



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
UNIDAD DE POSGRADO
FACULTAD DE MEDICINA

“Expresión diferencial de HIF-1, VEGFR y nivel de Ki-67 en astrocitomas de bajo y alto grado como predictor de progresión de la enfermedad”

TESIS
PARA OBTENER EL GRADO DE
MÉDICO ESPECIALISTA EN MEDICINA INTERNA

PRESENTA: DR. SANTIAGO ALEJANDRO CANO CANCELA

TUTOR: DR. OSCAR ARRIETA RODRÍGUEZ
FUNDACIÓN CLÍNICA MÉDICA SUR

MÉXICO, D. F.

15 DE NOVIEMBRE DE 2013



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.

Tipo de investigación: Epidemiológico- experimental

Título: “Expresión diferencial de HIF-1, VEGFR y nivel de Ki-67 en astrocitomas de bajo y alto grado como predictor de progresión de la enfermedad”

Tutor: Dr. Oscar Arrieta Rodríguez / Oncólogo

Alumno: Dr. Santiago Alejandro Cano Cancela / R4MI

Sede: Fundación Clínica Médica Sur

Departamento de Medicina Interna, Departamento de Patología y Centro Oncológico

“Laura Rojas de Colosio”

Julio 2013

I. ÍNDICE

Introducción	4
Marco Teórico	4
Justificación	20
Objetivos	20
Hipótesis	21
Diseño	21
Material y Métodos	21
Universo de estudio	21
Tamaño de la muestra	21
Criterios de selección	22
Definición de variables	22
Descripción de procedimientos	24
Hoja de captura de datos	27
Definiciones conceptuales	28
Resultados	31
Discusión y conclusiones	40
Consideraciones éticas	42
Referencias	42

II. Introducción

A. Marco teórico

Los astrocitomas y glioblastomas son los tumores cerebrales más frecuentes y agresivos en humanos, con tasas de supervivencia a 5 años de 0-5%. Los astrocitomas de bajo grado tienen mejor pronóstico, sin embargo, la mayoría progresan eventualmente a tumores de alto grado. La presencia de necrosis y de proliferación endotelial vascular distinguen los tumores de alto grado de los de menor grado. La presencia de hipoxia juega un rol primordial en la transformación maligna de células y el crecimiento tumoral. En un importante número de neoplasias la presencia de hipoxia predice la posibilidad de metástasis, recurrencias tumorales, resistencia a tratamiento, invasión y disminución en la supervivencia. El estrés hipóxico se relaciona con diferentes cambios fenotípicos fundamentales para la progresión tumoral; esto es mediado por diferentes mecanismos genéticos tales como inestabilidad genómica, pérdida del potencial apoptótico, alteraciones de la expresión genómica e inducción de la angiogénesis.

Los tumores cerebrales engloban neoplasias que se originan de manera primaria a partir del tejido cerebral (primarios) o que invaden el cerebro como parte de enfermedad metastásica originada en otro sitio (secundarios). De los tumores primarios del SNC, los más frecuentes son los gliomas. El término glioma se refiere a tumores que tienen características histológicas similares a las células gliales normales (astrocitos, oligodendrocitos, células endoteliales); sin embargo el origen de estos tumores no está claro. Tradicionalmente se ha establecido que estas neoplasias se originan a partir de tales células gliales, investigaciones recientes han hipotizado el origen de estas tumoraciones a partir de células madre neurales o progenitoras (1).

Cada tipo de glioma tiene su propio espectro de agresividad biológica. Aunque algunos gliomas pueden ser histológica y biológicamente benignos, depende de su localización en el tejido cerebral la sintomatología con la que cursan y la posibilidad de resección. De esta manera, un tumor relativamente pequeño, de crecimiento lento y mitoticamente inactivo con bajo poder metastásico puede ser letal si se localiza en una región cerebral que regula funciones vitales o si se encuentra en un lugar inaccesible para realizar resección quirúrgica.

Clasificación de tumores cerebrales

La base de la clasificación de los gliomas recae sobre la microscopia de luz, apoyado frecuentemente por inmunohistoquímica y en raras ocasiones por microscopia electrónica. En los últimos años se han evidenciado diferentes alteraciones moleculares que definen diferentes subtipos de gliomas, y que son útiles para la clasificación. De manera general, los tumores gliales se clasifican en: tumores astrocíticos, tumores oligodendrocíticos y de la oligodendroglia y tumores endimarios.

Los Astrocitomas se dividen en tumores difusos (los más frecuentes en adultos) y en astrocitomas circunscritos o localizados (generalmente de bajo grado en pacientes jóvenes, incluyen astrocitoma pilocítico y xantastrocitoma pleomórfico). La OMS clasifica los tumores astrocíticos difusos de acuerdo a la histología hallada, de la siguiente manera:

- Astrocitoma difuso grado II.- Gliomas astrocíticos difusamente infiltrativos con celularidad aumentada y atipia, pero sin mitosis, proliferación endotelial o necrosis. Estos pueden subdividirse en tres tipos: fibrilar, protoplásmico y gemistocítico; sin embargo pueden encontrarse formas mixtas, siendo el subtipo fibrilar el más comúnmente encontrado. Se encuentran más frecuentemente en adultos jóvenes, y muchos de ellos progresan a astrocitomas de alto grado.
- Astrocitoma anaplásico grado III.- Presentan celularidad elevada, atipia nuclear marcada e hiper cromasia, y mitosis, pero sin proliferación endotelial o necrosis. Pueden ser subtipos gemistocítico o fibrilar. El pronóstico es malo.
- Glioblastoma grado IV.- o GBM, son densamente hiper celulares, pleomórficos con actividad mitótica elevada, y proliferación vascular, o necrosis, o ambos. Variantes histológicas incluyen GBM de células gigantes, GBM de células pequeñas, gliosarcoma y glioblastoma con componente de oligodendrogloma. El pronóstico es malo, con tasas de supervivencia por debajo de 2 años. Los GBM pueden surgir como tumoraciones de novo (primarios) en pacientes adultos mayores, o evolucionar desde un tumor de bajo grado (secundarios), típicamente en adultos jóvenes.

Este tipo de tumores, y principalmente los tumores grado II y III, se caracterizan por la presencia de mutaciones en la isocitrato deshidrogenasa 1 (IDH1) y en el gen TP53; las alteraciones en el gen IDH1 confieren un pronóstico favorable.

Como su nombre lo dice, los gliomas difusos son neoplasias infiltrativas que invaden el parénquima cerebral. Típicamente involucran la sustancia blanca de los hemisferios cerebrales, pero también pueden presentarse de manera primaria en la sustancia gris y en otras regiones del sistema nervioso central. Su infiltración difusa frecuentemente es un obstáculo para resecciones quirúrgicas curativas y complica la adecuada liberación de muchos de los tratamientos. Su incidencia aumenta a partir de la quinta década de la vida, alcanzando su máximo a los 65 años de edad, principalmente en hombres (3). Los astrocitomas de alto grado pueden generarse a partir de lesiones de menor grado o presentarse de novo; cuando se desarrollan a partir de lesiones de bajo grado afectan predominantemente a pacientes jóvenes, con un curso clínico prolongado; cuando son lesiones de novo se presentan generalmente a partir de la quinta década, con un curso clínico rápidamente progresivo. En general, a mayor grado histológico, se agregan características malignas. En general, la actividad mitótica caracteriza a los tumores anaplásicos grado III, mientras que la proliferación vascular y necrosis define lesiones grado IV.

Los gliomas malignos se originan de células neuronales progenitoras, pero no está claro el preciso estado de diferenciación a partir del cual evolucionan estas neoplasias. Todos ellos contienen células madre multipotenciales responsables de la proliferación tumoral. La formación y progresión de gliomas difusos se acompaña de la activación de oncogenes e inactivación de genes supresores de tumor, supresión de genes apoptóticos y alteraciones en la regulación de los genes de reparación del ADN.

La resección total es prácticamente imposible. La Radioterapia es la base del tratamiento (4). La Quimioterapia se basa en agentes con nitrosourea. La supervivencia media es de solo 50 semanas.

Mecanismos moleculares en el desarrollo de astrocitomas y glioblastomas

La formación de un astrocitoma grado II de la OMS se asocia con al menos tres moderadas alteraciones genéticas comunes: inactivación del gen supresor TP53,

mutaciones puntuales heterocigotas de la IDH1, y pérdida del cromosoma 22q, cuyo gen específico aún no ha sido identificado. El gen TP53 se localiza en el cromosoma 17p y codifica para la proteína p53, que juega un papel integral en un importante número de procesos celulares, incluyendo paros del ciclo celular, respuesta a daño del ADN, y apoptosis.

La inactivación del gen TP53, debida generalmente a la mutación de una copia y pérdida del alelo restante, se presenta hasta en el 50% de los astrocitomas de bajo grado, y hasta en un tercio en astrocitomas anaplásicos y GBM. Las mutaciones TP53 son principalmente mutaciones de pérdida de sentido y se dirigen a los dominios conservados evolutivamente en los exones 5, 7 y 8. Puntos mutacionales particulares incluyen los codones 175, 248 y 273, en los que tienen más probabilidades de transiciones de C a T como resultado de la desaminación espontánea de residuos de 5-metilcitosina. Estas mutaciones afectan a residuos de p53 que son cruciales para la unión al ADN, y que llevan a pérdida de las funciones mediadas por p53. Las mutaciones somáticas del codón 132 en IDH1 se presentan en 50 a 80% de astrocitomas grados II y III, así como en GBM secundarios, presentándose sólo en 5% de los GBM primarios. Se ha observado en algunos estudios que la presencia de mutaciones en IDH1 tiene implicaciones pronósticas, con mayor supervivencia libre de progresión y supervivencia global (7). Se han atribuido una buena cantidad de mecanismos a la desregulación de IDH en la formación de gliomas. IDH1 mutantes pueden actuar como inhibidores negativos dominantes de la función de IDH1 nativo, ejerciendo un efecto tumorigénico al inducir la vía de HIF-1 alfa (17). Otra posibilidad es que los mutantes heterocigotos IDH1 fomentan la formación de un metabolito oncogénico, R (-)-2-hidroxiglutarato (2HG), que se ha relacionado con metilación del ADN (18).

La transición de astrocitomas de bajo grado a astrocitomas anaplásicos se asocia con la inactivación de genes supresores de tumor en cromosomas 9p, 13q y 19q. La pérdida del cromosoma 13q (que incluye el locus del gen RB) ocurre en aproximadamente un tercio de los astrocitomas de alto grado. Aproximadamente dos tercios de ellos tienen deleciones homocigotas de la región del cromosoma 9p que incluye los genes CDKN2A y CDKN2B. Las alteraciones del gen RB, CDKN2A y de CDK4 son mutuamente excluyentes en glioblastomas (19). La progresión a glioblastoma también se asocia con la inactivación

del gen supresor PTEN en el cromosoma 10 y amplificación del gen de EGFR (20). La pérdida del cromosoma 10 se presenta en 60-85% de glioblastomas, con aproximadamente 25% de los casos con mutaciones de PTEN. el gen de EGFR se encuentra amplificado en aproximadamente 40% de todos los glioblastomas, siendo menos común en astrocitomas anaplásicos, lo que resulta en sobreexpresión de EGFR. Aproximadamente un tercio de glioblastomas que presentan amplificación de EGFR presentan también rearrreglos genéticos. Los glioblastomas con amplificación del gen de EGFR pueden originarse de novo o rápidamente progresar desde un tumor de bajo grado. En contraste, ésta última alteración molecular casi nunca ocurre en glioblastomas con mutación de TP53 o con pérdida del cromosoma 17p. de esta manera, un tercio de GBM tienen inactivación de TP53, un tercio tienen amplificación del gen de EGFR, y un tercio no presentan ninguna de estas alteraciones. Los GBM con inactivación de TP53 se relacionan predominantemente con glioblastomas secundarios, con presentación más frecuente en pacientes jóvenes; mientras que los GBM que se asocian con amplificación del gen de EGFR ocurren típicamente en pacientes adultos mayores y se presentan como glioblastomas primarios o de novo. Escenarios paralelos se han sugerido para la mutación de IDH, con la mayoría de astrocitomas grado II y III y glioblastomas secundarios asociados con mutaciones de IDH y mejor pronóstico, y la mayoría de los glioblastomas primarios asociados con la ausencia de mutaciones de IDH.

Una variedad de factores de crecimiento u oncogenes se expresan en gliomas malignos, promoviendo una ventaja para el crecimiento de las células neoplásicas. En general las células de glioma expresan tanto el ligando como el receptor de los factores de crecimiento, estableciendo un circuito autócrino promotor del crecimiento. Alguno de estos factores de crecimiento se expresan intensamente en tumores de bajo y alto grado, mientras que otros tanto se expresan solo en GBM. Estos incluyen: factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR), factor de crecimiento básico del fibroblasto (bFGF FGF-2), factor transformador del crecimiento alfa (TGF-alfa) y factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF-1).

Las células de los gliomas desarrollan mecanismos que les permiten escapar del control del ciclo celular, dando con ello una ventaja para el crecimiento celular. La mayoría

de dichos defectos en moléculas reguladoras del crecimiento ocurren preferentemente en gliomas de alto grado; la transición de gliomas de crecimiento lento grado II a gliomas agresivos, anaplásicos se debe a alteraciones en la regulación del ciclo celular. El sitio de control que más atención ha recibido es la transición de fase G1 a S. una de las principales vías de control de este punto involucra las proteínas pRB, ciclina D, CDK-4 y p16. La pérdida de la función pRB se traduce pérdida del control de paro del ciclo celular. Un mediador río arriba de la función de pRB es CDKN2A, que es el producto de la acción de p16 en el cromosoma 9p; p16 inhibe el complejo ciclina-ciclina dependiente de cinasas que regula RB. Muchos de los gliomas de bajo grado y hasta dos tercios de los gliomas malignos presentan deleciones homocigotas del cromosoma 9p, que resultan en la expresión de p16 que transcribe para CDKN2A y CDKN2B (transcrita a partir de p15) y que ocasionan pérdida del control de checkpoints del ciclo celular, y con ello, proliferación celular. El gen de CDK4 se encuentra amplificado y sobreexpresado en 10-15% de gliomas malignos; esta molécula es regulada por p16 e inactiva pRB mediante fosforilación.

Una característica cardinal de los gliomas de bajo grado es su progresión a lesiones de mayor grado. Esta progresión se relaciona con la formación de clonas malignas. La presencia de inestabilidad genómica, presente en muchos tumores, aumenta el daño genómico, seleccionando más clonas malignas. TP53 protege a las células del daño al ADN; la mutación de TP53 lleva a la progresión tumoral por inestabilidad tumoral. La inestabilidad genómica también juega su papel en las recurrencias de glioblastomas a través de la mutación del gen MSH6, que en condiciones normales repara el ADN.

Otro componente molecular de gliomas malignos es la invasión al parénquima circundante, sin embargo esta característica ha sido poco explorada y existe una falta de estudios en modelos animales importante. Se ha establecido que la expresión de diversas moléculas de la matriz extracelular y receptores de la membrana celular modularían la transducción de señales de diferentes vías, incidiendo directamente sobre la invasión y migración de estas neoplasias; estos mecanismos incluyen proteínas del citoesqueleto, moléculas de señalización que median interacciones entre el medio externo y el citoesqueleto, receptores de membrana que regulan la migración por moléculas de

adhesión transmembrana, así como componentes de la matriz extracelular, incluyendo proteasas.

Angiogénesis. El papel de VEGF y HIF y la respuesta a hipoxia

Los tumores sólidos no pueden crecer más de 1-2 mm sin la formación de nuevos vasos sanguíneos. Los astrocitomas pueden migrar a zonas de riego sanguíneo preexistentes, sin embargo, el desarrollo de vasos sanguíneos es necesario para la progresión a tumores de alto grado. Los gliomas malignos son tumores densamente vascularizados; histológicamente la presencia de proliferación microvascular define un tumor de alto grado.

En esta transición de astrocitomas de bajo grado glioblastomas ocurre una serie de secuencias de cambios vasculares dramáticos que se refleja en el reforzamiento, casi en anillo, con medio de contraste que se presenta en tumores de crecimiento rápido en los estudios de imagen. Los astrocitomas de bajo grado se presentan en estudios de Resonancia Magnética (IRM) como lesiones hemisféricas, si refuerzo, de extensión variable, con refuerzo en T2. Las células tumorales se filtran al parénquima pero no muestran tendencia a agregarse alrededor de vasos sanguíneos, que son de características normales. Los astrocitomas anaplásicos presentan características intermedias entre astrocitomas de bajo grado y GBM. Son tumores más extensos, con reforzamiento con el medio de contraste en IRM por su alta vascularidad. Histológicamente se presentan con alta celularidad y tasas de proliferación incrementadas. La densidad de los vasos sanguíneos aumenta de manera notable, que se presentan con anatomía distorsionada, con luz dilatada y paredes engrosadas. Las células neoplásicas se agregan alrededor de vasos sanguíneos medianos a pequeños. En la transición de astrocitomas grado III a GBM ocurren cambios vasculares, para convertirse en las neoplasias mayormente vascularizadas. En IRM se muestran como masas de crecimiento rápido, hiperintensas, con reforzamiento en anillo y reforzamiento con el medio de contraste. Histológicamente se observan neoplasias hipercelulares, con hiperplasia microvascular o necrosis con células en pseudoempalizada alrededor de centros necróticos. Las áreas de necrosis se encuentran adyacentes a las áreas de hiperplasia microvascular. Estas áreas de hiperplasia consisten en células endoteliales de

rápida división y pericitos que forman microagregados en los bordes del vaso sanguíneo paterno, de aspecto similar a glomérulos cuerpos glomeruloides).

La angiogénesis en estas neoplasias es resultado de la interacción entre factores pro-angiogénicos y anti-angiogénicos. En primer lugar, los vasos maduros incrementan su permeabilidad, con extravasación de plasma y proteínas y depósito de proteínas de matriz proangiogénicas. Se presentan cambios en las membranas basales y en la matriz extracelular por acción de enzimas proteolíticas; y es a través de esta matriz extracelular que las células endoteliales migran siguiendo el gradiente quimiotáctico, formando el lumen central, depósito de la membrana basal y reclutamiento de podocitos y músculo liso que rodean los nuevos vasos.

Se han identificado moléculas angiogénicas en gliomas malignos, principalmente en glioblastomas, siendo el factor más claramente implicado el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), un mitógeno endotelial que se expresa más frecuentemente adyacente a áreas de necrosis en GBM, pero no así en astrocitomas grado 2, sugiriendo que la progresión desde gliomas de bajo grado a GBM incluye un “cambio angiogénico”. Las células endoteliales del tumor expresan receptores de VEGF, estableciendo un sistema de estimulación parácrina en el que las células tumorales favorecen la proliferación vascular. De esta manera, el microambiente cobra gran importancia en glioblastomas, con regiones de neovascularización rodeando zonas de necrosis.

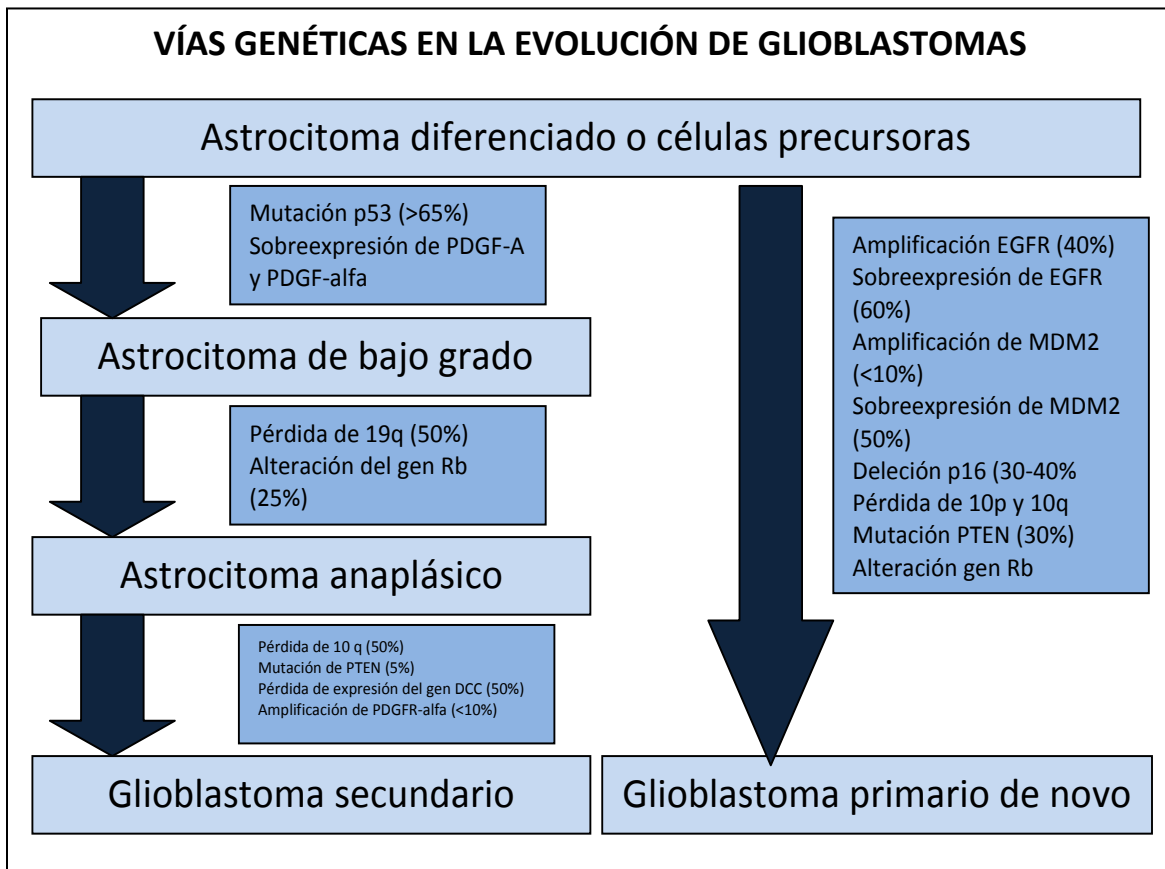
Uno de los principales estímulos para la angiogenesis tumoral es la respuesta fisiológica a hipoxia, que favorece una estrecha relación entre hiperplasia vascular y necrosis en la vecindad de dichas zonas hipóxicas. Las células alrededor de las zonas de necrosis se agrupan en pseudopalizada, expresando altos niveles de reguladores de la angiogénesis inducidos por hipoxia, entre ellos VEGF. La hipoxia induce un aumento en la transcripción del gen de VEGF por la familia del factor inducido por hipoxia o HIF, conocidos también como factores de transcripción; en consecuencia las concentraciones de VEGF aumentan localmente en las zonas de necrosis (hasta 200-300 veces la concentración sérica). VEGF se une a sus receptores tirosín-cinasa de las células endoteliales: VEGF-1 y VEGF-2 (Flt-1 y Flt-2, respectivamente) y estimula una cascada de eventos que deriva en la formación de nuevos vasos sanguíneos alrededor de las zonas de necrosis. Se ha establecido la hipótesis de que la trombosis de pequeños vasos

sanguíneos, probablemente mediada por factor tisular, induce micronecrosis y estos eventos inician la cascada de angiogénesis e hipoxia (14).

La expresión de VEGF en zonas de hipoxia es una respuesta adaptativa a los bajos niveles de oxígeno, el cuál debe mantenerse en un estrecho rango para mantener las adecuadas funciones celulares; con la hipoxia se presentan alteraciones en la expresión de diversos genes, que son regulados por el factor inducido por hipoxia-1 (HIF-1). HIF-1 está compuesto de 2 subunidades: HIF-1 β y HIF-1 α , ambos expresados constitutivamente y no alterados por hipoxia. Mientras que HIF-1 β se expresa en prácticamente todas las células, HIF-1 α se expresa únicamente en condiciones de hipoxia, siendo regulado por dos mecanismos. Se trata de un heterodímero de unión a ADN que requiere de varios dominios para unir ambas subunidades y de esta manera unirse al DNA; dos de estos dominios son dominios transactivacionales en HIF-1 α y son necesarios para que HIF-1 inicie la transcripción de genes que interactúan con coactivadores nucleares que promueven la transcripción de dichos genes. Estos genes contienen elementos de respuesta a hipoxia, que consisten en una pequeña secuencia de nucleótidos en la región de DNA (5'-RCGTG-3') que precede al gen, y que son reconocidos por HIF-1, promoviendo un aumento en la actividad transcripcional bajo hipoxia. HIF-1 también induce una potente respuesta angiogénica. La fracción HIF-1 β no depende de las concentraciones de oxígeno. En condiciones normales, los niveles de la subunidad HIF-1 α son bajos, pero incrementan rápidamente con hipoxia debido a degradación de proteínas por ubiquitinización a las que este une, seguido de degradación proteosomal. Esta ubiquitinización ocurre secundario a la hidroxilación de un residuo de Prolina de HIF-1 α que es dependiente de oxígeno por acción de la proteína del gen supresor Von Hippel Landau (VHL); dicha hidroxilación no ocurre en condiciones de hipoxia. La presencia de hipoxia permite a HIF-1 α escapar a la ubiquitinización, proliferar y acumularse en la célula. Existe otro mecanismo, también oxígeno dependiente, que involucra al coactivador nuclear CBP/p300, que interactúa con HIF-1 para iniciar la transcripción de genes. En condiciones de normoxia se presenta hidroxilación de un residuo de Aspargina con HIF-1 α , bloqueando la interacción entre estos dos elementos.

Estos procesos moleculares previamente descritos convergen en al menos tres vías reguladoras claves: alteraciones de receptores de tirosín-cinasas que activan la

señalización por ras PI3K se encuentra en aproximadamente 90% de GBM y promueve la hiperproliferación y aumento de la supervivencia celular; desregulación de la vía de p53 también ocurre en más del 90% de GBM y lleva a reducción de la apoptosis; la pérdida del control del ciclo celular por interrupción de la vía de Rb se encuentra en 80% de GBM.



La principal de estas vías la del Fosfatidil Inositol Trifosfato Cinasa (IP(3)K), que genera las señales celulares que llevan a un aumento de los niveles de proteínas de HIF-1; esta vía de señalización es inhibida por el gen supresor PTEN. Uno de los principales objetivos de la cascada de IP(3)K es la cinasa serina-treonina Akt. Formas mutantes de IP(3) y Akt pueden aumentar la transcripción de VEGF por mecanismos mediados por HIF-1.

La expresión de genes mediada por HIF-1 α en glioblastomas parece relacionarse exclusivamente por hipoxia, ya que se encuentran solo alrededor de zonas de hipoxia. Sin embargo, existe una gran cantidad de genes supresores y oncogenes que influyen

la transcripción de genes blanco mediados por HIF-1. Algunos de estos elementos son VEGF, EGFR, Eritropoyetina, transportador de glucosa-1, anhidrasa carbónica IX, enolasa, DHL, tirosín hidrolasa, aldolasa A, fosfoglicerato cinasa, transferrina y su receptor, y otros factores de crecimiento.

- El receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR) y el receptor del Factor de Crecimiento Derivado de Plaquetas (PDGFR) son receptores de membrana con actividad tirosín cinasa. Son activados por ligandos extracelulares y sufren fosforilación de residuos de tirosina. Esta vía activa IP(3), activando la subunidad p85, que contiene dominios de proteínas (SH2 y SH3) que interactúan directamente con EGFR y PDGFR fosforilados, que aumentan la actividad de Akt y con ello aumentan los niveles de HIF-1 α . De 40-50% de los casos de GBM primarios presentan amplificación de un segmento de material genético en el cromosoma 7 que contiene el gen de EGFR; la forma más común de amplificación es la mutada (vs la nativa) que resulta en una proteína transmembrana truncada con actividad tirosín cinasa, que a su vez activa vías de señalización intracelulares que llevan a un aumento en la mitosis e incremento en la supervivencia de la célula. El EGF, al unirse a su receptor, aumenta los niveles de la proteína HIF-1 α aun en ausencia de hipoxia; este efecto puede inhibirse mediante supresores de IP(3)K. las formas truncadas de EGFR presentes en GBM aumentan la expresión de VEGF inducida por hipoxia, aumentando la angiogénesis, mostrando un efecto sinérgico entre estas proteínas y HIF-1 α en la expresión y producción de VEGF. El PDGF se presentan en tres isoformas derivadas de dos cadenas (A y B): AA, BB y AB, que tienen afinidad por dos PDGFR: PDGF- α y PDGF- β . En los tumores gliales existe sobreexpresión de PDGFA y PDGF- α siendo mayor en GBM. Los mecanismos por los que se da esta sobreexpresión aún no están claros. El PDGF extracelular se une a la vía del IP(3)-Akt al unirse y activar el PDGFR por fosforilación de tirosina.
- En prácticamente todos los GBM primarios y en 70-90% de los secundarios se han identificado pérdidas de fragmentos genéticos del cromosoma 10. Parte de estas pérdidas es el gen PTEN (gen supresor) en 10q23.3, que se encuentra mutado en 20-40% de todos los GBM. La expresión de PTEN reduce la expresión de genes inducidos por hipoxia; este gen se opone e inhibe IP(3)K por su actividad de fosfatasa lipídica que tiene un efecto regulatorio negativo en la expresión de genes

inducidos por hipoxia. En modelos experimentales, PTEN bloquea la fosforilación de Akt inducida por hipoxia y la expresión de HIF-1.

- En astrocitomas infiltrativos, la vía del p53 se encuentra inactivada debido a mutaciones puntuales de un alelo de Tp53 de la región unida a DNA y pérdida completa del segundo alelo. 50-60% de los astrocitomas de bajo grado tienen mutaciones de TP53, lo que sugiere que forma parte en la fase temprana de tumorigénesis, produciendo división celular incontrolada, inestabilidad genética e inmortalización celular, llevando a transformación neoplásica. Existen otras vías que interrumpen la vía de p53: MDM2 y p14 regulan los niveles de p53 controlando su degradación. La proteína MDM2 produce ubiquitinización de p53 y p14 interfiere con su degradación. La sobreexpresión de la proteína MDM2 en gliomas disminuye la actividad de p53; la pérdida de p14 aumenta la degradación de p53 mediada por p14. p53 y HIF-1 α forman un complejo que estabiliza p53 y aumenta la transcripción de genes mediada por p53 en condiciones de hipoxia y con ello disminuye la actividad transcripcional de HIF-1, causando descenso de los niveles de proteína de HIF-1 α . p53 también promueve interacciones entre HIF-1 α y MDM2, lo que aumenta la ubiquitinización de HIF-1 α y con ello su degradación.
- El gen de VHL juega un papel preponderante en la regulación de HIF-1. La mayoría de los GBM no presentan mutaciones somáticas del gen supresor de tumor VHL, pero es plausible que se encuentren alteraciones de las vías de degradación de HIF-1 mediadas por VHL. Los tumores derivados de células con supresión de HIF-1 α presentan baja tasa de crecimiento in vivo e in vitro. HIF-1 α se expresa incluso en condiciones de normoxia en neoplasias de próstata, tumores escamosos, pulmón, mama, vejiga, neoplasias pancreáticas. La sobreexpresión de HIF-1 α se asocia con un tumor más agresivo, de mayor grado, más invasivo, resistente a RT, potencial metastásico y peor pronóstico. Así mismo, la expresión de anhidrasa carbónica IX y del transportador de glucosa-1 se correlaciona con pobre respuesta a tratamientos adyuvantes.

Las condiciones de hipoxia modulan las propiedades neoplásicas de estos tumores, más que la angiogénesis, tales como las propiedades invasivas de las células neoplásicas, su motilidad y permeabilidad de la membrana, lo cual depende del microambiente en el que se desarrollan estas células, tales como la matriz extracelular, temperatura, pO₂ y pH.

Con pH ácido las membranas de las células del glioma promueven la entrada de sodio por la activación de canales iónicos específicos. Estos cambios resultan en cambios estructurales que permiten a las células malignas cambiar su forma y volumen, aumentando sus propiedades invasivas.

Progresión de astrocitomas a glioblastomas. Regulación molecular

El paso de astrocitomas de bajo grado a astrocitomas anaplásicos (AA) y a GBM se asocia con un aumento sustancial en la tasa de crecimiento, agresividad tumoral y resistencia al tratamiento. El pronóstico empeora dramáticamente tras dicha progresión. Como ya se ha establecido, la hipoxia juega un papel principal en tal progresión. En GBM y astrocitomas anaplásicos se presentan áreas de tejido hipóxico, causando la activación de la subunidad HIF-1 por estabilización de la subunidad alfa, con sobreexpresión de HIF-1 α , GLUT-1 y Anhidrasa Carbónica IX (CA-IX); sin embargo, la expresión de estos genes se presenta también en astrocitomas de bajo grado.

La hipoxia puede ser el resultado de distancias de difusión incrementadas, flujo sanguíneo inadecuado, tasas de consumo de O₂ incrementadas o la combinación de cualquiera de estos factores. Se han encontrado áreas de hipoxia a distancias mayores a 60-80 μ m de los microvasos más cercanos; en varios de estos microvasos se encontraron además datos de trombosis intravascular. Mediante estudios de IRM se demostró relación directa entre proliferación tumoral y la severidad de hipoxia. Se sabe que a hipoxia inhibe el receptor mTOR (cinasa serina/treonina que regula la transcripción de proteínas integrando las señales de factores de crecimiento y disponibilidad de oxígeno) evitando la depleción metabólica de oxígeno hasta el punto de limitar la fosforilación oxidativa. En Glioblastomas este mecanismo está parcialmente abolido por acción de la vía de señalización IP3K-AKT, que regula la expresión de mTOR. Se ha establecido una relación directa entre la expresión de mTOR y la de HIF-1, sin establecer la presencia de esta relación en astrocitomas. Mayer, et al encontraron en una serie de 11 GBM y astrocitomas anaplásicos la expresión de HIF-1 α , GLUT-1 y CA-IX, todos próximos a áreas de necrosis o micronecrosis, sin embargo esta expresión no ocurrió de manera homogénea, siendo constante y estadísticamente significativo la expresión de GLUT-1 ya sea con HIF-1 α o con CA-IX; la expresión de estas moléculas no se relacionó directamente con el Ki67. Se midió además la actividad de mTOR, siendo esta mayor en GBM sobre AA sin encontrar significancia estadística. No hubo diferencias en la distancia

entre vasos y la expresión de receptores de hipoxia entre GBM y AA. Las áreas de mayor necrosis mostraron mayor presencia de marcador de proliferación celular Ki67 comparada con áreas sin necrosis. Aunque no se demostró diferencias estadísticamente significativas, en un metaanálisis por Dreyfuss, et al se demostró que la expresión de HIF-1 α es mayor en GBM comparado con AA.

La anhidrasa carbónica IX (CA-IX) cataliza la hidroxilación reversible de CO₂ a HCO₂, contribuyendo a la acidificación del microambiente extracelular tumoral., manteniendo con ello un pH normal en las células tumorales, esto permite a las células sobrevivir en un ambiente hipóxico y evita su proliferación lejos de los vasos sanguíneos. El bloqueo de CA-IX resulta en un aumento de la muerte celular bajo condiciones de hipoxia. La transcripción del gen de CA-IX es regulado por la proteína VHL, que participa en el complejo de ubiquitinización responsable de la proteólisis de HIF-1 α . Esta molécula se localiza cerca de áreas de necrosis preferentemente, aunque también se expresan en la ausencia de necrosis. En un análisis de 84 astrocitomas de diferentes grados (I a IV) realizado por Korkolopoulou, et al, se demostró que los niveles de CA-IX se incrementaban con los niveles de necrosis y con el grado de astrocitoma. VEGF y HIF-1 α mostraron un comportamiento similar al de CA-IX, sin embargo, estas dos moléculas presentaron inmunopositividad concurrente alrededor de estructuras vasculares glomerulares, y a mayores distancias de las que se encontraba CA-IX. La expresión de CA-IX no fue concurrente con la de VEGF y HIF-1 α . La correlación de estas últimas moléculas con Ki67 fue débil. El nivel de vascularización y la complejidad de los vasos sanguíneos aumentó con el grado de astrocitomas de manera significativa. En este mismo estudio se demostró que los factores que afectan supervivencia son: alto grado histológico, sexo masculino, edad avanzada, incremento en la expresión de HIF-1 α , VEGF y CA-IX, y la presencia de vasos de estructura glomerular, tanto para asrocitomas de bajo grado como de alto grado.

Otro gen involucrado en la regulación de HIF-1a a través de la expresión de elementos en respuesta a hipoxia (HRE) es el gen CXCR4. CXCR4 es un receptor de citocina del factor derivado de célula estroma 1 alfa (SDF-1), el cual se asocia con progresión tumoral y diseminación metastásica de diferentes neoplasias, entre ellas pulmón, páncreas y mama; así mismo se ha demostrado que CXCR4 forma parte importante en la invasión de gliomas. En 2006, Zagzag, et al., encontraron mediante

inmunohistoquímica, que CXCR4 se expresaba en las mismas áreas en las que había expresión de HIF-1 α en gliomas en las zonas en pseudopalizada alrededor de áreas de necrosis, acompañados de intensa angiogénesis, donde también se expresaba ésta molécula; estableciendo que la expresión de esta molécula es producto de la expresión de HIF-1 α y de la acción de VEGF, ambos inducidos por hipoxia y expresados en áreas de necrosis en zonas de pseudopalizada en gliomas. Los mismos autores demostraron que HIF-1 α aumenta la expresión de CXCR4, y que éste último estimula la motilidad celular para promover que las células se alejen de zonas con bajas concentraciones de oxígeno a zonas más ricas en oxígeno, favoreciendo con esto la migración celular y con ello aumentando el potencial invasor de glioblastomas.

Consecuencias clínicas de alteraciones moleculares

La supervivencia de los pacientes con astrocitomas es variable y no puede ser atribuido exclusivamente a diferencias histológicas o parámetros clínicos; por el contrario, las alteraciones genéticas tienen un importante valor pronóstico, sin embargo no existen modelos pronósticos que combinen diferentes características histológicas y alteraciones genéticas que sirva como modelo predictivo.

En un estudio en el que se analizaron alteraciones en los genes de EGFR, PTEN y p53 y cromosomas 7 y 10 por FISH, PCR de polimerasa de transcriptasa reversa y secuenciación de ADN en 174 pacientes (63 con astrocitoma anaplásico y 111 con GBM), se demostró que las mutaciones PTEN se asociaban con menor supervivencia en pacientes con astrocitoma anaplásico, mientras que la amplificación de EGFR se asoció con significativo aumento en la supervivencia en pacientes con GBM (21). La combinación de alteraciones en la vía del gen Rb y pérdida de PTEN y su influencia en el pronóstico de GBM fue estudiada en 129 pacientes, demostrando que los pacientes que presentaban alteraciones en la vía del gen Rb tenían menor supervivencia, que empeoraba si coexistían mutaciones o pérdida de PTEN (22). En una serie de 220 pacientes con GBM se demostró que la edad y el estado de funcionalidad son los principales predictores de desenlaces; varios marcadores moleculares fueron analizados, incluyendo pérdida de heterocigosidad en cromosomas 1p, 9p, 10q, amplificaciones de EGFR, alteraciones de la vía del gen Rb y expresión de p53, presentando limitado valor pronóstico. La relación

entre el pronóstico y alteraciones genéticas puede relacionarse con la edad como se demostró en una serie de 140 pacientes con GBM en los que la frecuencia de mutaciones en TP53, deleciones de CDKN2A, amplificación de EGFR, y pérdida del cromosoma 1p se relacionaron con la edad del paciente (23). Como ya se ha mencionado, la presencia de mutaciones de IDH1 es un factor predictor independiente, presentando desenlaces positivos en pacientes con astrocitomas anaplásicos.

B. Justificación

Los tumores gliales de alto grado se caracterizan por la presencia de altas tasas de mitosis; así mismo presentan una gran vascularización que se desarrolla alrededor de zonas de necrosis e hipoxia, caracterizadas por la expresión de HIF-1 que induce la expresión de VEGF, que se une al VEGFR y estimula la formación de nuevos vasos sanguíneos, confiriendo las características clásicas de estos tumores: masas muy vascularizadas con zonas de necrosis y alto poder replicativo, que por su cuenta hace a estos tumores resistentes a tratamiento y con un alto poder invasivo. Existen estudios sobre la expresión de estas moléculas de manera aislada en tumores de alto grado, todos con un pequeño número de casos analizados, sin embargo ninguno de ellos analiza la expresión de dichos factores en tumores de bajo grado, ni la influencia de estos en la progresión ni recidiva de astrocitomas y glioblastomas posterior al tratamiento. Es por esto que cobra importancia la determinación de la expresión de HIF-1 y VEGFR en tumores tanto de alto grado como de bajo grado, tanto como una herramienta de predicción de respuesta a tratamiento como predictor de progresión de la enfermedad.

III. Objetivos

A. Primario

Determinar si la expresión de VEGFR, HIF-1 y el nivel de Ki-67 impacta sobre el tiempo de supervivencia libre de progresión en astrocitomas de bajo y alto grado.

B. Secundarios

Comparar el grado de expresión de VEGFR y HIF-1 y el nivel de Ki-67 entre astrocitomas de bajo grado y de alto grado.

Comparar si el tratamiento con cirugía + QT, cirugía + RT o cirugía + QT + RT impacta sobre el tiempo de supervivencia libre de progresión.

IV. Hipótesis

La expresión de HIF-1 y VEGFR y el nivel de ki-67 en astrocitomas de bajo y alto grado determinan un menor tiempo de sobrevida libre de progresión y menor respuesta a tratamiento en astrocitomas de bajo y alto grado.

V. Diseño

Retrospectivo, observacional.

VI. Materiales y métodos

A. Universo del estudio

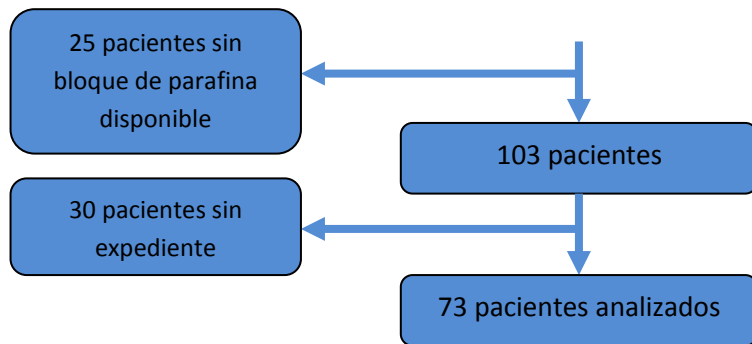
Pacientes con diagnóstico histológico de astrocitomas de bajo y alto grado en el Departamento de Patología del Hospital Médica Sur de enero de 2005 a diciembre de 2012.

Se verificó la existencia de bloques de parafina de los pacientes registrados; posteriormente se revisaron los expedientes de tales pacientes, identificando las variables demográficas, el tipo histológico, la localización del tumor, el tratamiento recibido posterior al quirúrgico (QT, RT), la presencia de progresión y el tiempo de esta; finalmente se realizó inmunohistoquímica de las muestras identificadas, determinando la expresión de PGFA, VEGFR, HIF-1 y el nivel de Ki-67.

B. Tamaño de la muestra

En total se incluyeron 128 pacientes, de los cuales se excluyeron 25 por no contar con bloques de parafina disponibles en el Departamento de Patología, quedando 103; de estos se excluyeron 30 pacientes que no contaban con expediente, quedando un total de 73 pacientes.

128 pacientes



C. Criterios de selección

1. Criterios de inclusión

Pacientes mayores de 18 años con diagnóstico histopatológico de astrocitoma grado I y II, astrocitoma anaplásico (grado III) o glioblastoma multiforme.

2. Criterios de exclusión

Pacientes menores de 18 años; pacientes con diagnóstico de tumores cerebrales diferentes a astrocitoma o glioblastoma; pacientes con diagnóstico de tumoraciones cerebrales de histología mixta.

3. Criterios de eliminación

Pacientes que cumplen criterios de inclusión, cuyos bloques de parafina no se encuentren disponibles en el Departamento de Patología del Hospital Médica Sur; pacientes sin expediente en el archivo clínico del Hospital Médica Sur; pacientes con datos incompletos en el expediente; pacientes con determinación de PGFA negativa.

D. Definición de variables

1. Dependientes

- HIF-1: Nominal.
 - o Positivo.- 2+ (10-50% con intensidad moderada e intensa); 3+ (>50% con intensidad moderada e intensa).
 - o Negativo.- 1+ (<10% con intensidad débil).
- VEGFR: Nominal.
 - o Positivo.- Expresión 2+ (10-50% con intensidad moderada e intensa); o 3+ (>50% con intensidad moderada e intensa).
 - o Negativo.- Expresión 1+ (<10% con intensidad débil).
- Ki-67: Nominal.

- Alto.- Nivel de Ki-67 de 31% a 100%.
- Bajo.- Nivel de Ki-67 de 0% a 30%.

2. Dependientes:

- Edad: Ordinal.
 - Años.
- Género: Nominal.
 - Mujer.
 - Hombre.
- Grado histológico: Nominal.
 - Bajo grado.- Astrocitomas grado I y II.
 - Alto grado.- Astrocitomas grado III y Glioblastoma mutiforme.
- Tipo de glioblastoma mutiforme: Nominal.
 - Primario.
 - Secundario.
- Localización: Nominal.
 - Frontal o Temporal.
 - No frontal o temporal.- Parietal, occipital, cerebeloso, no especificado.
- Tabaquismo: Nominal.
 - Si.
 - No.
- Tratamiento con Quimioterapia: Nominal.
 - Si.
 - No.
- Tratamiento con Radioterapia: Nominal.
 - Si.
 - No.
- Progresión: Nominal.
 - Si.
 - No.
- Tiempo de progresión: Ordinal.
 - Meses.
- Tratamiento no quirúrgico a la progresión: Nominal.
 - Si.

- No.
- Tratamiento quirúrgico a la progresión: Nominal.
 - Si.
 - No.
- PGFA. Nominal.
 - Positivo.- 2+ (10-50% con intensidad moderada e intensa); 3+ (>50% con intensidad moderada e intensa).
 - Negativo.- 1+ (<10% con intensidad débil).

E. Descripción de procedimientos:

- Planteamiento de pregunta de Investigación.
- Búsqueda bibliográfica de revisiones y trabajos originales publicados en relación a los siguientes temas: astrocitomas de bajo y alto grado, expresión de HIF-1, VEGFR y Ki-67, mecanismos moleculares en el desarrollo de astrocitomas; expresión de factores inducidos por hipoxia como predictores de respuesta a tratamiento e invasión.
- Redacción de marco teórico y de definiciones conceptuales y operativas.
- Construcción de hipótesis, establecimiento de objetivos primarios y secundarios, determinación de criterios de inclusión y exclusión.
- Elaboración de hoja de captura de datos.
- Determinación de existencia de bloques de parafina de pacientes identificados.
- Revisión de expediente físico de los 73 pacientes registrados en el archivo clínico del Hospital Médica Sur.
- Registro en la Hoja de Captura de Datos de la información a incluir.
- Determinación por inmunohistoquímica de PGFA para corroborar la histología de las muestras analizadas; posteriormente determinación de VEGFR, HIF-1 y Ki-67. El estudio inmunohistoquímico se inicia con la obtención de "cortes en blanco en el laboratorio de histología". Los cortes de 4 micras de espesor se colocan en laminillas electro-cargadas, las cuales se etiquetan adecuadamente de acuerdo con el anticuerpo que va ser utilizado; se dejan calentado en la estufa de secado a una temperatura de 60°C por 35 minutos. Una vez transcurrido el tiempo en la estufa de secado los cortes histológicos se desparafinan y rehidratan en baños de 5 minutos cada uno en el orden siguiente; xilol, etano absoluto, alcohol al 96% y agua destilada. Se dejan escurrir perfectamente y se acomodan en canastillas especiales; las laminillas son introducidas en un recipiente con una solución

especial llamada Declere (Buffer citratos), se introducen en una olla de presión, se cierra, se calienta en un horno microonda, cuando esta alcanza el máximo de presión comienza a silvar, en ese momento se toman 2 minutos para que se lleve a cabo la recuperación antigénica y pasando los 2 minutos se detiene el calentamiento. Se saca la olla de presión del horno microonda, se deja enfriar hasta que el botón amarillo de la olla de presión regrese a su posición normal, en ese momento se puede abrir la olla, se retira el recipiente con las laminillas se dejan enfriar a temperatura ambiente (se pueden utilizar hielos para bajar la temperatura), cuando se enfrían se dan dos lavados con agua destilada. Enseguida se acomodan las laminillas en un Rack especial, las laminillas con los tejidos problema se contraponen con laminillas blancas permitiendo que las macas con cruces situadas en la parte superior derecha de cada laminilla se queden una de cada lado, así aseguramos que la capilaridad se lleva a cabo en forma adecuada, enseguida se toma PBS 1X por capilaridad y posteriormente se retira el PBS 1X por absorción con sanitas, de aquí en adelante todos los lavados son con PBS 1X y de la misma manera se retira las soluciones por absorción con sanitas. Se continúa con el paso de bloqueo de sitios inespecíficos, se toma peróxido de hidrógeno (H_2O_2) al 3%, se incuba por 6 minutos se retira el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y se dan tres lavados con PBS 1X, se retira este y se adiciona el anticuerpo que previamente se preparó en la dilución correspondiente, el diluyente que se utiliza para el caso de anticuerpos con identificación nuclear es de la marca BIOSB con número de catálogo BSB 0041 y para el resto de los anticuerpos se utiliza el diluyente de la marca BIOSB con número de catálogo BSB 0105, es necesario aclarar que la dilución del anticuerpo primario es susceptible de ser modificado cada vez que se prepara una nueva alícuota del anticuerpo dependiendo del resultado del tejido control, así como cada vez que se tiene un vial nuevo o un cambio de clona de anticuerpo primario, por lo que se verifica la dilución en uso cada vez que va a ser empleado un anticuerpo. En todos los casos se titula previamente el anticuerpo en cuestión con el tejido adecuado. Los tejidos control se seleccionan dependiendo de las indicaciones de los fabricantes en la hoja técnica de cada anticuerpo. Una vez que se carga el anticuerpo se deja incubar con 55 minutos a temperatura ambiente, al término de la incubación se retira el anticuerpo por absorción con sanitas, se lava tres veces con PBS 1X se retira este, continúa el procedimiento a través del sistema de detención de la marca

BIOSB con número de catálogo BSB 0007, se incuba con Biotina durante 10 minutos, al terminar el tiempo de incubación se lava tres veces con PBS 1X, se incuba con Streptoavidina por 10 minutos al término del tiempo de incubación se lava con PBS 1X y se continua con el revelado de las muestras. Se adiciona una gota de Diaminobenzidina por cada mililitro de diluyente DAB que viene en el kit, el revelado se hace observando al microscopio de luz hasta que este completamente nítida la reacción que debe de tomar color café para todos los casos, se tiene que evitar la sobre exposición con diaminobenzidina ya que esto nos origina tinción de fondo, inmediatamente que se asegura la reacción este nítida se transfiere la laminilla agua normal y se repite el mismo proceso con todas las muestras. El proceso de contraste también se realiza de forma manual con hematoxilina sumergiendo las muestras durante 15 segundos inmediatamente se lava con agua normal y se vira la hematoxilina sumergiendo la canastilla en una solución de carbonato de litio, se enjugan en agua normal finalmente se deshidrata en baños consecutivos en el siguiente orden: alcohol al 96 °C, etanol absoluto y xilol por dos minutos cada uno, se montan con resina permanente para microscopía entallan y se montan con cubre objetos para ser examinados por el patólogo solicitante.

- Construcción de base de datos en Excel.
- Cálculo de promedios y desviaciones estándar de las distintas variables.
- Realización de pruebas de χ^2 para cada una de las variables, estableciendo como significancia estadística un valor de $p= 0.05$. Se realizó un análisis de subgrupos de los casos diagnosticados de 2005 a 2009, para eliminar el sesgo de tiempo desde el diagnóstico, considerando que el tiempo medio de progresión fue de 16.4 ± 17.9 meses, mediante prueba u de Mann-Whitney.
- Construcción de tablas descriptivas.
- Reporte de resultados en texto, tablas y gráficas.
- Análisis de resultados e información obtenida.
- Conclusiones.

F. Hoja de captura de datos

Biopsia

Género	
M	H

Edad:	
--------------	--

Expediente:

Año de Dx:	
-------------------	--

Histología:

Grado histológico:	
Bajo	Alto

Localización:

Tabaquismo:	
Si	No

QT	Si	No
¿Cuál?		

RT	
¿Cuánto?	

¿Progresión?	
Si	No

Tiempo de progresión:	
------------------------------	--

QT/RT a progresión	
Si	No

Cx a progresión	
Si	No

VEGF	
+	-

HIF-1	
+	-

Ki-67	
Alto	bajo

VII. Definiciones conceptuales

- Astrocitoma alto grado.- Incluye a los astrocitomas grado III y a los glioblastomas multiformes. Los astrocitomas grado III presentan celularidad elevada, atipia nuclear marcada e hiper cromasia, y mitosis, pero sin proliferación endotelial o necrosis. Los Glioblastomas multiformes o GBM, son densamente hiper celulares, pleomórficos con actividad mitótica elevada, y proliferación vascular, o necrosis, o ambos.
- Astrocitoma bajo grado.- Incluye los astrocitomas grados I y II. Son gliomas astrocíticos difusamente infiltrativos con celularidad aumentada y atipia, pero sin mitosis, proliferación endotelial o necrosis.
- Edad.- tiempo transcurrido a partir del nacimiento de un individuo, expresado en años.
- Género.- Rasgos genéticos de un individuo manifestado en variedades femenina y masculina.
- Glioblastoma multiforme primario.- GBM que surgen como tumoraciones de novo, comunes en pacientes adultos mayores
- Glioblastoma multiforme secundario.- GBM que evoluciona desde un tumor de bajo grado, típicamente en adultos jóvenes.
- Grado histológico.- También se llama diferenciación, se refiere a la semejanza o no que tienen las células del tumor con las células normales del mismo tipo de tejido.
- HIF-1.- Heterodímero compuesto de dos subunidades, la beta, común en todas las células y biológicamente inactiva, y la alfa, que se activa en condiciones de hipoxia y favorece la transcripción de proteínas para la proliferación celular.
- Ki-67.- Proteína nuclear que se asocia con y puede ser necesaria para la proliferación celular; se asocia con la transcripción del ARN ribosómico. La inactivación del antígeno Ki-67 conduce a la inhibición de la síntesis de ARN ribosómico. Es un marcador para la proliferación celular y está estrictamente

asociada con ésta. Durante la interfase, el antígeno Ki-67 se puede detectar exclusivamente dentro del núcleo de la célula, mientras que en la mitosis la mayor parte de la proteína se traslada a la superficie de los cromosomas. Está presente durante todas las fases activas del ciclo celular (G1, S, G2, y la mitosis), pero está ausente de las células en reposo. Ki-67 es un excelente marcador para determinar la fracción de crecimiento de una población celular dada.

- PGFA.- Proteína ácida fibrilar glial. Es una de las proteínas fibrosas que forman los filamentos intermedios del citoesqueleto intracelular, en particular de células gliales como los astrocitos y células de Schwann. Su función principal es proteger la rígida organización de la estructura tridimensional interna de los astrocitos del cerebro permitiéndoles sin embargo, considerable flexibilidad y curvatura. En ciertas células se encuentra estrechamente relacionada con filamentos de vimentina, desmina y periferina, los cuales están implicados en la estructura y función del citoesqueleto.
- Progresión.- Recidiva de la tumoración diagnosticada inicialmente, ya sea del mismo tipo histológico o de un grado más avanzado.
- Quimioterapia.- Es el tratamiento del cáncer con un medicamento antineoplásico o una combinación de dichas drogas en un régimen de tratamiento estándar. Los agentes de quimioterapia más comunes actúan destruyendo las células que se dividen rápidamente provocando esta enfermedad.
- Radioterapia.- Es una forma de tratamiento basado en el empleo de radiaciones ionizantes (rayos X o radiactividad, la que incluye los rayos gamma y las partículas alfa).
- Tabaquismo.- Consumo de tabaco de manera habitual.
- Tiempo de progresión.- Tiempo transcurrido desde la remisión de la enfermedad hasta la aparición de una nueva lesión, expresada en meses.
- Tumores frontales.- Los localizados en el lóbulo frontal del cerebro, derecho o izquierdo.

- Tumores no frontales ni temporales.- Los localizados ya sea en el lóbulo parietal u occipital del cerebro, derecho o izquierdo, o los localizados en el cerebelo.
- Tumores temporales.- Los localizados en el lóbulo temporal del cerebro, derecho o izquierdo.
- VEGFR.- Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), que es es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis y en la angiogénesis. Promueve angiogénesis en los procesos de inflamación crónica, cicatrización y en tumores. Los miembros de la familia VEGF realizan su función en las células diana a través de tres receptores con actividad tirosina kinasa intrínseca: VEGFR-1, VEGFR-2 y VEGFR-3, localizados en células endoteliales y en otros tipos celulares. El más importante en angiogénesis es VEGFR-2.

VIII. Resultados

Tabla1. Características basales de la población	
Género	Hombres: 42 (57.5%) Mujeres: 31 (42.5%)
Edad	51.5 ± 15.2 a
Grado histológico	Alto: 54 (73.9%) - Astrocitoma grado III: 12 (16.5%) - GBM primario: 36 (49.3%) - GBM secundario: 6 (8.2%) Bajo: 19 (26.1%) - Astrocitoma grado I: 3 (4.1%) - Astrocitoma grado II: 16 (21.9%)
Localización	Frontales: 25 (34.2%) Temporales: 24 (32.9%) Parietales: 10 (13.7%) Occipitales: 3 (4.1%) Cerebelosos: 3 (4.1%) No especifica: 8 (10.9%)
Tabaquismo	Si: 13 (17.8%) No: 60 (82.2%)
Tratamiento	QT: 2 (2.7%) RT: 10 (13.7%) QT + RT: 24 (32.9%) Cirugía sola: 37 (50.7%)
PGFA+	73 (100%) - 2+: 12 (16.4%) - 3+: 61 (83.6%)
VEGFR +	65 (89%)
HIF-1 +	71 (97.3%)
Ki-67	Alto: 60 (82.2%) Bajo: 13 (17.8%)
Progresión	28 (38.3%) - Tiempo medio de progresión: 16.4 ± 17.9 meses
QT/RT a progresión	18 (64.3%) - QT/RT sola: 4 (14.3%) - QT/RT + cirugía: 14 (50%)
Cirugía a progresión	24 (85.7%) - Cirugía sola: 10 (13.7%)

QT: Quimioterapia

RT: Radioterapia

GBM: Glioblastoma multiforme

PGFA: Proteína ácida glial fibrilar

VEGFR: Receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular

HIF-1: Factor inducido por hipoxia 1

De un total de 73 pacientes que cumplieron con los criterios de inclusión y de los cuáles se realizó inmunohistoquímica de las tres variables independientes (HIF-1, VEGFR y Ki-67; ver tabla 1), la mayoría eran hombres (57.7%), con una edad media de 51.5 ± 15.2 a; predominantemente se trataba de tumores de grado histológico alto (73.9%), de los cuáles 42 (57.5%) eran GBM (36 primarios y 6 secundarios). La mayoría de los tumores se localizaron en región frontal (34.2%) o temporal (32.9%), representando entre ellos un total de 67.1% de los pacientes analizados. 8 de los tumores analizados (10.9%) eran extensos y no tenían una localización especificada. Solo una pequeña cantidad de los pacientes eran fumadores (17.8%). En cuanto al tratamiento, todos los pacientes recibieron manejo quirúrgico, y fue en el tratamiento adyuvante en el que se encontraron diferencias: 50.7% no recibieron tratamiento adyuvante, 32.9% recibieron tratamiento combinado de QT + RT, 13.7% recibieron RT sola, y solo 2.7% de los pacientes recibieron QT sola. Del total de pacientes analizados, 28 presentaron progresión (38.3%), con un tiempo medio de progresión de 16.4 ± 17.9 meses; de los pacientes que presentaron progresión, 85.7% fueron intervenidos por segunda ocasión, y 64.3% recibieron ya sea QT o RT como segunda línea (Cirugía sola 13.7%; QT/RT sola 14.3%; QT/RT + cirugía 50%). El 100% de los casos tuvieron inmunohistoquímica positiva para PGFA, corroborando que el 100% de los casos se trataban de astrocitomas.

Cuando se realizó la determinación de VEGFR, se encontró que 65 pacientes (89%) fueron positivos para la expresión de dicha molécula, mientras que 8 casos (11%) fueron negativos (Tabla 2). El 56.9% de los pacientes eran hombres, con una edad media de 52.1 ± 15.4 años, la mayoría de los tumores eran de grado histológico alto en ambos grupos (75.4% para el grupo VEGFR+, 62.5% para el grupo de VEGFR-), de estos, 87.2% en el grupo de VEGFR+ y 66.7% en el grupo de VEGFR- eran GBM primarios. La localización más frecuente fue frontal y temporal, representando un 67.7% de los pacientes en el grupo de VEGFR+ y 62.5% en el grupo de VEGFR-. Solo 20 pacientes del grupo que expresaron VEGFR+ fumaban, mientras que el tabaquismo fue negativo en 100% de los pacientes con VEGFR-. En ninguno de estos grupos se presentaron diferencias estadísticamente significativas. 33.6% del grupo VEGFR+ y 50% del grupo VEGFR- recibieron tratamiento con QT posterior a la cirugía; de la misma manera 44.3% y 62.5% respectivamente recibieron tratamiento con RT. En cuanto a la progresión, tampoco se presentaron diferencias estadísticamente significativas, con 36.9% de los casos progresando en el grupo de VEGFR+, contra 50% de los casos en el grupo de

VEGF-. Tampoco hubo diferencias en el tiempo de progresión (7.1 ± 14.4 meses vs 13.2 ± 17.9 meses). En cuanto a la coexpresión de los diferentes marcadores, solo se presentó diferencia significativa a favor de la coexpresión de VEGFR y HIF-1 ($p=0.01$; OR 0,75, IC 0.5-1.1).

Tabla 2. Desenlaces primarios y secundarios en tumores que expresaron VEGFR				
Variable	VEGFR + (n=65)	VEGFR - (n=8)	Valor de p	OR (IC 95%)
Edad	52.1 \pm 15.4	46.7 \pm 13.7	0.35	
Hombre	37 (56.9%)	5 (62.5%)	1.00	1.09 (IC 0.61-1.95)
Alto grado	49 (75.4%)	5 (62.5%)	0.42	0.82 (IC 0.47-1.44)
GBM primario*	34 (87.2%)	2 (66.7%)	0.37	
Frontales/Temporales	44 (67.7%)	5 (62.5%)	1.00	
Tabaquismo	13 (20%)	0	0.33	1.25 (IC 1.10-1.41)
QT	22 (33.6%)	4 (50%)	0.44	1.47 (IC 0.68-3.19)
RT	29 (44.6%)	5 (62.5%)	0.46	1.40 (IC 0.76-2.55)
Progresión	24 (36.9%)	4 (50%)	0.47	1.35 (IC 0.63-2.90)
Tiempo de progresión+	7.1 \pm 14.4	13.2 \pm 17.9	0.69	
QT/RT a la progresión+	15 (62.5%)	3 (75%)	1.00	1.20 (IC 0.63-2.28)
Cx a la progresión	21 (87.5%)	3 (75%)	0.48	0.85 (IC 0.47-1.54)
PGFA 3+	53 (81.5%)	8 (100%)	0.33	1.22 (IC 1.09-1.37)
HIF-1+	65 (100%)	6 (75%)	0.01	0.75 (IC 0.50-1.11)
Ki-67 alto	55 (84.6%)	5 (62.5%)	0.14	0.73 (IC 0.42-1.27)

*Solo se cuentan GBM (VEGFR + n= 39; VEGFR - n=3)

+Solo se cuentan los que progresaron (VEGFR + n= 24; VEGFR - n=4)

En cuanto a la expresión de HIF-1, la mayoría de los pacientes en ambos grupos eran hombres (57.8% en el grupo de HIF-1+ y 50% en el grupo de HIF-1-), con una edad media de 51.3 ± 15.2 y 58.5 ± 21.9 años, respectivamente, sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Todos los tumores que fueron HIF-1 negativo eran de bajo grado, mientras que el 76.1% de los tumores HIF-1 positivo eran de alto grado, de los cuáles 36 (85.7%) eran GBM primarios. En este grupo los más frecuentes también fueron los tumores de localización frontal y temporal, representando un 67.6% de los pacientes. Solo el 18.3% de los casos en el grupo de HIF-1 fumaban, mientras que en el grupo que no expresaron HIF-1 ninguno de los pacientes fumaban. Los casos que fueron negativos

para expresión de HIF-1 no recibieron ningún tipo de tratamiento posterior a la cirugía; de los casos positivos para expresión de HIF-1 36.6% recibieron QT y 47.9% recibieron RT, sin que se demostrara significancia estadísticas entre estos grupos. 27 casos (38%) progresaron en el grupo de HIF-1+, con un tiempo medio de progresión de 7.8 ± 14.9 meses, mientras que solo 1 caso del grupo de HIF-1- (50%) progresó, sin que se demostraran diferencias significativas entre ambos grupos. Las únicas diferencias significativas se dieron con la co-expresión de VEGFR y Ki-67; en ambos casos cuando HIF-1 era negativo, tampoco se expresaba VEGFR y el ki-67 era bajo; de los casos en los que HIF-1 era positivo, 91.5% co-expresaban además VEGFR y 84.5% tenían un Ki-67 alto, presentando significancia estadística ($p=0.01$ y $p=0.03$, respectivamente).

Tabla 3. Desenlaces primarios y secundarios en tumores que expresaron HIF-1				
Variable	HIF-1 + (n=71)	HIF-1 - (n=2)	Valor de p	OR (IC 95%)
Edad	51.3 \pm 15.2	58.5 \pm 21.9	0.51	
Hombre	41 (57.8%)	1 (50%)	1.00	0.86 (IC 0.21-3.51)
Alto grado	54 (76.1%)	0	0.06	
GBM primario*	36 (85.7%)	0	1.00	
Frontales/Temporales	48 (67.6%)	1 (50%)	1.00	
Tabaquismo	13 (18.3%)	0	1.00	
QT	26 (36.6%)	0	0.53	
RT	34 (47.9%)	0	0.49	
Progresión	27 (38%)	1 (50%)	1.00	1.31 (IC 0.31-5.42)
Tiempo de progresión+	7.8 \pm 14.9	7 \pm 0	0.60	
QT/RT a la progresión+	18 (66.7%)	0	0.35	
Cx a la progresión	23 (85.2%)	1 (100%)	1.00	1.17 (IC 1.00-1.37)
PGFA 3+	59 (83.1%)	2 (100%)	1.00	1.20 (IC 1.08-1.33)
VEGFR+	65 (91.5%)	0	0.01	
Ki-67 alto	60 (84.5%)	0	0.03	

*Solo se cuentan GBM (HIF-1 + n= 42; HIF-1 - n=0)

+Solo se cuentan los que progresaron (HIF-1 + n= 27; HIF-1 - n=1)

Tabla 4. Desenlaces primarios y secundarios en tumores que expresaron Ki-67				
Variable	Ki-67 alto (n=60)	Ki-67 bajo (n=13)	Valor de p	OR (IC 95%)
Edad	51.8 ± 15.1	50 ± 16.3	0.69	
Hombre	36 (60%)	6 (42.2%)	0.37	0.76 (IC 0.41-1.43)
Alto grado	50 (83.3%)	4 (30.8%)	0.0004	0.36 (IC 0.16-0.84)
GBM primario*	36 (85.7%)	0	1.00	
Frontales/Temporales	39 (65%)	10 (76.9%)	0.52	
Tabaquismo	11 (18.3%)	2 (15.4%)	1.00	0.83 (IC 0.21-3.34)
QT	23 (38.3%)	3 (23.1%)	0.35	0.60 (IC 0.21-1.70)
RT	29 (48.3%)	5 (38.5%)	0.55	0.79 (IC 0.38-1.66)
Progresión	22 (36.7%)	6 (46.2%)	0.54	1.25 (IC 0.64-2.47)
Tiempo de progresión+	7.6 ± 15.5	8.4 ± 11.8	0.87	
QT/RT a la progresión+	17 (77.3%)	1 (16.7%)	0.01	0.21 (IC 0.03-1.30)
Cx a la progresión	18 (81.8%)	6 (100%)	0.54	1.22 (IC 1.00-1.48)
PGFA 3+	52 (86.7%)	9 (62.2%)	0.20	0.79 (IC 0.54-1.16)
VEGFR+	55 (91.7%)	10 (76.9%)	0.14	0.83 (IC 0.61-1.14)
HIF-1+	60 (100%)	11 (84.6%)	0.03	0.84 (IC 0.67-1.06)

*Solo se cuentan GBM (ki-67 alto n= 42; ki-67 bajo n=0)

+Solo se cuentan los que progresaron (ki-67 alto n= 22; ki-67 bajo n=6)

Cuando se realizó el análisis del nivel de expresión de Ki-67, se encontró que la edad media en los casos con Ki-67 alto era de 51.8 ± 15.1 años, mientras que en el grupo de Ki-67 bajo fue de 50 ± 16.3 años. En el primer grupo, la mayoría de los pacientes eran hombres (60%), con tumores de grado histológico alto (83.3%, principalmente GBM primario con 85.7% de los casos), de localización frontal o temporal (65%); en este grupo solo 18.3% de los casos tenían tabaquismo positivo. En el caso en el que los astrocitomas expresaban Ki-67 bajo, la mayoría eran mujeres (53.8%), principalmente de localización frontal o temporal (76.9%), la mayoría con tabaquismo negativo; la mayor parte de los tumores que tenían un nivel bajo de Ki-67 eran astrocitomas de bajo grado (solo 30.8% eran de alto grado), presentando una diferencia estadísticamente significativa cuando se comparaba con los tumores de alto grado con Ki-67 alto (p=0.0004; OR 0.36, IC 0.16-0.84). 38.3% de los pacientes con Ki-67 alto y solo 3 casos (23.1%) de los pacientes con Ki-67 bajo recibieron QT, mientras que los pacientes que recibieron RT en cada uno de estos grupos representaron el 48.3% y 38.5% respectivamente. Solo 22 casos con Ki-67 alto (36.7%) presentaron progresión, con una supervivencia libre de progresión de 7.6 ± 15.5,

mientras que 6 casos (46.2%) de los tumores con Ki-67 bajo progresaron, con tiempo de progresión medio de 8.4 ± 11.8 ; no hubo diferencias significativas de estas características entre ambos grupos. Al analizar la co-expresión de los otros marcadores analizados, la única diferencia significativa se demostró en la expresión de HIF-1, donde 100% de los tumores con Ki-67 alto expresaban dicha molécula, mostrando una diferencia significativa al compararlo con los que tenían Ki-67 bajo, que fueron 84.6% ($p=0.03$; OR 0.84, IC 0.67-1.06). No hubo diferencias significativas en la expresión de VEGFR (91.7% vs 76.9%; $p=0.14$).

Se realizó un análisis de subgrupos con prueba U de Mann-Whitney incluyendo solo los casos registrados de enero de 2005 a diciembre de 2009, para establecer la relación entre cada una de las variables independientes (Ki-67, VEGFR y HIF-1) y el desenlace primario, donde no se encontró significancia estadística entre los grupos, considerando ésta como un valor < 0.05 (Tabla 5).

Tabla 5. Resultados de prueba de Mann-Whitney para variables independientes y desenlace primario	
Variable	Significancia
VEGFR+	1.000
HIF-1+	1.000
Ki-67 alto	1.000

Al realizar el análisis de desenlaces secundarios, comparando tres diferentes modalidades de tratamiento (Cirugía sola vs Cirugía + QT; Cirugía sola vs Cirugía + RT; Cirugía sola vs Cirugía + QT + RT; Cirugía + QT vs Cirugía + RT; Cirugía + QT vs Cirugía + QT + RT; Cirugía + RT vs Cirugía + QT + RT), no se encontraron diferencias significativas en cuanto a edad, género o grado histológico (Tabla 6). Tampoco hubo diferencias entre ninguno de los grupos comparados. Tampoco se encontró diferencia estadísticamente significativa en cuanto al tiempo de progresión. La progresión fue mayor cuando se comparó el tratamiento combinado de Cirugía + RT contra Cirugía sola ($p=0.001$), así como al comparar Cirugía + QT + RT contra Cirugía sola ($p=0.0001$); no se encontraron diferencias al comparar las otras modalidades de tratamiento. Los pacientes que recibieron tratamiento inicial solo con Cirugía y los que recibieron inicialmente Cirugía

+ RT, recibieron tratamiento combinado con Cirugía + QT + RT al progresar, comparado con los que recibieron tratamiento combinado desde el inicio, con diferencias estadísticamente significativas ($p=0.003$ y $p=0.0001$, respectivamente).

Tabla 6. Comparación de diferentes modalidades de tratamiento y desenlaces secundarios																								
Variable	Cx sola	vs	Cx + QT	p	Cx sola	vs	Cx + RT	p	Cx sola	vs	Cx + QT + RT	p	Cx + QT	vs	Cx + QT + RT	p	Cx + RT	vs	Cx + QT + RT	p				
	n=37		n=2		n=37		n=10		(n=37)		(n=24)		(n=2)		(n=10)		(n=2)		(n=10)		(n=24)			
Edad	52.2 ± 15.3		51.2 ± 21.9	0.92	52.2 ± 15.3		50.8 ± 15.3	0.79	52.2 ± 15.3		51.5 ± 15.2	0.86	51.2 ± 21.9		50.8 ± 15.3	0.97	51.2 ± 21.9		51.5 ± 15.2	0.97	50.8 ± 15.3		51.5 ± 15.2	0.90
Hombre	19 51.4%		1 50%	1.00	19 51.4%		5 50%	1.00	19 51.4%		17 70.8%	0.18	1 50%		5 50%	1.00	1 50%		17 70.8%	0.52	5 50%		17 70.8%	0.27
Alto grado	25 67.6%		2 100%	1.00	25 67.6%		7 70%	1.00	25 67.6%		20 83.3%	0.23	2 100%		7 70%	1.00	2 100%		20 83.3%	1.00	7 70%		20 83.3%	0.39
Progresión	3 8.1%		1 50%	0.19	3 8.1%		6 60%	0.001	3 8.1%		18 75%	0.0001	1 50%		6 60%	1.00	1 50%		18 75%	0.47	6 60%		18 75%	0.43
Tiempo de progresión +	10.4 ± 7.7		12 ± 0	-	10.4 ± 7.7		19.9 ± 21.2	0.48	10.4 ± 7.7		12.5 ± 25.7	0.89	12 ± 0		19.9 ± 21.2	-	12 ± 0		12.5 ± 25.7	-	19.9 ± 21.2		2.5 ± 25.7	0.53
QT/RT a la progresión +	0		1 100%	0.25	0		0	1.00	0		17 94.4%	0.003	1 100%		0	0.14	1 100%		17 94.4%	1.00	0		17 94.4%	0.0001
Cx a la progresión +	3 100%		1 100%	1.00	3 100%		6 100%	1.00	3 100%		14 77.8%	1.00	1 100%		6 100%	1.00	1 100%		14 77.8%	1.00	6 100%		14 77.8%	0.53

+Solo se cuentan los que progresaron

Cx: Cirugía

QT: Quimioterapia

RT: Radioterapia

IX. Conclusiones:

Los astrocitomas son los tumores más frecuentes del SNC, que se caracterizan por un alto poder invasivo que tiene la peculiaridad de aumentar conforme aumenta el grado histológico, debido a su grado de vascularización y el número de mitosis, aumentando de manera proporcional su poder invasivo y comportamiento agresivo. La activación de la vía de HIF-1 es una característica común en estos tumores; la activación de esta molécula lleva a la activación de muchos otros factores que favorecen el crecimiento y mayor vascularización tumoral, entre ellos y siendo lo más sobresalientes VEGF, metaloproteinasas de la matriz y factores transformadores del crecimiento. El nivel de Ki-67 nos habla del poder mitótico de la masa tumoral, siendo mucho más agresivo y de crecimiento más rápido cuanto mayor sea el porcentaje de Ki-67 que presente. Así mismo la expresión del gen HIF-1 se relaciona de manera directa y es modulado por alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores, que se presentan durante el desarrollo y génesis de astrocitomas, incluyendo PTEN, P53, p16, EGFR y PDGFR.

El objetivo primario de este trabajo era identificar si la expresión de VEGFR y HIF-1 y un nivel alto de Ki-67 eran determinantes en la progresión de estos tumores, incidiendo en la supervivencia libre de progresión (SVLP). al realizar el análisis de cada una de estas moléculas no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la SVLP, revocando la hipótesis inicialmente planteadas, sin embargo es importante hacer notar que solo 28 de los casos analizados (38.3%) progresaron, quedando una muestra muy pequeña que pudo influir en que no se alcanzara una significancia estadística. Es importante hacer ciertos puntos: cuando se analizó el tiempo de progresión en los casos de HIF-1 y Ki-67, los tiempos fueron muy similares en ambos grupos, solo en los pacientes que no expresaron VEGFR el tiempo para que el tumor progresara fue mayor (13.2 vs 7.1), sin que esta diferencia fuera significativa. Una explicación de la falta de significancia es que la SVLP media de todos los pacientes analizados fue de 16.4 ± 17.9 meses, es por esto que se decidió hacer un subanálisis tomando en cuenta solo los pacientes diagnosticados entre 2005 y 2009, teniendo en cuenta que son los pacientes que se encontraban dentro del periodo promedio para presentar progresión; sin embargo, al momento de realizar este subanálisis tampoco se encontraron diferencias significativas. Posteriormente y debido a la amplia dispersión de los datos, se realizó una prueba u de Mann-Whitney para estos últimos grupos descritos, sin que se encontrara de esta manera

alguna diferencia estadística. De esta manera determinamos que, por lo datos obtenidos y con el tamaño de la muestra en el presente estudio, el que un astrocitoma exprese HIF-1 o VEGFR o tenga un Ki-67 alto no incide sobre el tiempo medio de SVLP, de acuerdo a lo demostrado en este estudio.

Es de llamar la atención que aunque la mayoría de los tumores que expresaban VEGFR+ eran tumores de alto grado, también la mayoría de los de bajo grado expresaron VEGFR-, por lo tanto no se encontró una diferencia significativa en cuanto a la expresión de esta molécula, esto es, la expresión de VEGFR es similar entre tumores de alto grado y tumores de bajo grado. Por otro lado, se encontró significancia estadística en el nivel de Ki-67 entre tumores de alto grado y bajo grado, donde los tumores con Ki-67 alto eran predominantemente de alto grado, es decir, los astrocitomas de alto grado presentan un alto nivel mitótico, aumentando su poder replicativo e invasor, reforzando los conocimientos previos de estos tumores. Una situación similar sucede con la expresión de HIF-1, donde sólo los astrocitomas de alto grado expresaban HIF-1+, mientras que todos los tumores HIF-1- eran astrocitomas de bajo grado, sin embargo, esta diferencia no fue estadísticamente significativa ($p=0.06$), probablemente por el tamaño de la muestra. Cabe señalar que todos los casos con expresión de VEGFR, co-expresaban además HIF-1, siendo esta diferencia significativa, tal como sucedió con la co-expresión de HIF-1 y VEGFR y de HIF-1 con un nivel alto de Ki-67, también con significancia estadística. Concluyendo de esta manera que los astrocitomas de alto grado co-expresan VEGFR y HIF-1 con un Ki-67 alto, que se traduce en la génesis de tumores altamente vascularizados, con alto poder replicativo, tal como se ha establecido en estudios previos, sin que esta relación pueda ser establecida para tumores de bajo grado. Por otro lado, los tumores con VEGFR+ no se relacionaban con el nivel de Ki-67.

Al momento de analizar la respuesta a las diferentes modalidades de tratamiento se estableció la superioridad del tratamiento con Cirugía sola al compararla al tratamiento combinado con RT o con RT y QT, pues los pacientes que recibían solo cirugía progresaban menos de lo que lo hacían los pacientes que recibían alguna otra modalidad de tratamiento; en el caso de los pacientes que recibieron cirugía + QT, no se demostró significancia estadística entre los grupos, sin embargo, la cantidad de pacientes que recibieron este último tratamiento fue muy pequeña, con lo que no se pudo encontrar algún tipo de diferencia significativa. De esta manera podemos establecer que el

tratamiento solo con cirugía es superior al tratamiento combinado para evitar la progresión de estas tumoraciones, sin embargo no influye en el tiempo de supervivencia libre de progresión. Y fueron estos pacientes los que al momento de la progresión, recibían nuevamente tratamiento combinado.

Existen varias limitaciones en este estudio, siendo la principal el pequeño tamaño de la muestra. Otro dato que debemos tomar en cuenta es la imposibilidad para evaluar mortalidad y respuesta a segundas líneas de tratamiento, pues los registros de este desenlace son incompletos en los expedientes.

Mediante este estudio logramos corroborar datos relacionados con las características diferenciales entre astrocitomas de bajo y alto grado, sin embargo, no se pudo establecer la relación entre la expresión de estas moléculas y el tiempo de progresión.

X. Consideraciones éticas

- Título segundo, capítulo I, Artículo 17, Sección I, investigación sin riesgo, no requiere consentimiento informado.

XI. Referencias

1. Louis DN. Molecular pathology of malignant gliomas. *Annu Rev Pathol* 2006; 1:97.
2. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. *Classification of Tumours of the Nervous System*, IARC Press, Lyon, France 2007.
3. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol* 2010; 9:717.
4. Hartmann C, Hentschel B, Wick W, et al. Patients with IDH1 wild type anaplastic astrocytomas exhibit worse prognosis than IDH1-mutated glioblastomas, and IDH1 mutation status accounts for the unfavorable prognostic effect of higher age: implications for classification of gliomas. *Acta Neuropathol* 2010; 120:707.
5. Kozak KR, Mahadevan A, Moody JS. Adult gliosarcoma: epidemiology, natural history, and factors associated with outcome. *Neuro Oncol* 2009; 11:183
6. Louis DN, Pomeroy SL, Cairncross JG. Focus on central nervous system neoplasia. *Cancer Cell* 2002; 1:125.
7. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; 27:5743.
8. James CD, Louis DN, Cavenee WK. Molecular biology of central nervous system tumors. In: *Cancer: Principles and Practice of Oncology*, 8th, DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA (Eds), Lippincott-Raven, Philadelphia 2008.
9. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* 2004; 432:396.
10. Yan H, Parsons DW, Jin G, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009; 360:765.
11. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, et al. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a prospective translational study of the German Glioma Network. *J Clin Oncol* 2009; 27:5743.

12. Brat DJ, Mapstone TB. Malignant glioma physiology: cellular response to hypoxia and its role in tumor progression. *Ann Intern Med* 2003; 138:659.
13. Brat DJ, Van Meir EG. Vaso-occlusive and prothrombotic mechanisms associated with tumor hypoxia, necrosis, and accelerated growth in glioblastoma. *Lab Invest* 2004; 84:397.
14. Brat DJ, Castellano-Sanchez AA, Hunter SB, et al. Pseudopalisades in glioblastoma are hypoxic, express extracellular matrix proteases, and are formed by an actively migrating cell population. *Cancer Res* 2004; 64:920.
15. Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ. Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2001; 11:293.
16. Jansen M, Yip S, Louis DN. Molecular pathology in adult gliomas: diagnostic, prognostic, and predictive markers. *Lancet Neurol* 2010; 9:717.
17. Zhao S, Lin Y, Xu W, et al. Glioma-derived mutations in IDH1 dominantly inhibit IDH1 catalytic activity and induce HIF-1alpha. *Science* 2009; 324:261.
18. Dang L, White DW, Gross S, et al. Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009; 462:739.
19. Ueki K, Ono Y, Henson JW, et al. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 1996; 56:150.
20. Fujisawa H, Kurrer M, Reis RM, et al. Acquisition of the glioblastoma phenotype during astrocytoma progression is associated with loss of heterozygosity on 10q25-qter. *Am J Pathol* 1999; 155:387.
21. Houillier C, Lejeune J, Benouaich-Amiel A, et al. Prognostic impact of molecular markers in a series of 220 primary glioblastomas. *Cancer* 2006; 106:2218.
22. Bäcklund LM, Nilsson BR, Goike HM, et al. Short postoperative survival for glioblastoma patients with a dysfunctional Rb1 pathway in combination with no wild-type PTEN. *Clin Cancer Res* 2003; 9:4151.
23. Batchelor TT, Betensky RA, Esposito JM, et al. Age-dependent prognostic effects of genetic alterations in glioblastoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10:228.