por el Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Antioquia y por el comité de Ética del hospital Universitario San Vicente Fundación. Se garantizó la confidencialidad de la información relacionada con la identificación de los pacientes en todas las etapas del estudio.

Resultados

Se identificaron 75 pacientes como elegibles, en la base de datos del departamento de patología con diagnóstico de Glioma difuso grados II, III y IV que cumplieran con criterios de inclusión del estudio. De éstos, solo 14 pacientes o familiares lograron ser contactados, y después de aplicado el consentimiento verbal vía telefónica, todos aceptaron hacer parte del estudio (Figura 1).

La edad promedio de los pacientes fue de 37 años (DE:6.5), con un mínimo de 24 y un máximo de 45 años. El 57% (8) fueron del sexo masculino. En la tabla 1 de describen las características de los pacientes incluidos en el estudio

Figura 1. Diagrama de flujo de la muestra

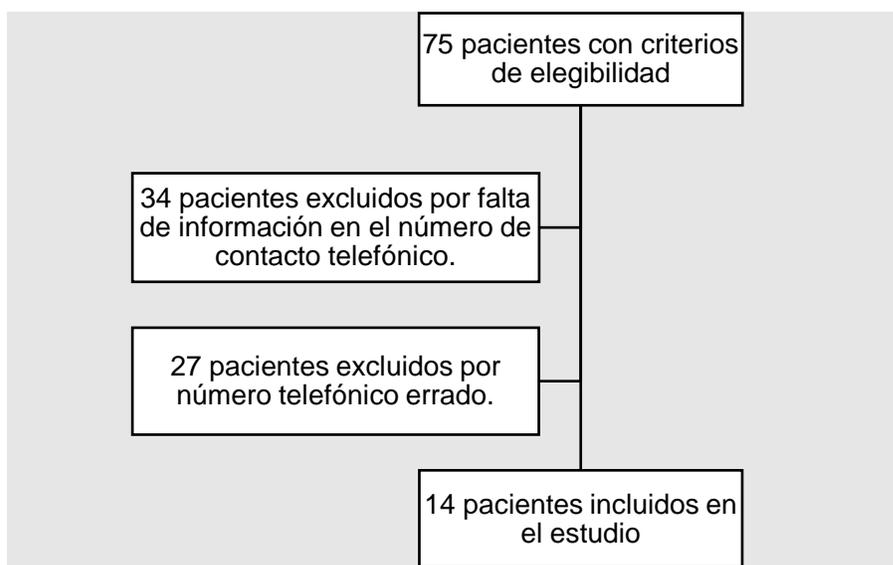


Tabla 1. Características de los pacientes con glioma difuso grados II, III y IV

Caso	Edad Años	Sexo	Diagnóstico Histológico	Sobrevida En meses	IDH 1 (IHQ)	IDH1 Genética	IDH2 Genética
1	33	M	Glioblastoma	36	Positivo	WT	WT
2	31	M	Astrocitoma difuso	31	Positivo	SD	WT
3	34	F	Oligoastrocitoma anaplásico	102	Positivo	SD	WT
4	40	F	Astrocitoma anaplásico	7	Positivo	SD	WT
5	39	F	Astrocitoma difuso	94	Positivo	SD	WT
6	44	F	Glioblastoma	70	Negativo	WT	WT
7	24	F	Glioblastoma	13	Positivo	SD	WT
8	41	M	Astrocitoma anaplásico	78	Positivo	SD	WT
9	41	M	Glioblastoma	73	Positivo	SD	SD
10	26	M	Glioblastoma	5	Positivo	SD	WT
11	43	M	Oligoastrocitoma anaplásico	1	Negativo	WT	WT
12	39	M	Glioblastoma	20	Negativo	SD	SD
13	39	F	Oligodendroglioma anaplásico	48	Positivo	SD	SD
14	45	M	Oligoastrocitoma anaplásico	38	Negativo	SD	Mutada

SD: Sin dato por degradación del ADN de la muestra.

Histológicamente, el diagnóstico más frecuente en la población estudiada fue el Glioblastoma, en el 42.9% (6) de los pacientes (Tabla 2).

Tabla 2. Distribución de los pacientes con glioma difuso grados II, III y IV según diagnóstico histológico

Tipo de tumor	Número de pacientes	Porcentaje
Glioblastoma	6	42.9%
Oligoastrocitoma anaplásico	3	21.4%
Astrocitoma anaplásico	2	14.3%
Astrocitoma difuso	2	14.3%
Oligodendroglioma anaplásico	1	7.1%
Total	14	100%

El 71% (10) de los pacientes fueron positivos para la mutación *IDH1* por tinción de IHQ. Se logró la amplificación de material genético por medio de PCR en las muestras de 11 pacientes, y se intentó el secuenciamiento de ambas cadenas (*IDH1*, *IDH2*). En el secuenciamiento de *IDH1*, dado el tamaño y complejidad del gen, se lograron obtener solo 3 secuencias completas, sin mutaciones. En el secuenciamiento del gen *IDH2*, se obtuvo la secuencia completa en 11 casos; 1(7%) de ellos presentó mutación patológica (Tabla 3)

Tabla 3. Distribución de los pacientes con glioma difuso grados II, III y IV según diagnóstico histológico y estado de *IDH1* e *IDH2*

Diagnósticos	Mutación IDH 1 (IHQ)*	IDH 1 mutado (Sanger)	IDH 2 mutado (Sanger)	IDH no mutado	Pruebas no concluyentes
Glioblastoma	4	0	0	1	1
Oligoastrocitoma anaplásico	1	0	1	1	0
Astrocitoma anaplásico	2	0	0	0	0
Astrocitoma difuso	2	0	0	0	0
Oligodendroglioma anaplásico	1	0	0	0	0

*Inmunohistoquímica

De los 4 pacientes en quienes la inmunohistoquímica fue negativa para la tinción de *IDH1*, uno de ellos presentó mutación del gen *IDH2*, dos de ellos presentaron cadenas tanto de *IDH1* e *IDH2* no patológicas, y un cuarto caso presentó ADN degradado, por lo que no fue posible realizar el secuenciamiento de ninguno de los dos genes en estudio. Uno de los casos mostró alteración de IDH en inmunohistoquímica, con secuenciamiento normal para ambas cadenas (figura 2).

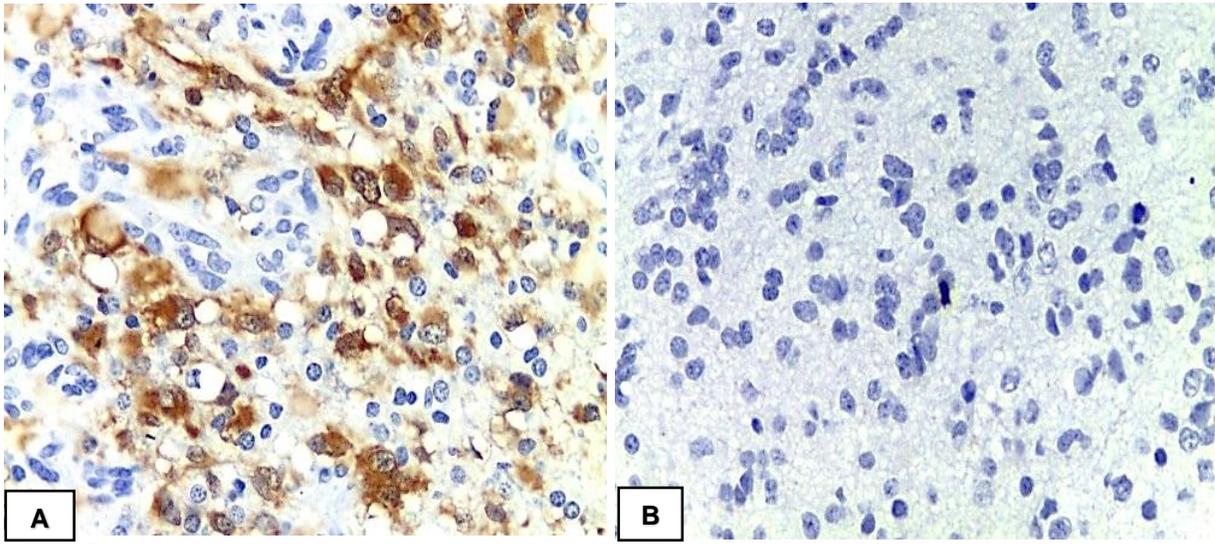


Figura 2. Inmunohistoquímica de isocitrato deshidrogenasa 1. (A) IDH1 positivo con tinción citoplasmática en más del 10% de las células tumorales y secuenciamientos normales de ambos genes. (B) IDH1 negativo en un caso de oligoastrocitoma anaplásico, el cual presentó mutación patológica de IDH2 en el análisis de secuenciamiento.

El promedio de supervivencia de todos los pacientes fue de 44 meses (DE:34), con un mínimo de 1 mes y un máximo de 102 meses.

En el grupo de pacientes con mutación *IDH1* o *IDH2*, el promedio de supervivencia fue de 48 meses, con un mínimo de 5 meses y un máximo de 102 meses. El 55% (6) de estos pacientes se encontraban con vida a diciembre de 2020.

Los 2 casos de pacientes con IDH no mutada (silvestre) el rango de supervivencia fue muy variable, un caso con diagnóstico histológico de oligoastrocitoma anaplásico y supervivencia de 1 mes y un segundo caso con diagnóstico de glioblastoma y supervivencia de 70 meses. En el tercer caso con inmunohistoquímica IDH1 negativa, no pudo ser confirmada la ausencia de mutación por secuenciación genética debido a la degradación del ADN, dicho paciente tuvo diagnóstico de glioblastoma y una supervivencia de 20 meses.

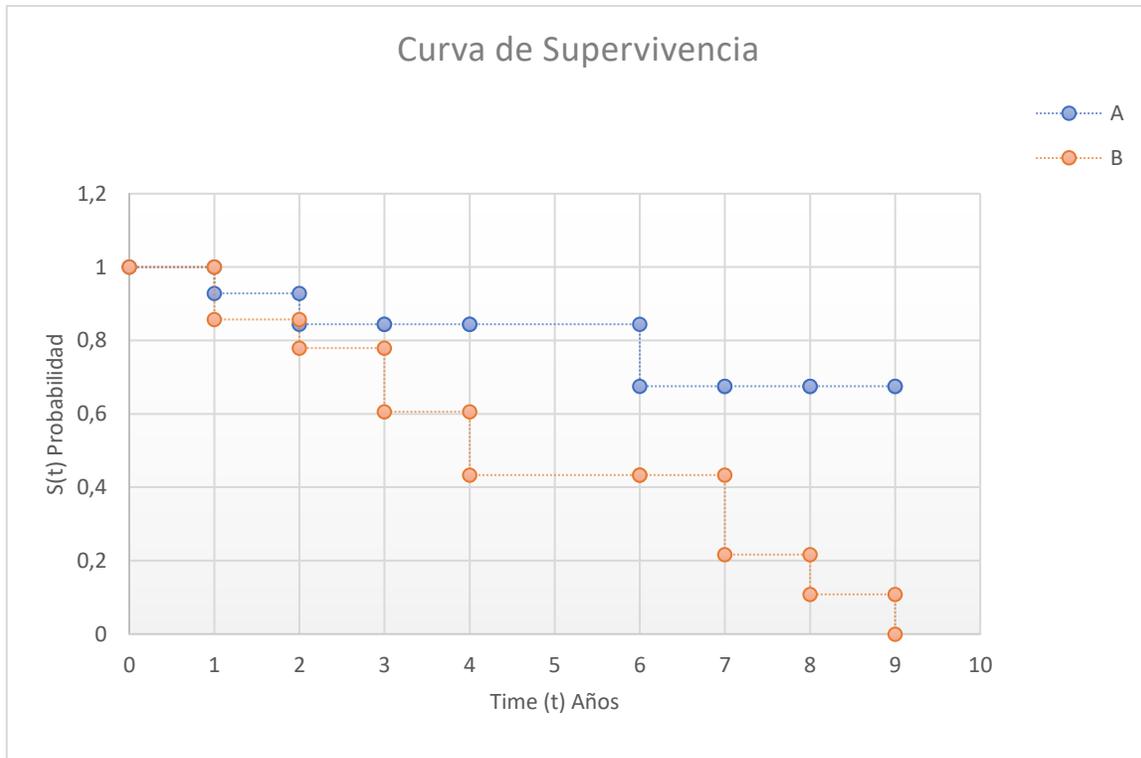


Figura 3. Curva de sobrevida general calculada en años desde el momento del diagnóstico a diciembre de 2020 en pacientes con mutación de *IDH1* o *IDH2* (azul) Vs *IDH* no mutada (naranja).

Discusión

En el año 2020 la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) de la OMS, estimó que el 55% de las neoplasias malignas primarias del SNC diagnosticadas en todo el mundo afectaron el sexo masculino (162,534 hombres de 296,851 individuos)(1). Se ha visto que los gliomas son más frecuentes en el género masculino, con una relación hombre-mujer que varía entre 1.1-1.6:1, de acuerdo a estudios tanto a nivel mundial como en Latinoamérica(7,18,19). En nuestro estudio, la mayoría de pacientes fueron de sexo masculino, con una relación hombre-mujer de 1.33:1; valor acorde a lo reportado por los autores citados.

El glioblastoma es la neoplasia de origen glial más frecuente según estadísticas del CBTRUS publicadas en el año 2020, el cual representa el 57.7% de todas las neoplasias gliales(1). En nuestro estudio, el diagnóstico histológico más frecuente fue el glioblastoma, el cual representó un 42.9% de todos los casos, acorde a lo reportado previamente.

La mutación de IDH se observó por primera vez en tumores de SNC en el año 2008 cuando Parsons et al, realizaron un mapeo genético de 22 glioblastomas, en el que encontraron esta mutación en un subconjunto de pacientes más jóvenes (menores de 55 años) y con mejor sobrevida(20). La mutación de IDH fue posteriormente

vista en otras neoplasias gliales, halladas en el 74% de los casos, principalmente en gliomas de bajo grado y glioblastomas secundarios, predominando la mutación de IDH1 con el 70,8%(7,16,21). En Colombia, Neita y col encontraron la presencia de IDH mutada en 42,3% de los pacientes evaluados. En nuestro estudio, 10 de 14 pacientes (71%) presentaron alteración patológica de IDH1, y dos de 14 pacientes (14%) presentaron IDH no mutada; hallazgos que se encuentran dentro de los rangos reportados por los autores citados. Una menor proporción de tumores involucra mutaciones en el gen *IDH2* (R172), con una frecuencia que varía entre el 2% y el 5% a nivel mundial(7)(22) y 7.5% a nivel regional(14), lo cual se aproxima a lo hallado en este estudio con un 7% de los casos.

La inmunohistoquímica utiliza anticuerpos específicos contra una proteína IDH alterada, resultado de la mutación R132H en la que es remplazada una arginina por histidina en el exón 4, codón 132 del gen *IDH1*, la cual es la mutación más frecuentemente encontrada, presente hasta en el 90% de los casos de neoplasias gliales con IDH mutante (15,16,22). En el presente estudio, el 91.6% de los casos con IDH mutada, presentaron expresión de la mutación R132H en inmunohistoquímica, lo cual se encuentra acorde con lo reportado en la literatura.

De los 14 pacientes en el estudio, en 3 casos fue imposible la amplificación y secuenciación del ADN por fragmentación y degradación de este. Este problema es frecuente en estudios moleculares en muestras procedentes de tejido embebido en parafina y viene ligado al método de fijación y procesamiento del tejido. El uso de formol para la fijación del tejido está asociado a pérdida de la integridad del ADN, al causar uniones ADN-ADN y ADN-proteínas, transición C-T de nucleótidos y fragmentación, metilación y alcalinización del ADN, siendo estos cambios más severos con tiempos de fijación más largos; y aunque secuencias cortas obtenidas de estas muestras pueden ser usadas para evaluar genes pequeños de forma dirigida, estudios en genes de mayor tamaño o a mayor escala son inviables en estos especímenes (23,24). Para mitigar este efecto, los estudios han mostrado un menor impacto cuando se utiliza un formol tamponado neutro a una concentración del 10%(23). Otros factores preanalíticos a tener en cuenta: el tiempo de almacenamiento y el método de desparafinación y extracción del ADN(24)

Agarwal et al, en un estudio de 50 pacientes con diferentes tipos y grados de gliomas, compararon inmunohistoquímica con secuenciación de ADN, encontrando discordancia en el 12% (6/50) de los casos. Estos 6 casos fueron positivos en IHQ, con presencia de cadenas normales en 3 casos, y mutación R132L en los 3 restantes(22). Nuestro estudio presentó un caso de reactividad para IDH1 por IHQ con secuenciación ADN negativa para ambos genes, lo que reflejó una discordancia del 7% (1/14). Esta disociación entre la IHQ y el secuenciamiento genético ha sido explicada en la literatura por cantidad insuficiente de ADN, el cual es resultado de muestras pequeñas (ej. Biopsias), necrosis extensa asociada al tumor, heterogeneidad intratumoral y presencia de tejido nervioso no tumoral; con la consecuente imposibilidad para demostrar la mutación con resultados falsos

negativos(16,22). La discordancia descrita también podría explicarse por un falso positivo en inmunohistoquímica; éstos, aunque infrecuentes, se han visto ligados a una falla en el pretratamiento del tejido, una concentración inadecuada de anticuerpo o al uso de peroxidasa derivada de rábano durante el procesamiento(25).

Yan et al, al secuenciar los genes *IDH1* e *IDH2* en una serie de 455 tumores de SNC, encontraron una mejoría significativa de la sobrevida para los pacientes con mutación de IDH, tanto en astrocitomas, oligodendrogliomas y glioblastomas, con incremento entre 16 a 45 meses dependiendo del grado histológico(5). Hallazgos similares fueron descritos por Olar et al, quienes concluyeron en otra serie de 558 casos de gliomas grados II y III que la presencia de la mutación de IDH en gliomas conllevaba una mejoría significativa de la sobrevida respecto a la variante no mutada (IDHwt), con un RR de 0.38 (95% CI de 0.28-0.52)(26). En nuestro estudio, los pacientes con IDH mutada presentaron un promedio de sobrevida de 48 meses. Sin embargo, para validar nuestros resultados y corroborar los datos informados en la literatura se recomienda futuros estudios con un mayor tamaño de la muestra.

La sobrevida en pacientes con IDHwt fue heterogénea. El paciente con diagnóstico de oligoastrocitoma anaplásico, tuvo una sobrevida de 1 mes luego del diagnóstico, acorde con el comportamiento biológico descrito en la literatura para estos casos(5,21); mientras que el paciente con diagnóstico de glioblastoma presentó una sobrevida general de 70 meses; valor sobre la media de sobrevida para este tipo de pacientes(5). Son muchos los factores que se encuentran reportados en la literatura que impactan directamente la sobrevida. Un puntaje elevado en la escala de Karnofsky, resección quirúrgica completa; mayor cantidad de linfocitos T infiltrantes de tumor, sexo femenino han sido reportados como factores de buen pronóstico(18,27,28). Estudios moleculares han mostrado otras alteraciones genéticas y epigenéticas con impacto pronóstico positivo en pacientes con glioblastoma como lo son hipermetilación de MGMT, mayor inestabilidad microsatelital; alteración del número de copias en más del 75% del genoma tumoral; y alteración del metabolismo de la esfingomielina(29–31). Por otro lado, mutaciones del gen promotor de la transcriptasa inversa de la telomerasa (pTERT), la ganancia del cromosoma 7 combinado con pérdida del cromosoma 10 y la amplificación del gen del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se asocian con resultados adversos en la sobrevida(32)

Las inferencias que se han podido realizar en este estudio han sido limitadas por varios factores, tales como la selección de pacientes solo dentro de un rango de edad estrecho; la dificultad para localizar los pacientes, lo que llevó a un tamaño pequeño de muestra; el uso de formol para la conservación y fijación del tejido, sumado al uso de parafina durante el procesamiento afecta negativamente la calidad y cantidad de ADN obtenido y es considerado el principal obstáculo para el éxito de pruebas moleculares en estos tejidos; y las dificultades logísticas

relacionadas con la pandemia por COVID-19, limitando los procesos técnicos. Para estudios futuros se recomienda estandarizar el proceso preanalítico incluyendo medidas para mitigar el daño del ADN, incluyendo la limitación del tiempo de fijación y el tamponamiento de la formalina.

Se puede concluir a partir de los resultados de este estudio que los gliomas difusos grado II, III, y IV predominan en el sexo masculino, y de ellos el más frecuente es el Glioblastoma. La mayoría de los pacientes (78.6%), en este rango etario, presentó IDH mutada con promedio de sobrevida de 48 meses; de estos, 9% con mutación de *IDH2*. Estos hallazgos sugieren que los gliomas son un grupo heterogéneo de tumores, con gran heterogeneidad genética, la cual impacta en su comportamiento. La detección de IDH1 e IDH2 en los tumores gliales puede contribuir a orientar el pronóstico de los pacientes; sin embargo, es necesario realizar estudios con una muestra de mayor tamaño, de rango etario más amplio para confirmar estos resultados.

Este estudio es el primero que se realiza en la región y unos de los pocos en el país, por lo que los resultados obtenidos son importantes para conocer la frecuencia de la expresión de la proteína mutada y las variantes en los genes IDH1 e IDH2 para una mejor comprensión de las características histopatológica y genéticas de los gliomas en nuestra población.

Conflicto de interés

Los autores declaramos que no existe ningún conflicto de intereses.

Agradecimientos:

Agradecemos al departamento de patología de la facultad de medicina de la Universidad de Antioquia y al grupo de genética médica-LIME de la Universidad de Antioquia por acompañarnos y apoyarnos con el financiamiento para la realización de esta investigación.

Referencias

1. Ostrom QT, Patil N, Cioffi G, Waite K, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. CBTRUS statistical report: Primary brain and other central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2013-2017. *Neuro Oncol.* 2020;22(Supplement_1):IV1–96.
2. International Agency for Research on Cancer. GLOBOCAN 2018: estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2018. Lyon, France: IARC. 2018.
3. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-branger D, et al. WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. International Agency for Research on Cancer; 2016.
4. Ghotme KA, Barreto GE, Echeverria V, Gonzalez J, Bustos RH, Sanchez M, et al. Gliomas: new perspectives in diagnosis, treatment and prognosis. *Curr Top Med Chem.* 2017;17(12):1438–47.
5. 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;360:765–73.
6. Ichimura K. Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol.* 2012;29(3):131–9.
7. Hartmann C, Meyer J, Balss J, Capper D, Mueller W, Christians A, et al. Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age : a study of 1010 diffuse gliomas. *Acta Neuropathol.* 2009;118(4):469–74.
8. Lee SC. Diffuse gliomas for nonneuropathologists: The new integrated molecular diagnostics. In: *Archives of Pathology and Laboratory Medicine.* 2018. p. 804–14.
9. Reiter-Brennan C, Semmler L, Klein A. The effects of 2-hydroxyglutarate on the tumorigenesis of gliomas. *Wspolczesna Onkol.* 2018;22(4):215–22.
10. Han CH, Batchelor TT. Isocitrate dehydrogenase mutation as a therapeutic target in gliomas. *Cancer.* 2017;123(23):4535–46.
11. Figueroa ME, Abdel-Wahab O, Lu C, Ward PS, Patel J, Shih A, et al. Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation. *Cancer Cell.* 2010;18(6):553–67.
12. Waitkus MS, Diplas BH, Yan H. Isocitrate dehydrogenase mutations in gliomas. *Neuro Oncol.* 2016;18(1):16–26.
13. Aoki K, Natsume A. Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas. *Brain Tumor Pathol [Internet].* 2019 Apr 1 [cited 2019 Apr 29]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30937703>

14. Neita K, Zubieta C, Ricaurte O, Arboleda G, Penagos J, Valero D, et al. Estudio de mutaciones en los genes IDH1 e IDH2 en una muestra de gliomas de población colombiana. *Biomédica*. 2018;38:93–9.
15. Gondim DD, Gener MA, Curless KL, Cohen-Gadol AA, Hattab EM, Cheng L. Determining IDH-Mutational Status in Gliomas Using IDH1-R132H Antibody and Polymerase Chain Reaction. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2019;27(10):722–5.
16. Li J, Zhang H, Wang L, Yang C, Lai H, Zhang W, et al. Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by high resolution melting analysis, immunohistochemistry and direct DNA sequencing. *Mol Med Rep*. 2015;12(3):4376–81.
17. Zou Y, Bai HX, Wang Z, Yang L. Comparison of immunohistochemistry and DNA sequencing for the detection of IDH1 mutations in gliomas. *Neuro Oncol*. 2015;17(3):477–8.
18. Yang W, Warrington NM, Taylor SJ, Whitmire P, Carrasco E, Singleton KW, et al. Sex differences in GBM revealed by analysis of patient imaging, transcriptome, and survival data. *Sci Transl Med*. 2019;12(473).
19. Ocampo Navia MI, Gómez Vega JC, Feo Lee OH. Epidemiología y caracterización general de los tumores cerebrales primarios en el adulto. *Univ Médica*. 2018;60(1).
20. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC-H, Leary RJ, Angenendt P, et al. An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science* (80-). 2008;321(5897):1807–12.
21. Kaminska B, Czapski B, Guzik R, Król SK, Gielniewski B. Consequences of IDH1/2 mutations in gliomas and an assessment of inhibitors targeting mutated IDH proteins. *Molecules*. 2019;24(5):1–17.
22. Agarwal S, Sharma MC, Jha P, Pathak P, Suri V, Sarkar C, et al. Comparative study of IDH1 mutations in gliomas by immunohistochemistry and DNA sequencing. *Neuro Oncol*. 2013;15(6):718–26.
23. Amemiya K, Hirotsu Y, Oyama T, Omata M. Relationship between formalin reagent and success rate of targeted sequencing analysis using formalin fixed paraffin embedded tissues. *Clin Chim Acta* [Internet]. 2019;488(September 2018):129–34. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cca.2018.11.002>
24. Bustamante JA, Astudillo M, Pazos AJ, Bravo LE. Evaluación de dos métodos de extracción de ADN a partir de biopsias fijadas en formalina y embebidas en parafina en condiciones no óptimas. *Acta Biol Colomb*. 2011;16(2):83–98.
25. Nuovo G. False-positive results in diagnostic immunohistochemistry are related to horseradish peroxidase conjugates in commercially available

assays. *Ann Diagn Pathol* [Internet]. 2016;25:54–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2016.09.010>

26. Olar A, Wani KM, Alfaro KD, Lindsey M, Hinke EH, Gilbert MR, et al. IDH mutation status and role of WHO grade and mitotic index in overall survival in grade II – III diffuse gliomas. *Acta Neuropathol*. 2015;129(4):585–96.
27. Scott JN, Rewcastle NB, Brasher PMA, Fulton D, MacKinnon JA, Hamilton M, et al. Which glioblastoma multiforme patient will become a long-term survivor? A population-based study. *Ann Neurol*. 1999;46(2):183–8.
28. Donson AM, Birks DK, Schittone SA, Kleinschmidt-DeMasters BK, Sun DY, Hemenway MF, et al. Increased Immune Gene Expression and Immune Cell Infiltration in High-Grade Astrocytoma Distinguish Long-Term from Short-Term Survivors. *J Immunol*. 2012;189(4):1920–7.
29. Gerber NK, Goenka A, Turcan S, Reyngold M, Makarov V, Kannan K, et al. Transcriptional diversity of long-term glioblastoma survivors. *Neuro Oncol*. 2014;16(9):1186–95.
30. Peng S, Dhruv H, Armstrong B, Salhia B, Legendre C, Kiefer J, et al. Integrated genomic analysis of survival outliers in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 2017;19(6):833–44.
31. Burgenske DM, Yang J, Decker PA, Kollmeyer TM, Kosel ML, Mladek AC, et al. Molecular profiling of long-term IDH-wildtype glioblastoma survivors. *Neuro Oncol*. 2019;21(11):1458–69.
32. Sonoda Y. Clinical impact of revisions to the WHO classification of diffuse gliomas and associated future problems. *Int J Clin Oncol* [Internet]. 2020;25(6):1004–9. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10147-020-01628-7>

Anexo. Procedimiento para la detección de la mutación IDH1 y 2 por inmunohistoquímica y secuenciación genética

Para la desparafinación del tejido se realizaron cortes de 4 y 10 micras del tejido embebido en parafina para la IHQ y la obtención de ADN respectivamente. Los cortes se realizaron utilizando una cuchilla nueva, previa aplicación de alcohol a todo el equipo. El tejido fue luego puesto en placas cargadas y dejado en estufa a 58°C toda la noche. Luego de esto se realizaron 3 baños de 5 minutos en xilol fresco; 4 baños en alcohol isopropílico de concentración descendente (100%, 100%, 95% y 70%) durante 3 minutos cada uno.

Para la tinción de IHQ, luego del proceso de desparafinación, las placas con el tejido fueron sometidas a un baño de 5 minutos con peróxido de hidrógeno al 6%, lavadas con agua corriente, y luego calentadas en baño maría a 95% en buffer recuperador de antígenos durante 30 minutos y luego se dejaron reposar por 20 minutos más en la solución recuperadora. Luego de esto a las placas se les realizó un lavado en TBST (Tris salina tamponada con Tween-20), se les aplicó el anticuerpo primario (H09 para IDH1-R132H), reactivo amplificador, lavando con TBST y permitiendo reacción en cámara de incubación húmeda a temperatura ambiente por tiempos de 60 y 10 minutos entre cada proceso respectivamente. Luego fueron aplicadas peroxidasa y 3,3 diaminobencidina, y se utilizó como contraste hematoxilina de Harris durante un total de 20 segundos. Se neutralizó el Ph con agua amoniacal al 1% y se deshidrató nuevamente el tejido con 4 baños con alcohol al 95%. Finalmente se realizó un aclaramiento de la placa con 3 baños de xilol y se montó la laminilla con medio de montaje insoluble en alcohol.

Para la extracción de ADN se realizó en las placas con los cortes de 10 micras obtenidas previamente, utilizando el kit comercial Quick DNA FFPE Kit de Zymo Research con las siguientes modificaciones: el tejido fue retirado de la placa y colocado en un vial de 1,5ml. Allí el tejido fue sumergido en Xilol y centrifugado a 10.000rpm por un minuto para remover residuos de parafina. Luego del centrifugado a la muestra se le realizó un lavado con etanol al 100%, un nuevo ciclo de centrifugado de un minuto y fue secada a 37°C durante 40 minutos. Luego se le adicionó al vial de 1,5 ml, 45 µl de H₂O, 45 µl de buffer de digestión y 10 µl de proteinasa K, con incubación a 55 °C de 12 a 16 horas, terminando a una temperatura de 94°C por 20 minutos. Posteriormente se adicionó 5 µl de RNAsa e dejando incubar durante 5 min a temperatura ambiente, se añadió 350 µl de buffer de lisis al vial de 1,5 ml y fue mezclado con vortex. Se adicionó 135 µl de isopropanol y centrifugó a 12.000 x g durante un minuto. El sobrenadante obtenido fue transferido a una de las columnas del kit centrifugado y lavado con soluciones GW1 y GW2, centrifugando entre cada proceso a 10.000 x g y 12.000 x g respectivamente. Finalmente, la muestra fue trasferida a un nuevo vial de 1,5ml en la que se fue añadida 50 µl de buffer de elución, incubada por 2 a 5 minutos y nuevamente centrifugada para obtención del ADN.

Para la amplificación de los marcadores IDH1 e IDH2 se utilizaron un par de cebadores específicos para cada marcador diseñados por la Unidad de Genética Médica de la universidad de Antioquia. La reacción de PCR se realizó en un volumen final de 10 μ l con las siguientes condiciones: 1X de buffer 10X, 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs, 0,8 μ M de cada primer y 0,08 μ l de Taq polimerasa. Se le fue adicionada a la mezcla descrita 1 μ l de ADN a 30 ng/ μ l. y luego la muestra fue colocada en un termociclador a 94°C por tres minutos, seguidos de 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 62°C 40 segundos y 72 °C 30 segundos, con una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. El ADN obtenido fue luego almacenado a -20 °C hasta el momento de realizar el secuenciamiento.

Finalmente, para el secuenciamiento tipo Sanger, se mezclaron 2 μ l de ExoSAP con 5 μ l de la reacción de PCR, y la mezcla fue incubada a 37 °C por 15 minutos, seguido de 80 °C durante 15 minutos. La mezcla fue preparada con 2 μ l Big Dye Reaction Mix, 1 μ l buffer 5X, 1 μ l de primer a 3,2 μ M y 1,5 μ l de producto de PCR purificado. La muestra descrita fue luego puesta en un termociclador a 95°C por un minuto, seguidos de 25 ciclos de 96°C por 10 segundos, 50°C 5 segundos y 60°C 4 minutos. Se le adicionó 45 μ l de solución SAM y 10 μ l de solución Big Dye Xterminator (BDX) para la purificación de la muestra. Finalmente, la muestra purificada fue corrida en analizador genético 3500 para obtener la secuencia. La edición de los cromatogramas obtenidos se realizó en el programa Chromas Pro y el análisis y comparación se hizo por alineamiento con las secuencias de referencia informadas en GenBank.