



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL
UNIDAD MEDICA DE ALTA ESPECIALIDAD
HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI

“SOBREVIDA DE LOS PACIENTES CON ASTROCITOMA DE ALTO GRADO QUE
EXPRESAN EL ANTIGENO KI67, ATENDIDOS EN EL HOSPITAL DE PEDIATRIA
CMN SXXI”

TESIS

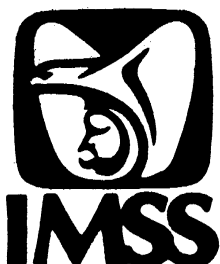
PARA OBTENER EL DIPLOMA DE ESPECIALIDAD EN
PEDIATRIA

PRESENTA

ANA PAULINA RIOSCOVIÁN SOTO

TUTOR:

ENRIQUE LÓPEZ AGUILAR



MÉXICO, D. F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

“SOBREVIDA DE LOS PACIENTES CON ASTROCITOMA DE ALTO GRADO QUE EXPRESAN EL ANTIGENO KI67, ATENDIDOS EN EL HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI”.

Hoja de firmas

Dr. Enrique López Aguilar

Médico oncólogo pediatra adscrito a UMAE HP CMN SXXI

Tutor de tesis

Dr. Héctor González Cabello

Médico pediatra adscrito a UMAE HP CMN SXXI

Presidente

Dra. Irina Juárez Muñoz

Médico pediatra adscrito a UMAE HP CMN SXXI

Jefe de la división de educación HP CMN SXXI

Secretario

Dr. Hugo Rivera Marquez

Médico oncólogo pediatra adscrito a UMAE HP CMN SXXI

Jefe de servicio de oncología UMAE HP CMN SXXI

Sinodal

Dr. Volkmar Wanzke Del Angel

Médico oncólogo pediatra adscrito a UMAE HP CMN SXXI

Sinodal

Dr Jesús Arias y Gomez

Médico pediatra adscrito a UMAE HP CMN SXXI

Jefe de servicio de consulta externa HP CMN SXXI

Sinodal

Agradecimientos

A Dios: por permitirme estar aqui y hacer lo que me gusta.

A mi mamá por enseñarme que puedo llegar tan lejos como quiera y sobre todo por el ejemplo de vida que eres, por que gracias a ti he logrado todo y por siempre estar ahi: Gracias Mami.

A Soni, Evelyn, Monica y Yadira: las quiero mucho por estar ahi en todo momento: de risa, de alegría, de tristeza, de desesperacion, de angustia, de estres, etc . Como dijimos siempre “...que seria de nosotros sin estos momentos..” Gracias amigas

Arturo: por todo el apoyo, comprensión, por estar ahi en el momento indicado, te quiero mucho gracias

Por supuesto al Dr López con cariño por su gran apoyo, por todas sus enseñanzas de la medicina y de la vida. Muchas gracias

A las personas que siempre estuvieron ahi para apoyarme y ayudarme a levantar las veces que me caí.

Índice

Resumen.....	1
Antecedentes.....	2
Justificación.....	9
Planteamiento del problema.....	10
Objetivos, Hipótesis.....	11
Material y métodos	12
Resultados.....	16
Discusión.....	28
Conclusiones.....	31
Bibliografía.....	32
Anexos.....	35

“SOBREVIDA DE LOS PACIENTES CON ASTROCITOMA DE ALTO GRADO QUE EXPRESAN EL ANTIGENO KI67 ATENDIDOS EN EL HOSPITAL DE PEDIATRIA CMN SXXI”

Introducción En el Hospital de Pediatría, la sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado es de menos del 56% a 18 meses. Los factores de crecimiento celular en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular; la sobreexpresión de estos, en los tumores malignos, se asocia a una mayor agresividad biológica, La expresión de Ki-67 se correlaciona con el pronóstico tanto de recidiva como de progresión en estudios realizados en adultos.

Planteamiento del problema ¿Cuál es la sobrevida que tienen los pacientes que acuden al HP CMN SXXI con diagnóstico de astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki-67 en comparación con quienes no lo expresan?

Objetivos Identificar el pronóstico de los pacientes con astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki67 como factor independiente de otros factores como localización, porcentaje de resección e histología.

Material y métodos Cohorte, comparativa, retrolectiva, Se revisaron expedientes de 1995 a 2005 de pacientes en quienes se diagnosticó astrocitoma de alto grado. Se realizó inmunohistoquímica para determinación de Ki-67. Se realizaron curvas de sobrevida global, con y sin expresión de Ki67 a 1, 5 y 10 años de acuerdo al método actuarial.

Resultados Se incluyeron 21 pacientes, 10 mujeres y 11 hombres. El promedio de edad fue de 10.5 años. Por localización 76.1% fueron supratentoriales, 19.2% de tallo y 4.7% cerebelo. Por histología 52.4% tuvieron diagnóstico de astrocitoma anaplásico y 47.6% de glioblastoma multiforme. Hubo 9 defunciones de las cuales 8 expresaron Ki67 positivo. La sobrevida global de los pacientes con astrocitoma de alto grado fue de 80.0%, 57.4% y 51.6% a 1, 5 y 10 años. La sobrevida de los pacientes que expresaron Ki67 positivo fue de 66%, 45% y 36% y negativo de 88%, 57% y 57% ($p < 0.05$) en el mismo periodo.

Discusión Los tumores que expresan el antígeno Ki67, son tumores de alta proliferación celular, agresivos e invasores observamos disminución en la sobrevida de 20% de quienes expresaron el antígeno Ki-67 en comparación con quienes no lo expresaron lo que pudiera sugerir dar un tratamiento más agresivo a los pacientes que expresen este antígeno.

Conclusiones Debe incorporarse la determinación de antígeno Ki67 en el estudio de todos los pacientes con astrocitoma de alto grado, para contar con más elementos para definir el pronóstico.

ANTECEDENTES

A) Tumores cerebrales.

Los tumores cerebrales representan el tipo de tumor sólido más frecuente en la edad pediátrica, son segundos en frecuencia general después de grupo formado por leucemias y linfomas (1). A nivel mundial la incidencia se encuentra entre 10 y 18 casos por millón por año, la presentación más frecuente es en hombres, raza blanca y menores de 5 años (2). En estudios realizados en población del DF, se ha encontrado una incidencia del orden 17 casos por millón por año. La frecuencia de presentación de los tumores cerebrales es del 12%(3). Existe una tasa clara de incremento en la incidencia de estos tumores, en México debieran diagnosticarse 560 casos de tumores del sistema nervioso central por año, la realidad es que la frecuencia de detección es mucho mas baja.

La clasificación de la organización mundial de la salud modificada para pediatría se basa en conceptos histogenéticos y morfológicos considerados por Bailey:

- 1.- Tumores gliales: astrocitomas, oligodendrogliomas, ependimomas, carcinoma de plexos coroides, gliomas mixto.
- 2.- Tumores neuronales: gangliomas, gangliocitomas, gangliogliomas anaplasicos.
- 3.- Tumores neuroectodérmicos primitivos: meduloblastomas, meduloepiteliomas.
- 4.- Tumores de célula de la pineal: pineocitoma, pinealoblastoma(4).

Los tumores cerebrales más frecuentes son los que se derivan de la glia hasta en un 60%, siendo los astrocitomas los mas frecuentes y posteriormente los meduloblastomas (5).

La expectativa de vida de acuerdo a la SEER (Surveillance, Epidemiology, End Result) a los 5 años puede ser de 56%. Teniendo el mejor pronóstico aquellos pacientes con astrocitomas de bajo grado, en fosa posterior y el peor pronóstico aquellos con glioma del tallo y astrocitomas de alto grado (6).

Aspectos clínicos y diagnósticos. No existen signos o síntomas patognomónicos, sino que estos de manera inicial van en relación al incremento de la presión intracraneal la cual puede deberse a una masa que crece y ocupa espacio o bien a la obstrucción en la circulación del líquido cefalorraquídeo. La cefalea es común, aunque la mayoría de los tumores se hacen más evidentes después de 4 a 6

semanas de iniciada esta. En los lactantes un incremento en el perímetro cefálico o una separación de las suturas craneales sugiere una lesión ocupante de espacio (7). Es importante señalar que los tumores que más rápidamente producen edema de papila son aquellos localizados en el cerebelo, dado ya que de manera más rápida obstruyen la circulación del líquido cefalorraquídeo del cuarto ventrículo y el desarrollo de hidrocefalia obstructiva. El vómito puede presentarse por incremento generalizado de la presión intracraneana o bien por irritación directa del núcleo vagal o del centro del vómito localizado el piso del cuarto ventrículo, puede ser cíclico y puede ocurrir diario por las mañanas (8). Existen síntomas inespecíficos como cambios en el afecto, así como los niveles de energía y motivación. El síndrome central se presenta cuando se involucra ambos hemisferios o el diencefalo, es característica de estos pacientes la presencia de respuestas oculomotoras, oculocefálicas y oculo vestibulares. Cuando un niño presenta signos y síntomas inespecíficos ya comentados, además de datos de pérdida de balance en la función del tronco cerebral como alteraciones en la coordinación de las extremidades superiores y afección a pares craneales, esto sugerirá fuertemente tumoración infratentorial. La afección a pares craneales sobretodo VI VII IX sugieren la posibilidad de una tumoración del tallo cerebral es alta (9).

El estudio de gabinete de elección para establecer el diagnóstico es la imagen de resonancia magnética (IRM) de cráneo que es más sensible y específica que la tomografía axial computarizada (TAC). La IRM provee una definición anatómica exquisita diferenciando perfectamente el tejido sano del enfermo (10).

El diagnóstico histopatológico se obtiene por estudio de microscopia de luz e inmunohistoquímica del espécimen obtenido por biopsia o por resección total o subtotal. En las tumoraciones localizadas en tallo cerebral donde el acceso quirúrgico es difícil, la biopsia se obtiene por esterotaxia (11).

Tratamiento: Es multidisciplinario: neurocirugía, radioterapia y quimioterapia sin dejar el beneficio que otorga la rehabilitación, participación del pediatría y endocrinólogo sobretodo en casos que se desarrolla diabetes insípida o bien alteraciones neuroendocrinas secundarias al procedimiento quirúrgico o radioterapia (12). A) neurocirugía.- tiene como objetivos: establecer el diagnóstico

histopatológico, reducir el efecto de masa de la tumoración que ocasiona obstrucción, mejorar la circulación del líquido cefalorraquídeo y potencialmente buscar la cura del paciente mediante resección completa o cuando esto no sea posible logrando cito reducción quirúrgica (13). B) Radioterapia el éxito estriba en lograr una muerte selectiva de las células tumorales, de hecho el daño celular se puede observar durante los siguientes intentos de duplicación de la célula tumoral, impidiendo la supervivencia de la clona celular, eliminado el potencial de esta a seguir creciendo y de enviar metástasis (14). C) Quimioterapia.- Kovnar es el primero en utilizar la neoadyuvancia en los tumores cerebrales, sobre la base que la barrera hematoencefalica es disfuncional en el área adyacente al tumor y que esta disfunción permitiría el paso de la QT al tejido tumoral demostrando una reducción dramática en el volumen tumoral posquirúrgico (13).

B) Astrocitomas de alto grado.

Los astrocitomas son los más frecuentes en aproximadamente 50%. (1,2) De 1200 niños con diagnóstico de tumor cerebral, reportados por SEER de 1969 a 1979, el 32% fueron astrocitomas supratentoriales, 80% de los cuales fueron de alto grado de malignidad. Existen varias clasificaciones desde el punto de vista histopatológico. La de Kernohan los separa en 4 grados siendo III (astrocitomas anaplásicos) y IV (glioblastoma multiforme) los de alto grado (5). Mas de los dos terceras partes de estos tumores tiene su origen en los hemisferios cerebrales, el resto puede originarse en las estructuras diencefálicas ó en cerebelo (14). Histológicamente los astrocitomas anaplásicos se caracterizan por un incremento en la celularidad con pleomorfismo y mitosis, la relación núcleo/citoplasma esta incrementada.

Otro aspecto importante es el conocido como lag-time o tiempo que transcurre desde la aparición de los primeros síntomas hasta que se establece el diagnóstico y este puede durar en promedio 3 a 6 meses. Los tumores mas agresivos dan sintomatología de mas corta duración y mas agresiva. Tratamiento.- el manejo quirúrgico es la piedra angular del tratamiento seguido de manejo de RT, con 54 a

56 Gy, resaltando el pobre papel con quimioterapia hasta antes del inicio del manejo con el esquema de Ifosfamida-Carboplatino-Etopósido. En pediatría el manejo tradicional con RT posterior a la cirugía no ha mejorado de manera significativa la sobrevida, debido a que las dosis intratumorales son frecuentemente subletales para las células neoplásicas debido al gran tamaño de la tumoración que persiste en la mayoría de los casos después de cirugía. En el hospital de Pediatría del CMN siglo XXI se inicio ensayo clínico utilizando QT neoadyuvante con 3 drogas: Ifosfamida, carboplatino y etoposido (ICE) con 4 cursos seguido de RT 56 Gy en 25 pacientes encontrando una respuesta objetiva (mayor 50%) en 11 pacientes la cual se incremento a 14 posterior al manejo con RT, esta respuesta se atribuye por haberse logrado una cito reducción importante del tumor y potencialización subsecuente con manejo de RT, sin embargo esta respuesta no se observo en aquellos localizados en tallo cerebral, debido a que no se cuenta con posibilidad de un acceso quirúrgico a este nivel y se pierde el arma primordial de tratamiento y por otro la pobre penetración de la droga dentro del tumor dado el pobre flujo sanguíneo a nivel de tallo cerebral (15). En dicho estudio se observo un efecto selectivo en astrocitomas de alto grado del tallo cerebral obteniendo una sobrevida de 18 meses en el 50% de los pacientes con pocos efectos secundarios. Se puede concluir que la piedra angular de tratamiento de los astrocitomas de alto grado sigue siendo la cirugía, pero sin duda el advenimiento de la quimioterapia neoadyuvante ha marcado un nuevo giro en el manejo de estos pacientes.

C) Factores pronósticos en astrocitomas

El conocimiento de los factores pronósticos permite adecuar el tratamiento al pronóstico de la enfermedad.

La supervivencia media de los pacientes con astrocitomas, según la clasificación de la OMS, es de 5 a 7 años para los de grado I, de 2.5 a 3 años para el grado II, de 1,5 a 2 años para el grado III, y de 1 año menos para el grado IV. (5)

En el Hospital de Pediatría CMN SXXI, se realizó una evaluación de los factores pronósticos de pacientes con astrocitoma en un periodo de 10 años, registrándose: edad, sexo, sitio de la tumoración, grado de malignidad así como fecha de la recaída o defunción. De un total de 39 pacientes, se encontraron 43% supratentoriales, 13% infratentoriales y 43% de tallo cerebral, con diferencias significativas en la sobrevida al comparar los dos primeros en conjunto contra el último. Se realizó cirugía y estudio histopatológico en 26 de ellos reportando 17 con alto grado de malignidad y nueve de bajo grado, con menor sobrevida para estos primeros en forma significativa. El 41% de las defunciones ocurrieron el primer año de vida y el 94% en los primeros 24 meses. Los pacientes con astrocitoma en cerebelo y aquellos con bajo grado de malignidad tienen mejor pronóstico que los pacientes con tumoración en tallo cerebral y/o alto grado de malignidad (16)

Los indicadores histológicos de anaplasia y por lo tanto de malignidad son: la atipia nuclear, el número de mitosis, la proliferación vascular y la presencia de necrosis.(3)

En los últimos años se han identificado diversos factores de crecimiento celulares. Son proteínas que en condiciones fisiológicas regulan el crecimiento y la diferenciación celular. La actividad de los factores de crecimiento puede estar aumentada básicamente a través de dos mecanismos: por un incremento del número de copias del gen que los codifica (amplificación génica), o bien por un aumento en la producción de proteína por el gen (sobre expresión) (17). La sobre expresión de los factores de crecimiento en los tumores malignos se asocia por lo general a una mayor agresividad biológica, y su identificación ha permitido el diseño de una nueva estrategia terapéutica (18).

El método histológico más empleado para medir la velocidad de crecimiento de un tumor es el índice mitótico,(19,20) sin embargo este es un evento breve dentro de un ciclo celular típico de 24 a 36hrs por lo que un control mitótico bajo, puede no reflejar la actividad de reproducción celular y además para determinarlo se

necesita una muestra grande de tejido tumoral, sin embargo existen otros métodos histológicos que ofrecen una medida completa de las fases del ciclo celular entre ellos la citometría de flujo y los antígenos de proliferación de los cuales el Ki67(21).

D) El antígeno Ki67

El ciclo de división celular consta de cuatro fases sucesivas: una fase de síntesis de DNA o fase S; otra de división celular, mitosis o fase M; y dos fases de transición, una fase G1 entre las fases M y S, y otra G2 entre S y M 0. La progresión en el ciclo celular responde a señales tanto de regulación positiva como de regulación negativa. Las moléculas que inducen la progresión en el ciclo pueden considerarse oncogenes, puesto que su sobre expresión puede llevar a la célula a una proliferación incontrolada y, por tanto, a la formación de un tumor.

El antígeno Ki67 es una proteína nuclear no-histona que se expresa en todas las fases del ciclo celular (G1, S, G2 y M) excepto G0. Es una proteína nuclear de gran tamaño, con numerosos dominios repetidos, que interviene en el mantenimiento del ciclo celular. Es considerado como un marcador de la proliferación de células neoplásicas (22).

Las alteraciones en la proliferación celular, que surgen de la pérdida de control del ciclo celular, pueden ser estudiadas y cuantificadas determinando la expresión nuclear de proteína Ki-67 mediante técnicas de inmunohistoquímica (23).

La expresión de Ki-67 se correlaciona bien con el grado y estadio tumoral. Cada vez existen más estudios mostrando que la expresión de Ki-67 es un marcador pronóstico independiente de recidiva como de progresión (24). La determinación de Ki67 permite diferenciar grupos de mayor agresividad, que justificaría en ellos una terapia más agresiva que la que le correspondería por sus características de estadio y grado (25).

Coons y cols. observaron que presentaban un mejor pronóstico los pacientes con oligodendrogliomas que tenían menos del 5% de células con expresión positiva para el marcador de proliferación Ki-67, respecto a aquellos que tenían más del 5% de células tumorales positivas ($p < 0,0001$). De igual modo, Heergaard y cols.

Observaron que los pacientes con expresión de Ki-67 en más del 3% de sus células tumorales y de PCNA (protein cellular nuclear antigen) mayor del 4%, tenían una supervivencia media de 23,5 y 26,5 meses respectivamente, mientras que la supervivencia media general era de 4,4 años.(25,26) La supervivencia actuarial en estos grupos a 5 y 10 años era del 38% y 19% respectivamente. Kros y cols. en 108 oligodendrogliomas puros encontraron que el índice de Ki-67 junto con la edad, localización y grado eran los únicos factores con valor pronóstico independiente. Además, estos autores observaron que si bien los gemistocitos, los microgemistocitos y los oligodendrocitos gliofibrilares expresaban todos PGFA, sólo estos últimos expresaban Ki67(27). Por otra parte Krouwer y cols. Observaron que el índice de PCNA se correlacionaba bien con el grado histológico pero por sí solo no constituía un factor pronóstico, mientras que parecían tener un significado pronóstico la existencia de hipertensión intracraneal y de hiperplasia endotelial en el estudio histológico(28).

JUSTIFICACIÓN:

La sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado es actualmente de menos del 50% a 18 meses en nuestro Hospital. Se requiere identificar factores de riesgo que influyan en la sobrevida de estos pacientes, para de esta manera poder estratificarlos en grupos y poder brindarles un tratamiento mas adecuado de acuerdo al riesgo que tengan para morir, de esta manera se crearan terapias mas agresivas para pacientes que tengan un peor pronóstico con respecto a los que no tengan estos factores de riesgo.

Planteamiento del problema

La sobrevida global de los pacientes con astrocitoma de alto grado en el Hospital de Pediatría del CMN Siglo XXI es de apenas el 56%, de ahí que se requiere identificar factores de riesgo de estos pacientes para planear una mejor estrategia terapéutica y beneficiar de esta manera a aquel subgrupo de pacientes con un mayor riesgo.

¿Cuál es la sobrevida que tienen los pacientes que acuden al HP CMN SXXI con diagnóstico de astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki-67 en comparación con quienes no lo expresan?

Objetivos Generales

Identificar el pronóstico de los pacientes con astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno KI67 como factor independiente de otros factores como localización, porcentaje de resección e histología.

Objetivos específicos

1. Determinar la sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki67 a 1,5 y 10 años del diagnóstico.
2. Determinar la sobrevida de los pacientes de alto grado que no expresan el antígeno Ki67 a 1,5 y 10 años del diagnóstico.

Hipótesis

Los pacientes que acuden al HP CMN SXXI con diagnóstico de astrocitoma de alto grado que expresan el antígeno Ki67 tienen una sobrevida del 30% menor en comparación con quienes no lo expresan.

MATERIAL Y METODO

Lugar

Hospital De Pediatría Centro Medico Nacional Siglo XXI

Tipo de estudio

Casos y controles anidados en una cohorte, comparativo, retrolectivo

Criterios de inclusión:

1. Pacientes menores de 15 años con diagnóstico de astrocitoma de alto grado establecido en el servicio de Patología del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI.
2. Pacientes que contaron con los datos necesarios en el expediente para la hoja de recolección.
3. Pacientes en quienes se realizó biopsia-resección y se contó con bloque de parafina en el servicio de patología del HP CMN Siglo XXI.
4. Pacientes que recibido tratamiento en el servicio de Oncología del hospital de Pediatría de acuerdo a protocolo.

Criterios de exclusión

1. Pacientes que abandonaron tratamiento por envió a otro hospital,
2. Pacientes que no completaron tratamiento

Criterios de eliminación

1. Pacientes en los que el material tumoral obtenido del bloque de parafina no fue suficiente para establecer la presencia ó no de la expresión del Ki67.

VARIABLES

Variable	Definición operacional	TIPO DE VARIABLE	Escala de medición	Unidades de medición
Tiempo de supervivencia global	Numero de meses que viven los pacientes luego del diagnóstico de astrocitoma de alto grado realizado por el servicio de patología de HPCMNXI	Dependiente	Cuantitativa continua	Meses y años
Expresión del antígeno Ki67	Resultado de la determinación Ki67 en la prueba de inmunohistoquímica realizado por el servicio de patología del HPCMNSXXI.	Independiente	Cualitativa nominal	Presente, ausente
Localización de la tumoración	Sitio donde se encuentra la tumoración.	Independiente	Cualitativa nominal	Supratentorial Tallo Cerebelo
Porcentaje de resección.	Porcentaje de la tumoración resecada quirúrgicamente descrita en la hoja postquirúrgica.	Independiente	Cualitativa ordinal	Biopsia Reseccion parcial Reseccion total
Grado de malignidad	Reportado por el servicio de patología, en relación al porcentaje de anaplasia encontrado en el espécimen de la tumoración por estudio histopatológico.	Independiente	Cualitativa ordinal	I , II, III, IV
Edad	Edad del paciente que se encuentra registrada en el expediente al momento del diagnóstico.	Universal	Cuantitativa continua	Años y meses
Sexo	Genero que se encuentra registrado en el expediente.	Universal	Cualitativa nominal	Masculino Femenino

Descripción general del estudio

Se revisaron todos los expedientes de 1995 a 2005 del Hospital de Pediatría de los pacientes en quien en este hospital se realizó diagnóstico de astrocitoma de alto grado. Se registraron los datos necesarios en la hoja de recolección. Además se buscaron los bloques de parafina a los cuales se realizó inmunohistoquímica para determinación de expresión del antígeno Ki-67.

Inmunomarcaje Ki67 (29, 30)

Para la identificación de las células reactivas del Ki67 se empleó la técnica inmunohistoquímica estreptavidina - biotina usando como anticuerpo primario al anticuerpo *monoclonal mouse antihuman Ki67 antigen clona ki55* a dilución 1:20, las muestras se desparafinaron e hidrataron, se realizó recuperación de sitios antigénicos y se colocaron en estufa a 125° C por 5 min y se realizó inmunohistoquímica (técnica en anexo).

Para determinar el patrón de expresión de Ki-67 se realizó un conteo celular abarcando aproximadamente 1000 células (15 campos microscópicos). Se consideró una reacción positiva cuando la célula mostró un núcleo intensamente teñido de marrón y para la distribución de estas se utilizó la escala semicuantitativa descrita por Mirhashemi et al 2003:

Mínima: menos del 10% de células positivas.

Moderada: entre el 10% y el 50% de células positivas.

Alta: más del 50% de células positivas.

Tomando como positivos la expresión alta

Análisis estadístico:

Descriptivo

Para las variables cuantitativas continuas se utilizaron promedios como medidas de tendencia central y valor mínimo y máximo como medidas de dispersión.

Para las variables cuantitativas discretas la mediana fue la medida de tendencia central y valor mínimo y máximo como medidas de dispersión.

Para las variables cualitativas se utilizaron moda y frecuencias simples.

Inferencial

Se realizaron curvas de sobrevida global a 1,5 y 10 años de acuerdo al método actuarial para determinar porcentaje de sobrevida en cada grupo (astrocitomas de alto grado que expresan y los que no expresan Ki67) y posteriormente se determinó mediante Logrank Test si existió significancia estadística.

FACTIBILIDAD.

Recursos humanos:

Tesista médico residente de pediatría Médica,

Tutor médico adscrito.

Médico patólogo e histotecnólogo

Recursos materiales

Hojas blancas, lápices, computadora, impresora, reactivo para realización de inmunohistoquímica.

Recursos financieros

No se requirió financiamiento, los gastos que se generados fueron cubiertos por los investigadores.

El proyecto se acepto por el comité de investigación de HP CMNSXXi con el número R-2008-3603-26

Aspectos éticos

Este estudio de acuerdo a la Ley General de Salud fue un estudio sin riesgo por lo que no requirió de hoja de consentimiento informado. Por otra parte cumplió con los principios éticos de investigación de justicia, beneficencia y autonomía.

Resultados

El presente estudio se realizó en la Unidad Medica de Alta Especialidad Hospital de Pediatría Centro Medico Nacional Siglo XXI.

Se revisaron 35 expedientes de los cuales sólo se pudieron incluir 21 pacientes que contaban también con los bloques de parafina.

De éstos 21 pacientes , 10 fueron mujeres y 11 hombres con una relación hombre mujer de 1 a 1.1. El promedio de edad fue de 10.5 años con un valor mínimo de 3 y máximo de 17 años. (Tabla 1)

La sobrevida global para todos los pacientes con astrocitoma de alto grado fue de 81.8% a un año, 55.7% a 5 años y 41.7% a 10 años del diagnostico. (Tabla 2 imagen 1).

Por histología 11 pacientes (52.4%) tuvieron diagnostico de astrocitoma anaplásico y 10 (47.6%) diagnostico de glioblastoma multiforme. Lo sobrevida para los pacientes con astrocitoma anaplasico fue de 81.8%, 55.7% y 41.7% a 1, 5 y 10 años; mientras que para los pacientes con diagnóstico de glioblastoma multiforme fue de 70.2%, 50% y 50% en el mismo periodo. Sin existir diferencia estadística. (Tabla 3 y 3.1 imagen 2)

Por localización 76.1% fueron tumores supratentoriales (n16), 19.2% fueron de tallo (n4) y 4.7% fueron infratentoriales (n1).

La sobrevida global para la localización supratentorial fue de 87.5%, 52.9% y 45.3 % a 1, 5 y 10 años; mientras que para la localización en tallo fue de 50% y 37% a 12 y 30 meses. Al comparar ambas curvas de sobrevida encontramos, al realizar la prueba de Log Rank, que existió diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$). (Tabla 4 y 4.1 imagen 3)

La sobrevida para aquellos pacientes que expresaron ki67 positivo fue de 66.5%, 45% y 36% a 1,5 y 10 años mientras que los pacientes que no lo expresaron fue de 88.9%, 57.0% y 57.0%. Existiendo diferencia estadísticamente significativa con $p < 0.05$.

De los pacientes incluidos hubo 9 defunciones de las cuales 8 (88.8%) expresaron Ki67 positivo y 1 no lo expresó (OR 4.5). (Tabla 5 y 5.1 imagen 4).

Visto desde otra perspectiva, 12 pacientes que presentaron Ki positivo, 8 de ellos fueron defunciones, mientras que de los 9 pacientes que fueron Ki negativos sólo se presentó una defunción

Respecto del porcentaje de resección se realizaron 17 resecciones parciales (80.95%) y 4 biopsias (19%) estos últimos por ser tumoraciones de tallo cerebral.

Tabla 1. Características generales de la población

Característica	N (21)	
Edad	3ª- 17ª	10.5
Genero	21	
Masculino	11	52.3%
Femenino	10	47.6%
Histología	21	
Astrocitoma anaplásico	11	52.3%
Glioblastoma	10	47.6%
Localización		
Supratentorial	16	76.1%
Tallo	4	19.04%
Cerebelo	1	4.76%
Ki 67		
Positivo	12	57.1%
Negativo	9	42.9%
Defunciones		9 42.9%
Ki67 positivo	8	38%
Ki67 negativo	1	4.76%

Tabla 2. Tabla de sobrevida global para los pacientes con astrocitoma de alto grado

Intervalo	N	D	W	Q	p1	S1
0-6	21	1	0	0.047	0.952	0.952
6-12	20	3	0	0.15	0.850	0.809
13 a 18	17	0	1	0.029	0.970	0.785
19 -24	16	1	1	0.093	0.906	0.711
25-30	14	0	2	0.071	0.928	0.660
31-36	12	0	1	0.041	0.958	0.632
37-42	11	0	0	0	1	0.632
45-48	11	0	0	0	1	0.632
49-54	11	1	0	0.090	0.909	0.574
55-60	10	0	0	0	1	0.574
60-66	10	0	0	0	1	0.574
67-72	10	0	0	0	1	0.574
75-78	10	0	0	0	1	0.574
79-84	10	0	0	0	1	0.574
85-90	10	0	0	0	1	0.574
91-96	10	1	0	0.1	0.9	0.516
97-102	9	0	0	0	1	0.516
103-108	9	0	0	0	1	0.516
109-114	9	0	0	0	1	0.516
115-120	9	0	0	0	1	0.516

N : Numero D: Defunciones W: perdida de seguimiento S sobrevida

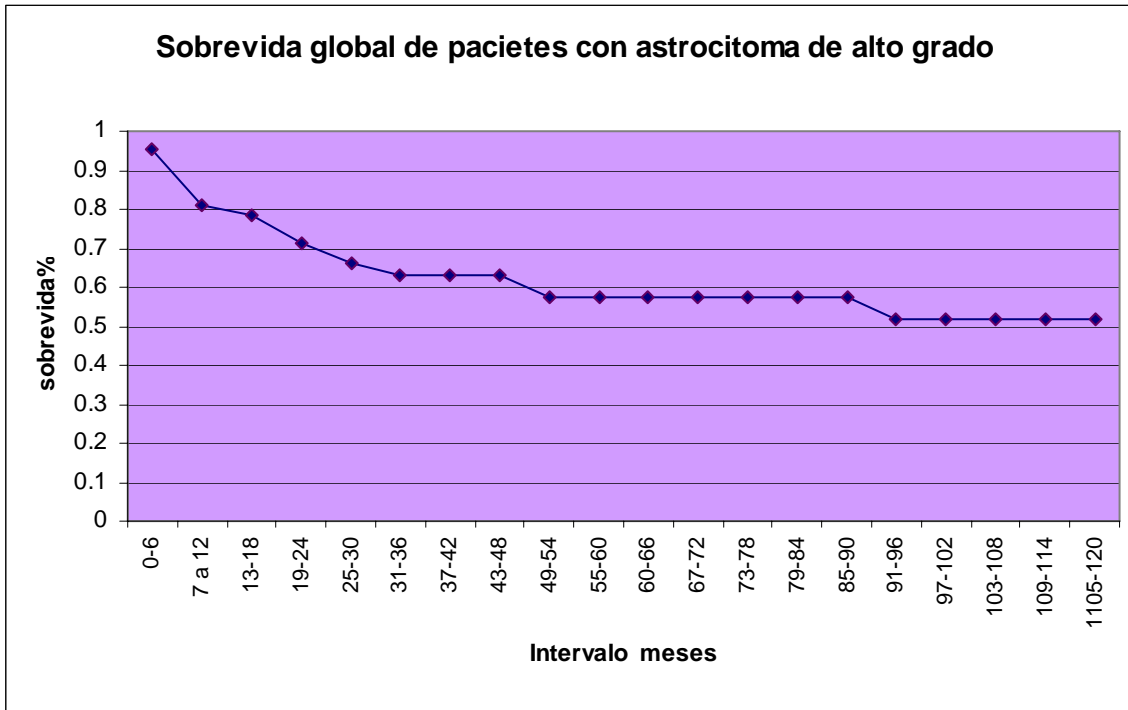


Imagen 1. Sobrevida global de los pacientes con diagnostico de astrocitoma de alto grado (n 21)

Tabla 3.1 Tabla de sobrevivencia para los pacientes con astrocitoma de alto grado de acuerdo a histología

Glioblastoma multiforme (n=10)

Intervalo	N	D	W	Q	P1	S1
0-6	10	1	0	0.1	0.9	0.9
7 a 12	9	2	0	0.222	0.78	0.702
13-18	7	0	0	0	1	0.702
19-24	7	1	0	0.14	0.857	0.601
25-30	6	0	0	0	1	0.601
31-36	6	0	0	0	1	0.601
37-42	6	0	0	0	1	0.601
43-48	6	0	0	0	1	0.601
49-54	6	1	0	0.166	0.833	0.50
55-60	5	0	0	0	1	0.50
60-66	5	0	0	0	1	0.50
67-72	5	0	0	0	1	0.50
73-78	5	0	0	0	1	0.50
79-84	5	0	0	0	1	0.50
85-90	5	0	0	0	1	0.50
91-96	5	0	0	0	1	0.50
97-102	5	0	0	0	1	0.50
103-108	5	0	0	0	1	0.50
109-114	5	0	0	0	1	0.50
1105-120	5	0	0	0	1	0.50

Tabla 3.2 Tabla de sobrevivencia para los pacientes con astrocitoma de alto grado de acuerdo a histología

Astrocitoma anaplasico (n=11)

Intervalo	N	D	W	Q	p1	S1
0-6	11	0	0	0	1	1
7 a 12	11	2	1	0.18	0.818	0.818
13-18	9	0	1	0.055	0.944	0.723
19-24	8	0	1	0.625	0.937	0.619
25-30	7	1	2	0.142	0.857	0.557
31-36	5	0	1	0.1	0.9	0.557
37-42	4	0	0	0	1	0.557
43-48	4	0	0	0	1	0.557
49-54	4	0	0	0	1	0.557
55-60	4	0	1	0	1	0.557
60-66	4	0	0	0	1	0.557
67-72	4	0	0	0	1	0.557
73-78	4	0	0	0	1	0.557
79-84	4	0	0	0	1	0.557
85-90	4	0	0	0	1	0.557
91-96	4	1	0	0.25	0.75	0.417
97-102	3	0	0	0	1	0.417
103-108	3	0	0	0	1	0.417
109-114	3	0	0	0	1	0.417
1105-120	3	0	0	0	1	0.417

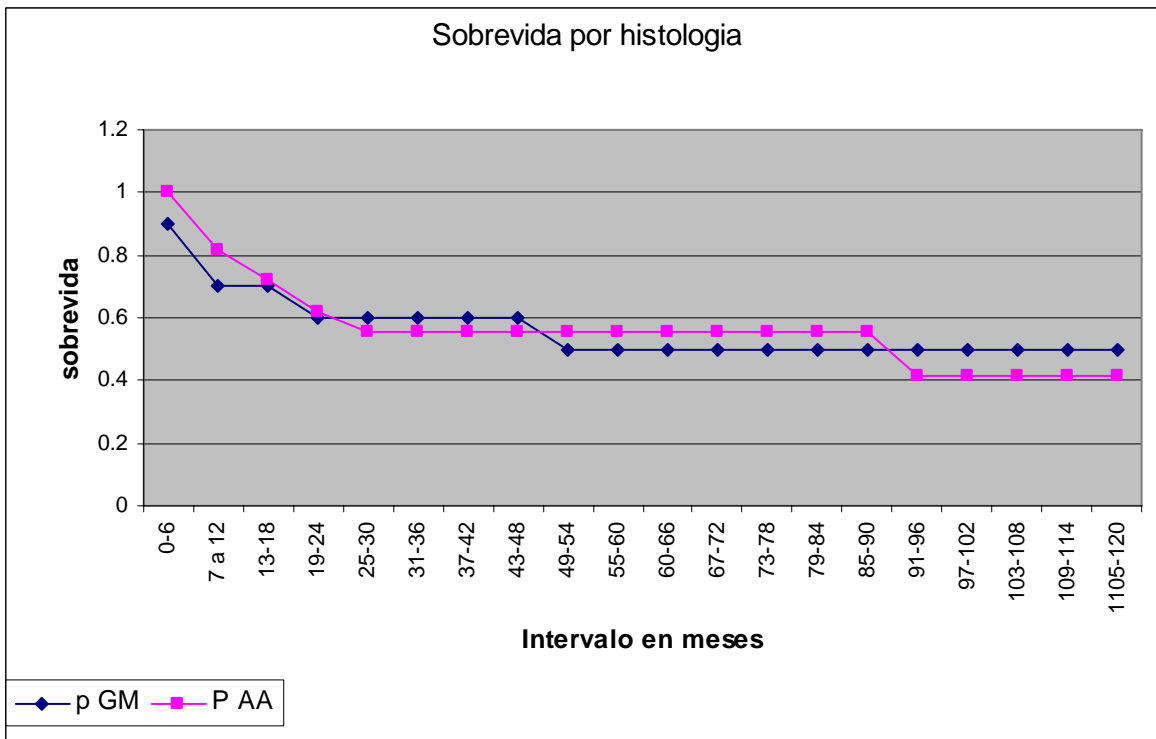


Imagen 2 .- Tabla de sobrevida por histología AA (p: 41.7%) GM (p: 50%)
P= 0.8

Tabla 4.1 Tabla de sobrevida para los pacientes con astrocitoma de alto grado de acuerdo a localización.

Supratentorial (n=16)

Intervalo	N	D	W	Q	p1	S1
0-6	16	1	0	0.625	0.937	0.937
7 a 12	15	1	0	0.066	0.934	0.875
13-18	14	0	1	0.035	0.964	0.843
19-24	13	0	1	0.038	0.962	0.810
25-30	12	1	1	0.125	0.875	0.708
31-36	10	1	0	0.18	0.9	0.637
37-42	9	0	0	0	1	0.637
43-48	9	0	0	0	1	0.637
49-54	9	1	0	0.111	0.888	0.565
55-60	8	0	1	0.062	0.937	0.529
60-66	7	0	0	0	1	0.529
67-72	7	0	0	0	1	0.529
73-78	7	0	0	0	1	0.529
79-84	7	0	0	0	1	0.529
85-90	7	0	0	0	1	0.529
91-96	7	1	0	0.142	0.857	0.453
97-102	6	0	0	0	1	0.453
103-108	6	0	0	0	1	0.453
109-114	6	0	0	0	1	0.453
1105-120	6	0	0	0	1	0.453

Tabla 4.2 Tabla de sobrevida para los pacientes con astrocitoma de alto grado de acuerdo a localización.

Tallo cerebral (n=4)

Intervalo	N	D	W	Q	p1	S1
0-6	4	0	0	0	1	100
7 a 12	4	2	0	0.5	0.5	50
13-18	2	0	0	0	1	50
19-24	2	0	0	0	1	50
25-30	2	0	1	0.25	0.75	37.5
31-36	1	0	1	0.5	0.5	18.7

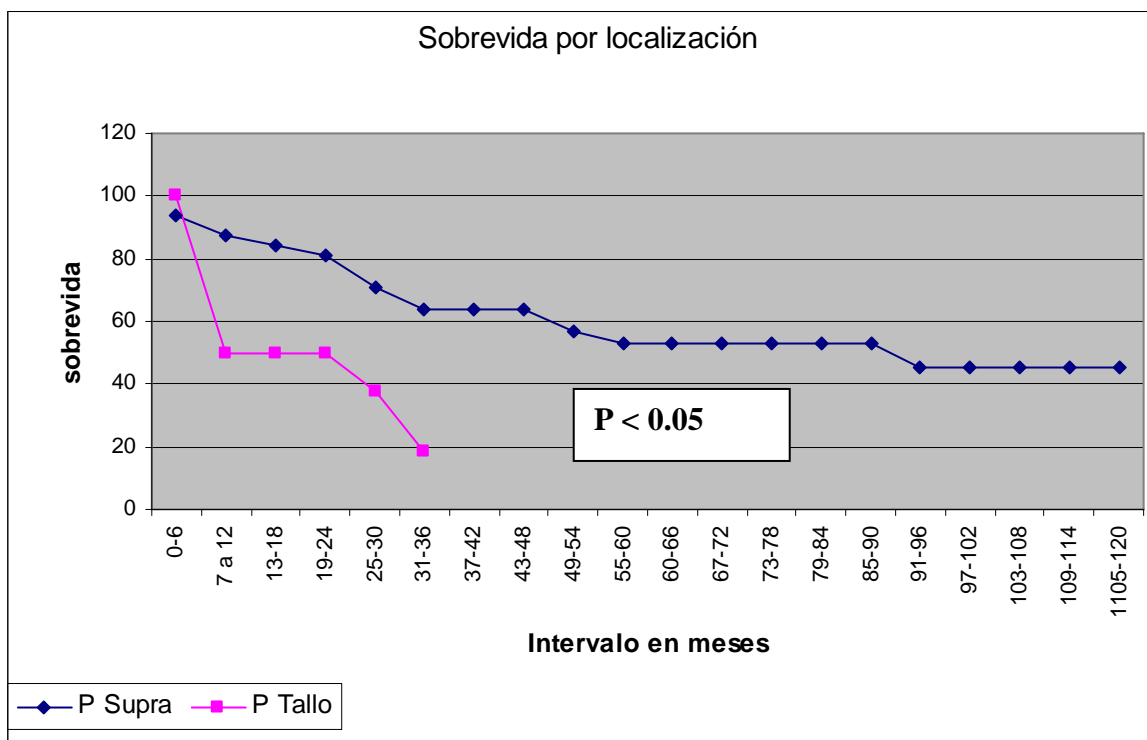


Imagen 3. Gráfica de sobrevida por localización: Supratentorial (p=45%)
Infratentorial (p=18.7%)

Tabla 5.1 Tabla de sobrevivencia para los pacientes con astrocitoma de alto grado de acuerdo a la expresión de antígeno Ki 67.

Ki 67 positivo (n:12)

Intervalo	N	D	W	Q	p1	S1
0-6	12	1	0	0.083	0.916	0.916
7 a 12	11	3	0	0.272	0.727	0.665
13-18	8	0	0	0	1	0.665
19-24	8	1	1	0.187	0.813	0.540
25-30	6	0	0	0	1	0.540
31-36	6	0	0	0	1	0.540
37-42	6	0	0	0	1	0.540
43-48	6	0	0	0	1	0.540
49-54	6	1	0	0.166	0.834	0.450
55-60	5	0	0	0	1	0.450
60-66	5	0	0	0	1	0.450
67-72	5	0	0	0	1	0.450
73-78	5	0	0	0	1	0.450
79-84	5	0	0	0	1	0.450
85-90	5	0	0	0	1	0.450
91-96	5	1	0	0.2	0.8	0.360
97-102	4	0	0	0	1	0.360
103-108	4	0	0	0	1	0.360
109-114	4	0	0	0	1	0.360
1105-120	4	0	0	0	1	0.360

Tabla 5.2 Tabla de sobrevivida para los pacientes con astrocitoma de alto grado de acuerdo a la expresión de antígeno Ki 67.

KI 67 negativo (n:9)

Intervalo	N	D	W	Q	P1	S1
0-6	9	0	0	0	1	0.1
7 a 12	9	1	0	0.111	0.889	0.889
13-18	8	0	0	0	1	0.889
19-24	8	0	1	0.062	0.937	0.832
25-30	7	0	2	0.142	0.858	0.713
31-36	5	0	2	0.2	0.8	0.570
37-42	5	0	0	0	1	0.570
43-48	5	0	0	0	1	0.570
49-54	5	0	0	0	1	0.570
55-60	5	0	0	0	1	0.570
60-66	5	0	0	0	1	0.570
67-72	5	0	0	0	1	0.570
73-78	5	0	0	0	1	0.570
79-84	5	0	0	0	1	0.570
85-90	5	0	0	0	1	0.570
91-96	5	0	0	0	1	0.570
97-102	5	0	0	0	1	0.570
103-108	5	0	0	0	1	0.570
109-114	5	0	0	0	1	0.570
1105-120	5	0	0	0	1	0.570

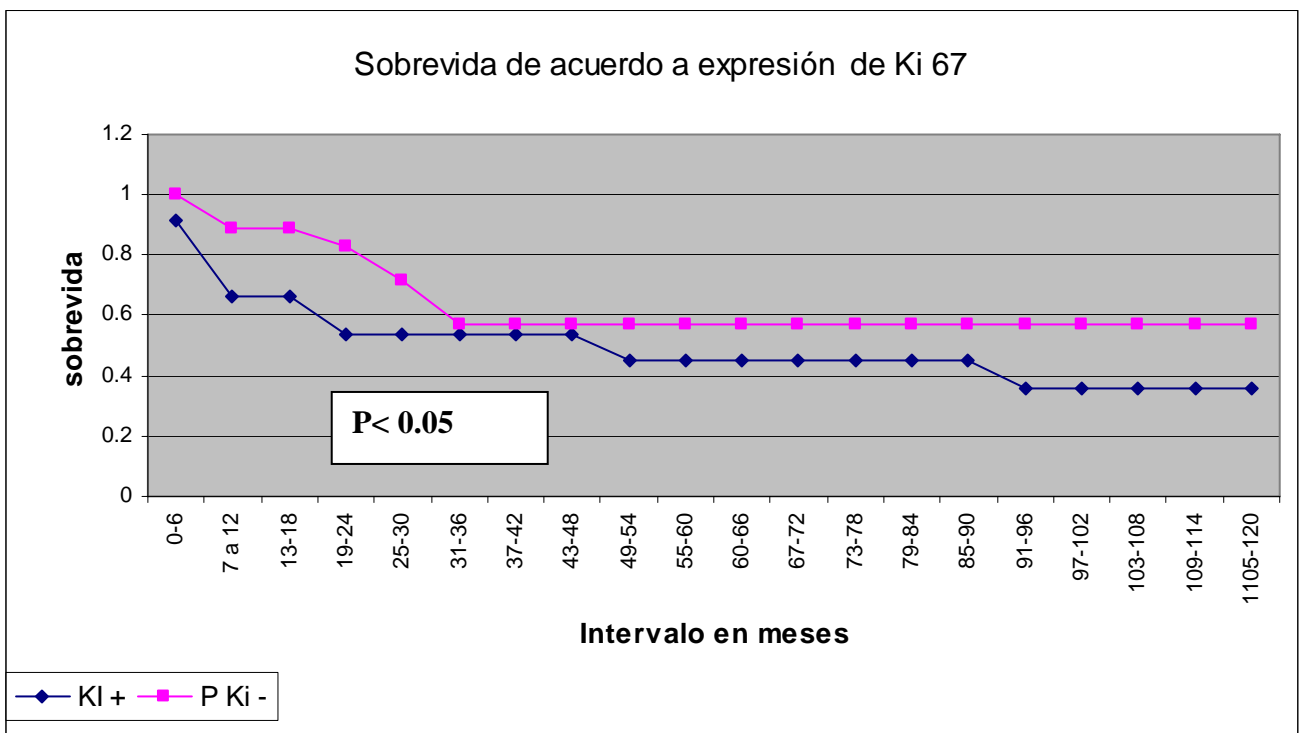


Imagen 4 Grafica de sobrevivida de acuerdo a la expresión de Ki 67 positivo (P=36%) y negativo (P=57%)

Discusión

La sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado ha sido reportada en la mayoría de los estudios internacionales como mala, con medias de seguimiento de 6 a 9 meses. A partir de fines de la década de los 90's, con la introducción de la quimioterapia neoadyuvante, la sobrevida se ha visto incrementada, en particular con el esquema de quimioterapia utilizando tres drogas (ifosfamida, carboplatino VP16) ya que se demostró que la barrera hematoencefálica en las áreas adyacentes al tumor estaba disfuncional, y mas aun, al dar esta secuencia quimioterapica en los 14 días posteriores a la cirugía, que son los días en los cuales las células tumorales entran en ciclo celular, presentando una fracción de crecimiento mas acelerada y por lo tanto son mas sensibles al tratamiento(13).

No obstante que la sobrevida en pacientes con astrocitoma de alto grado reportada por nuestro hospital alcanzó a ser de 56% a 5 años del diagnostico, es importante destacar que continua habiendo un grupo de pacientes que tiene mal pronóstico por lo tanto es importante determinar cuales son esos factores que llevan a un peor pronostico y de esta manera diferenciarlos y tratarlos de una manera mas agresiva. (16)

Tradicionalmente se ha considerado que los pacientes con astrocitoma de alto grado, subgrupo glioblastoma multiforme tienen peor pronostico, de acuerdo a nuestra serie encontramos que no existió diferencia estadísticamente significativa al comparar ambos grupos, astrocitoma anaplasico vs glioblastoma multiforme, con una sobrevida reportada a 1, 5 y 10 años de 81.8%, 55.7% y 41.7% para el primer grupo contra 70.2%, 50% y 50% en el mismo periodo del segundo grupo. De hecho de manera paradójica hay discreta mayor sobrevida en glioblastoma multiforme lo que tal vez pueda deberse al tamaño de la muestra, dado que esto no corresponde con lo reportado en la literatura. Cabe mencionar que de nuestros 10 pacientes con glioblastoma multiforme 9 expresaron Ki67 positivo.

En cuanto a la localización se ha descrito peor pronostico en aquellos pacientes cuya tumoración se encuentra en tallo cerebral, estos pacientes tienen mala sobrevida por tres razones, primero por que dada la localización el acceso

quirúrgico se limita únicamente a realización de biopsia, la segunda es por que la vascularización de estos tumores es baja por lo que la penetrancia de la quimioterapia es baja, y tercero la baja fracción de crecimiento conlleva a una mala respuesta a quimioterapia; a pesar de ello la sobrevida reportada en este estudio es de 18.7% a 36 meses, misma que no es alcanzada por otras series internacionales. En constaste los de localización supratentorial tienen una sobrevida a 1,5 y 10 años fue de 87%, 52% y 45% existiendo una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$) de acuerdo a Log Rank Test.

En nuestra serie de pacientes la sobrevida global encontrada para todo el grupo en general fue de 80%, 57% y 51% a 1, 5 y 10 años sin hacer meseta, presentando incluso un declive en la curva en el mes 91, lo cual quiere decir que no podemos considerar a estos pacientes como curados, requiriendo vigilancia toda su vida, cabe mencionar que una paciente presentó recaída y defunción incluso después de 10 años de vigilancia.

Recientemente se ha estudiado la importancia y el valor de los anticuerpos a proteína expresados en las células proliferantes, como el Ki67 el cual ha sido estudiado en varios tipos de tumores, sin embargo hasta esta década se ha visto su importancia en tumores astrocíticos. El antígeno Ki67 reconoce una proteína que es expresada en todas las fases del ciclo celular excepto en las fases G0 y fases tempranas de G1, que son justamente las que se expresan en aquellas células de los tumores que se consideran con mas baja proliferación celular, por lo tanto menos agresivos, dicho de otra forma, los tumores que expresan el antígeno Ki67, son tumores de alta proliferación celular, agresivos e invasores, lo que pudiera sugerir dar un tratamiento mas agresivo a los pacientes que expresen este antígeno. Llama la atención que en nuestra serie que de las 9 defunciones, 8 expresaron el antígeno Ki67 positivo; es importante también mencionar que de los 12 pacientes que expresaron Ki67 positivo 8 fueron defunciones, lo cual da un riesgo 4 veces mal alto de fallecer en comparación con quienes no lo expresaron.

En nuestra serie de pacientes la sobrevida a 1, 5 y 10 años para el grupo de pacientes que expresaban el antígeno ki67 positivo fue de 66%, 45% y 36% comparada con el grupo de pacientes que no la expresaron con una sobrevida de 88%, 57%, 57% al mismo periodo existiendo diferencia estadística ($p < 0.05$).

David Ellison, en una cohorte de 123 pacientes adultos, demostró disminución en la sobrevida de los pacientes que expresaban Ki67 en comparación con quienes no lo expresaban ($p = 0.04$). En esta misma cohorte no se encontró una relación en la sobrevida de los pacientes que expresaban p53, estos resultados indican que realizar la inmunohistoquímica para ki67 predice un patrón de sobrevida en pacientes con tumores astrocitarios.

La histopatología convencional parece quedarse limitada y por lo tanto ya no puede ser considerada como suficiente para realizar el diagnóstico y pronóstico de estos pacientes.

Por último, es importante mencionar, que sin ser el objetivo del trabajo el de calcular costos y beneficios, debe resaltarse que éste es un estudio de inmunohistoquímica relativamente sencillo y económico, dado que el kit completo para 100 pacientes tiene un costo de \$ 500 dolares, lo que cada prueba tendría un costo de 5 dolares, siendo mucha la información que éste antígeno nos puede proporcionar.

CONCLUSIONES

Del presente trabajo podemos concluir que debe incorporarse la determinación de antígeno Ki67 en el estudio de todos los pacientes con astrocitoma de alto grado, para contar con mas elementos para definir de manera mas precisa el pronostico de los pacientes de forma particular , y así poder individualizar el tratamiento, ofreciendo a estos pacientes una mayor posibilidad de sobrevida, incorporando quizás una cuarta droga para estos pacientes identificados con peor pronostico, los cual da pie a un nuevo protocolo de investigación.

Bibliografía

1. Gurney J, Smith M, Bunin G. CNS and miscellaneous intracranial and intraspinal neoplasms En: Ries LAG, Smith MA, Gurney JG . Cancer incidence and survival among children and adolescents: United States SEER program 1975-1995. NIH Pub No 99-4649. Bethesda MD: National Cancer Institute, SEER Program, 1999: 51-63
2. Compendio del Registro Histopatológico de Neoplasias en México. Morbilidad, regionalización 1993-1996 y mortalidad. Tendencias 1985-1995, México. Secretaría de Salud. Dirección General de Epidemiología.,1998
3. Grovas A, Fremgem A, Rauck A.The National Cancer Data Base report on patterns of childhood cancers in the United States. Cancer 1997;80:2321-2332
4. Bailey P, Cushing H. A classification of the tumors of the gliomas group on a histogenetic basis with correlated study of prognosis. Philadelphia: JP Lippincott,1996
5. Kernohan JW, Mahoon RF, Stadification of the gliomas. Proc Staff Meet Mayo Clinic 1949;24:71-75
6. Rorke LB, Gilles FH, Davis RL. Revision of the World Health Organization classification of brain tumors for childhood. Cancer 1985;56:1869-1886
7. Halperin EC, Watson DM, George SL. Duration of symptoms prior to diagnosis is related inversely to presenting disease stage in children with medulloblastoma: A Pediatric Oncology Group study . J Neuropathol Exp Neurol 2000;59:867-865
8. Starr A, Achar J. Brain system responses in neurologic disease. Arch Neurol 1975;32:761-768
9. Omuro A, Leite C, Mokhtari K, Delattre J. Pitfalls in the diagnosis of brain tumours. Lancet. 2006;5:937-948.
10. Yang P, Berger P, Cohen M. Computed tomography and childhood seizure disorders. Neurology 1979;29:1084-1088
11. Bloom H. Prospects for increasing survival in children with medulloblastoma: Present and future studies. Neurooncology 1979;1: 245-260,.

12. Rutkowski S, Bode U, Deinlein F, et al. Treatment of early childhood medulloblastoma by postoperative chemotherapy alone. *NEJM* 2005;352:978-986
13. Cohen BH, Zeltzer PM, Boyett JM, et al. Prognostic factors and treatment results for supratentorial primitive neuroectodermal tumors in children using radiation and chemotherapy: A children Cancer Group randomized trial. *J Clin Oncol* 1995;13:1687-1696
14. Dohrmann GJ, Farewell JR, Flannery JT: Astrocytomas in childhood: A potential-based study. *Surg Neurol* 1985;23:64-68
15. Lopez-Aguilar E, Cerecedo-Diaz F, Sepulveda-Vidosola A, Rivera-Marquez H, Castellanos-Toledo A, Arias-Gomez J et al. Preirradiation with carboplatine, ifosfamide y etoposide in high grade astrocytomas. *Arch Med Res.* 2003; 98:145-51.
16. Lopez-Aguilar E, Cerecedo-Diaz F, Sepulveda-Vidosola A, Rivera-Marquez H, Castellanos-Toledo A, Arias-Gomez J et al. Astrocytomas en pediatría. Factores pronósticos. *Gac Med Mex*:1994;133:231-235
17. López-Muñiz JC, Gutiérrez C, García-Fernández A. Valor pronóstico de los marcadores tumorales de proliferación celular y angiogénesis en los oligodendrogliomas. *Oncology.* 2000; 27: 289-296.
18. Gutmann D, Poyhonen J, Ferner R, Guha A, Hariharan S, Viskochil D, Perry A. Molecular analysis of astrocytomas presenting after age 10 in individuals with NF1. *Neurology.* 2003;61:1397-1400
19. Sverre T. Proliferative activity in human glioblastomas: evaluation of different equivalent antibodies. *J Clin Pathol: Mol Pathol* 1997;50: 198-200
20. Hilton D, Love S, Barber R, Ellison D, Sanderman D. Accumulation of p53 and Ki-67 expression do not predict survival in patients with fibrillary astrocytomas on the response of these tumors to radiotherapy. *Congress of Neurological Surgeons* 1998; 42: 724-729
21. Montine T, Vandersteenhoven J, Aguzzi A, Boyko O, Dodge R, Burger P. Prognostic significance of Ki-67 proliferation index supratentorial fibrillary astrocytic neoplasms. *Congress of Neurology Surgeons* 1994; 34:674-679

22. Thian T, Davis R, Elowitz E, Di Costanzo D. Practical value of Ki-67 and P53 labeling indexes in stereotactic biopsies of diffuse and pilocytic astrocytomas. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:108-113
23. Johannessen A, Torp S. The Clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. *Pathol Oncol Res.*2006;12:143-147
24. Isolan GR. Astrocytic neoplasms a correlation with mutate p53 and Ki-67 proteins. *Arq. Neuropsiquiatr.* 2005;63(4):997- 1004
25. Grotzer M, Birgit G, Janss A, Huaqing Z, Lucy B, Phillips R. Prognostic significance of K-67 (M1B1) proliferation index in childhood primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. *Med. Pediatr. Oncol* 2001;36:268-273
26. Tortosa A, Vinolas N, Villa S, Verger E, Gil JM, Brell M. A prognostic implication of clinical, radiologic, and pathologic features in patient's with anaplasia gliomas. *Cancer* 2003;15; 97:1063-71
27. Haapasalo A, Mennander P, Helen H, Isola D. Ultrarapid Ki-67 immunostaining in frozen section interpretation of gliomas. *J Clin Pathol.* 2005; 58(3): 263–268.
28. Rout P. Desmoplastic infantile ganglioma-clinicopathological and immunohistochemical study of four cases. *Childs Nerv Sys* 2002;18:463-7
29. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use histopathology. *Histopathology.* 1990. 17:489-503.
30. Bar JK, Harlozinska A, Markowska J, Nowak M. Studies on tumor proliferation using monoclonal antibody, Ki-67 and expression of p53 in cancer. *J Gynaecol Oncol.* 1996;17(5):378-80.

Anexo 1

TECNICA DE INMUNOHISTOQUIMICA PARA DETERMINACION KI67

Se realizaron cortes de 4 micras de los bloques de parafina, los que se colocaron sobre laminillas especiales que contaban con testigo positivo para este antígeno. Se utilizó el anticuerpo *monoclonal mouse antihuman Ki67 antigen clona ki55* a dilución 1:20.

Previo a la inmunotinción, las muestras de tejido se desparafinaron en estufa a 60^a por 2 horas y se incluyeron en xilol para posteriormente hidratarlas en alcoholes graduales (90^o, 80^o y 70^o).

Se realizó recuperación de sitios antigénicos utilizando una solución de citrato buffer previamente diluido al 1:10 con pH de 6 en autoclave, durante 5 minutos y se colocaron en estufa a 125^o C por 5 min y se realizó inmunohistoquímica

El proceso de inmunotinción se inició con la aplicación de 200 microlitros de reactivo bloqueante de peroxidasa endógena metanol-H₂O₂ al 3% previamente preparado y se incubaron las muestras durante 20 minutos a temperatura ambiente. Se bloqueó la colágena con 200 microlitros de una solución de suero de caballo al 20% durante 15 minutos.

Sin lavar se cubrieron las muestras con 200 microlitros del reactivo de anticuerpo anti-Ki-67 clon *monoclonal mouse antihuman Ki67 antigen clona ki55* a dilución 1:20. durante 1 hora. Posteriormente se añadieron 200 microlitros del anticuerpo secundario dilución 1:200 por 15 minutos, seguido el complejo avidina-biotina al 10%, durante 15 minutos. Entre pasos, eliminamos el exceso de reactivo y enjuagamos cada vez con PBS.

Se reveló la reacción introduciendo las muestras en una solución de sustrato cromógeno DAB preparada unos minutos antes de usar e inmediatamente se llevó la muestra a estufa de 37^oC, durante 3 minutos. Las laminillas se tiñeron con hematoxilina de Harris durante 12-15 segundos para contrastar.

Anexo 2

HOJA DE RECOLECCION DE DATO

Folio_____

Nombre_____

Filiacion_____

Edad : Años_____ Meses_____

Sexo Masculino () Femenino ()

Diagnostico_____

PQ_____

Localización_____

Fecha de diagnostico_____

Fecha de ultima cita_____

Fecha de recaida_____

Fecha de defunción_____

Causa de defunción:_____

Antigeno Ki67: presente () Ausente ()

QT recibida_____

Numero de ciclos_____

Radioterapia si () No ()

Numero de sesiones_____ Gy_____

Cirugía: Total _____ subtotal_____ biopsia_____

Respuesta a quimioterapia: Completa () Parcial() EE() EP()

IMC al diagnostico

IMC al final del tratamiento

Desnutrición Si () No () Grado_____

RC: 100% desaparición del tumor

RP: 50 a 99% reducción tumoral

EE: menos de 50% de reducción tumoral

EP: mas de 25% de progresión tumoral