



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"

I.S.S.S.T.E

Valor pronóstico de la expresión de p53 y EGFR en astrocitomas de alto grado detectada mediante técnicas de inmunohistoquímica.

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

ESPECIALISTA EN ANATOMÍA PATOLÓGICA

PRESENTA:

DRA. MARGARITA ELIGIO ÁNGELES

ASESOR: DR. AURELIANO MAURICIO PLÁCIDO MÉNDEZ



MÉXICO, D.F.

ENERO 2014



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.

*A mi madre y a mi padre.
Por ser el principal motivo y motor de mí ser. Gracias por dejar su vida en la mía.*

*A Fernanda y David.
Mis sobrinos, hijos, hermanos, amigos. Por alegrar mis días y enseñarme tanto.*

*A mis hermanos Gregorio, Eduardo y Silvia.
Por su guía, ejemplo y apoyo.*

*A Hugo Galván Díaz †.
Cuya sonrisa y alegría por la vida tengo siempre en mi mente.*

*A Alejandro Tovar Gil.
Por darle fondo musical a mis años de residencia, por su amistad, comprensión y
paciencia.*

*“Croyez ceux qui cherchent la vérité, doutez de ceux qui la trouvent”.
André Gide.*

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Plácido por ser mi principal guía en el mundo de la patología. Gracias por su disposición, por compartir su conocimiento, por el tiempo dedicado a la realización de este trabajo y sobre todo gracias por su amistad.

A la Dra. Gorráez y a cada uno de los adscritos del servicio de anatomía patológica del CMN 20 de Noviembre por sus enseñanzas y por permitirme ser parte de su familia durante 3 años.

A mis compañeros residentes, en especial al Dr. Conde y la Dra. Ánimas por ser los mejores compañeros y amigos de generación que pude haber tenido y a la Dra. Ordoñez por su amistad, apoyo y ayuda.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina siempre orgullosa de pertenecer a ellas.

ÍNDICE

Resumen	1
Introducción	2
Objetivos	6
Justificación	7
Hipótesis	7
Materiales	8
Método	9
Resultados	14
Discusión	17
Conclusión	19
Apéndice	20
Bibliografía	23

RESUMEN

Antecedentes: Los tumores gliales constituyen la neoplasia maligna primaria más frecuente del sistema nervioso central. En nuestro hospital constituyen el segundo grupo de neoplasias intracraneales más frecuentemente atendidas. Durante las últimas tres décadas las mejoras en las técnicas de neuroimagen han facilitado su diagnóstico, provocando un aumento en su detección. Sin embargo, a pesar del avance científico el pronóstico de estas neoplasias no ha cambiado.

Diversos estudios enfocados en la identificación de factores pronósticos, han confirmado la presencia significativa de heterogeneidad genética. Es probable que estas alteraciones genéticas, por lo menos parcialmente, den cuenta de las diferencias observadas en el tiempo de supervivencia de estos pacientes. Las alteraciones genéticas más comúnmente identificadas incluyen mutaciones en el gen p53 y la amplificación y reordenamiento del gen del Receptor de Factor de Crecimiento Epidérmico (EGFR). Se cuenta con evidencia experimental que sostiene que la presencia de estas alteraciones da lugar a un pronóstico menos favorable, sin embargo, los estudios clínicos internacionales no son concluyentes y en México no se han realizado estudios que permitan evidenciar la presencia de dichas alteraciones genéticas en nuestra población y por ende se desconoce también su relación con la supervivencia en estos pacientes.

Objetivo: Determinar la prevalencia y relación pronóstica de la sobreexpresión de p53 y EGFR detectada con técnica de inmunohistoquímica, en pacientes con astrocitoma de alto grado atendidos en el servicio de Neurocirugía y de Anatomía Patológica del C.M.N. "20 de Noviembre" en el período comprendido entre enero del 2007 y diciembre del 2011.

Diseño del estudio: Se realizó un estudio descriptivo, observacional, transversal y retrolectivo.

Material y métodos: Se analizaron 48 biopsias de pacientes con diagnóstico histológico de astrocitoma de alto grado a las cuales se les realizó inmunohistoquímica con p53 y EGFR. Se evaluó la presencia o ausencia de sobreexpresión de dichos marcadores y se correlacionó el resultado con el tiempo de sobrevida.

Resultados: La prevalencia de sobreexpresión de p53 en biopsias de pacientes con astrocitomas de alto grado fue de 73% (n=35), el 2% (n=1) presentó inmunorreacción negativa, y el resto de casos 26% (n=12) presentó inmunorreacción positiva pero no suficiente para considerarse como sobreexpresión. La sobrevida promedio fue de 69.4 semanas, con un mínimo de 6 semanas y un máximo de 273 semanas. El pico máximo de muerte se produjo entre las 50 y 60 semanas posteriores al diagnóstico inicial de la enfermedad.

El análisis univariado y regresión de Cox, así como las curvas de Kaplan-Meier y el coeficiente de correlación de Pearson, no encontraron asociación significativa entre sobrevida y expresión de p53. El análisis de la expresión inmunohistoquímica del EGFR no pudo ser valorada debido a la expresión aberrante del marcador en la totalidad de los casos.

Conclusiones: La prevalencia de sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 en biopsias de astrocitomas de alto grado atendidos en el CMN "20 de Noviembre" es de 73%. La sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado no se asocia a la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53.

INTRODUCCIÓN

GLIOMAS

En 1853 Rudolf L.K. Virchow señaló por primera vez, la existencia de células derivadas del ectodermo presentes en el sistema nervioso, a las que denominó neuroglia. Los gliomas son neoplasias derivadas de este tejido y representan la mayoría de los tumores primarios cerebrales en adultos. Se clasifican basándose en el tipo celular predominante (astrocitos, oligodendrocitos o células ependimales). Del 60 al 80% de los gliomas, corresponden a neoplasias originadas de los astrocitos y se conocen genéricamente como astrocitomas. ^(1,2)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) clasifica a los astrocitomas de acuerdo a sus características histológicas en cuatro grados, con sus respectivas variantes morfológicas. De manera general, con base en el reconocimiento de cuatro parámetros que son: atipia nuclear, mitosis, proliferación endotelial y necrosis se dividen en dos grandes grupos: gliomas de alto grado o de bajo grado. La presencia de dos o más de las características descritas anteriormente colocan al tumor en la categoría de alto grado. Los gliomas de alto grado (también denominados malignos) tienen un crecimiento expansivo, afectan de forma predominante los hemisferios cerebrales, presentan una infiltración difusa del parénquima cerebral y tienen una evolución rápida con resultados fatales en meses o años. El astrocitoma anaplásico (Grado III de la OMS) y el glioblastoma (Grado IV de la OMS) representan el mayor porcentaje de los tumores clasificados como de alto grado. ^(3,4)

En Estados Unidos, cada año se diagnostican más de 14 000 nuevos casos de gliomas de alto grado, siendo la incidencia anual en ese país de aproximadamente 5 casos por cada 100 000 personas. Los glioblastomas representan del 60 al 70% de todos los gliomas y los astrocitomas anaplásicos del 10 al 15%. ⁽⁵⁾

En México de acuerdo al último Registro Histopatológico de Neoplasias Malignas, en el año 2003 se identificaron 1582 pacientes fallecidos por tumores del sistema nervioso central (SNC), que correspondieron a 2.63% del total de defunciones, para una tasa de 1.5 por 100 mil habitantes. En ese mismo año se registraron 1503 nuevos casos de neoplasias encefálicas, que representaron 1.37% del total de neoplasias malignas registradas ese año. ⁽⁶⁾ Poco se sabe acerca de la incidencia específica de los gliomas en nuestro país, ya que los datos publicados a la fecha son escasos y los existentes rara vez mencionan el grado de malignidad de los mismos.

En cuanto a su etiología, numerosos factores nutricionales, así como la exposición a productos químicos o infecciones virales, han sido estudiados como posibles factores de riesgo para el desarrollo de gliomas de alto grado, de entre ellas sólo las radiaciones ionizantes han mostrado evidencia consistente como factor de riesgo. ⁽⁷⁾

Clínicamente, estas neoplasias pueden manifestarse a cualquier edad, pero afectan preferentemente a los adultos, su pico de incidencia está en la quinta y sexta década de la vida, son ligeramente más comunes en hombres que en mujeres (1.5:1) y significativamente más comunes en la raza blanca que en la negra. Pueden afectar a cualquier parte del SNC, pero en los adultos ocurren generalmente en localización supratentorial. ⁽⁸⁾

Aunque son relativamente poco comunes, los gliomas de alto grado se asocian con una morbilidad y mortalidad elevada. Debido a su naturaleza infiltrante no pueden ser extirpados por completo y la mayoría recidivan en un margen de 2cm de su ubicación original, son rápidamente progresivos y resistentes al tratamiento. La cirugía y la radioterapia constituyen los pilares de tratamiento para la mayoría de estos pacientes. La quimioterapia ha sido utilizada como parte del tratamiento inicial, sin embargo los resultados han sido contradictorios. ⁽⁹⁾

A pesar del tratamiento óptimo, la mediana de supervivencia es de sólo 12 a 15 meses para los pacientes con glioblastoma y de 2 a 5 años para los pacientes con astrocitoma anaplásico. ⁽⁵⁾ Durante las últimas décadas, los descubrimientos de varias alteraciones genéticas aberrantes y vías de señalización han contribuido de manera considerable a la comprensión de la génesis y de la biología de los astrocitomas. Uno de los beneficios importantes derivados de esto es que el perfil genético puede ser de importancia pronóstica o predictiva, por lo que los estudios internacionales se centran en la demostración de este hecho. ⁽¹⁰⁾

ASTROCITOMA ANAPLÁSICO

Astrocitoma maligno que se caracteriza histológicamente por atipia nuclear, celularidad aumentada y actividad proliferativa significativa. El tumor puede originarse de un astrocitoma grado II o de novo, es decir, sin evidencia de una lesión precursora. Tiene una tendencia inherente a progresar a un glioblastoma y miembros de la familia del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se han vinculado a esta transformación maligna. ⁽³⁾

GLIOBLASTOMA

Es el tumor cerebral primario más frecuente en adultos, se definen por las características histopatológicas de atipia celular, mitosis, focos necróticos con empalizada celular periférica e hiperplasia microvascular. En 1940, Scherer lo clasificó en dos tipos: primario o secundario. El glioblastoma primario ocurre de novo sin una lesión precursora reconocible. La historia clínica de la enfermedad suele ser corta, con una supervivencia media de aproximadamente 1 año posterior al diagnóstico. Por el contrario, el tipo secundario se desarrolla lentamente y surge de un astrocitoma preexistente de menor grado. Aunque estos subtipos son histológicamente indistinguibles, los análisis genéticos moleculares sugieren que existen diferencias claras. Los gliomas primarios con frecuencia muestran la amplificación y / o sobreexpresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Por el contrario, los glioblastomas secundarios generalmente disponen de mutaciones del gen p53 y rara vez sobreexpresan EGFR. ⁽¹¹⁾

GEN p53

Es un gen supresor de tumor localizado en el brazo corto del cromosoma 17. Es activado por el daño del ADN, señales anormales de crecimiento y otras tensiones intrínsecas y extrínsecas. En las células normales, la expresión de la proteína p53 está generalmente por debajo del nivel de detección de los métodos inmunohistoquímicos. Las mutaciones de este gen se encuentran entre los cambios moleculares más comunes identificados en los cánceres humanos, estas mutaciones pueden dar lugar a la acumulación y sobreexpresión de la proteína p53 mutante. Las alteraciones del gen p53 desempeñan un papel importante en la iniciación y progresión de los astrocitomas. ^(12,13)

FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO (EGF)

El factor de crecimiento epidérmico es un receptor celular iniciador de cascadas de señales que se activan mediante la unión de ligando y finalizando con la expresión de genes diana en el núcleo. Se encuentra localizado en el brazo corto del cromosoma 7 y está asociado con una amplia gama de funciones celulares, tales como la proliferación celular, la migración, la maduración y la diferenciación. El receptor para EGF (EGFR) es una familia de 4 moléculas con actividad tirosina kinasa intrínseca. La molécula receptora mejor caracterizada se denomina EGFR1, ERB B1 o simplemente EGFR. EGFR está desregulado en una variedad de tumores malignos sólidos, en particular, su expresión se ha correlacionado con la progresión de la enfermedad y la supervivencia pobre. En los gliomas de alto grado, además, se ha establecido asociación con la resistencia a tratamiento. ⁽¹⁴⁾

La evaluación precisa del estado de EGFR es muy importante debido al papel pronóstico y predictivo así como la disponibilidad de terapias específicas dirigidas. ^(15,16)

La confluencia de los avances recientes en la biología de las células madre, la señalización celular y los sistemas genéticos han revolucionado nuestra comprensión de los mecanismos subyacentes al comportamiento clínico de los astrocitomas. Este progreso ha impulsando nuevas oportunidades para la comprensión de las bases fundamentales del desarrollo de esta enfermedad devastadora y también nuevas terapias que por primera vez, presagian respuestas clínicas significativas. ⁽¹⁷⁾

Sin embargo, la importancia pronóstica de la expresión de EGFR y p53 en los astrocitomas de alto grado continúa siendo motivo de controversia. Varios informes han concluido que la sobreexpresión EGFR predice una menor supervivencia, mientras que otros no han encontrado asociación estadísticamente significativa. ⁽¹⁸⁾ Al igual que con EGFR, no se ha logrado un consenso sobre el valor pronóstico de p53. Algunos autores afirman que no existe asociación con la supervivencia, mientras que otros proponen que la alteración de p53 un factor pronóstico negativo.

Por lo anterior resulta de interés determinar en nuestra población, la prevalencia de alteraciones en p53 y EGFR, así como establecer la asociación entre su sobreexpresión y el pronóstico de supervivencia, con el fin de incidir de forma positiva en la historia natural de esta enfermedad.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Determinar la prevalencia y relación pronóstica de la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 y EGFR en pacientes con astrocitoma de alto grado atendidos en el servicio de Neurocirugía y de Anatomía Patológica del C.M.N. "20 de Noviembre" en el período comprendido entre Enero del 2007 y Diciembre del 2011.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar la prevalencia de la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 y EGFR en pacientes con astrocitoma de alto grado.
- Calcular el tiempo de supervivencia de los pacientes en estudio.
- Establecer asociación entre la sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 y EGFR y el tiempo de supervivencia.

JUSTIFICACIÓN

Consideramos que con la información obtenida en este estudio se podrá evidenciar la presencia en nuestra población, de mutaciones relacionadas con p53 y EGFR en pacientes adultos con astrocitoma de alto grado. Asumiendo que la presencia de dichas mutaciones se relacione con el pronóstico de forma significativa e independiente, servirá a corto plazo para establecer una mejora en la estadificación de riesgos que permita modificar la agresividad del tratamiento inicial, respecto al actualmente utilizado. A mediano plazo servirá como apoyo para el inicio de estudios clínicos que valoren el uso de terapia específica coadyuvante con el fin de establecer un factor predictivo en estas neoplasias; logrando a largo plazo, una mejora integral en la atención de los pacientes con astrocitomas de alto grado que conlleve a un aumento en su sobrevida y mejora en su calidad de vida.

HIPÓTESIS

Los pacientes con sobreexpresión de p53 y EGFR detectada por medio de inmunohistoquímica presentan menor sobrevida respecto a aquellos que no presentan sobreexpresión de dichos marcadores.

MATERIALES

1. Especímenes incluidos en bloques de parafina correspondientes a casos con el diagnóstico de astrocitoma anaplásico y glioblastoma.
2. Microtomo de rotación Leica RM 2255.
3. Reactivos, insumos y equipo manual para tinción convencional de Hematoxilina y Eosina.
4. Equipo automatizado para la realización de técnica de inmunohistoquímica Benchmark XT500, marca Ventana.
5. Insumos y reactivos de inmunohistoquímica para p53 y EGFR.

Anticuerpo EGFR:

- MARCA: Dako.
- CLONA: H11.
- LOTE: 10036251.
- REF: M3563.

Anticuerpo P53:

- MARCA: Dako.
- CLONA: DO-7.
- LOTE: 00027864.
- REF: M7001.

6. Microscopio óptico convencional.
7. Fotomicroscopio.
8. Computadora personal con paquetería básica (Office) y paquete estadístico SPSS Statistics 20 para Windows.

MÉTODO

Se realizó un estudio descriptivo, observacional, transversal y retrolectivo, para lo cual:

- A) Se seleccionaron del archivo del servicio de Anatomía Patológica del C.M.N. "20 de Noviembre" a los pacientes con diagnóstico de astrocitoma anaplásico y glioblastoma atendidos durante el periodo comprendido entre enero del año 2007 y diciembre del año 2011. Se excluyeron del estudio los pacientes que recibieron tratamiento con radioterapia o quimioterapia previo a la toma de biopsia, pacientes con información clínica incompleta, que fallecieron por causa diferente a la enfermedad en estudio y aquellos en los que el estudio inmunohistoquímico no haya podido ser realizado o sea no valorable.
- B) Se recolectaron los bloques de parafina así como las laminillas teñidas con técnica de Hematoxilina-Eosina con los cuales se realizó el diagnóstico inicial de la enfermedad.
- C) Para el estudio inmunohistoquímico se seleccionó un bloque con tejido tumoral representativo y se realizó la técnica de rutina que se resume de la forma siguiente:
 - 1. Se realiza corte a 2 μ m en micrótopo de rotación Leica RM 2255 y se coloca en laminilla electrocargada.
 - 2. Se desparafina en estufa por 30 minutos a 60°C.
 - 3. Se realiza recuperación antigénica por 30 minutos a 37°C y presión utilizando el sistema automatizado para tinción de laminillas, equipo Bechmark XT marca ventana. Posteriormente se realiza lavado con solución buffer.
 - 4. Se incuba anticuerpo por 32 minutos y calor a 37°C. posterior a lo cual se realiza lavado con solución buffer.
 - 5. Se aplica sistema de detección ultraview por 20 minutos. Se realiza nuevo lavado con solución buffer.
 - 6. Se aplica Hematoxilina de Hill por 4 minutos, seguido de lavado con solución buffer.
 - 7. Se realiza incubación de reactivo de diferenciación (azuleamiento de hematoxilina) por 4 minutos, seguido de lavado con buffer.
 - 8. Se lava con agua corriente.
 - 9. Se deshidrata con alcohol a grados ascendentes hasta xilol y se cubre la muestra.

El procedimiento anterior se llevó a cabo en cada bloque de parafina, utilizando dos laminillas para cada caso. Una laminilla para aplicación del anticuerpo p53 y otra para aplicación del anticuerpo EGFR. Cada laminilla contó con un corte del tejido problema y un corte de tejido utilizado como testigo (colon para ambos anticuerpos).

D) Evaluación de Muestras

Las muestras con tinción de Hematoxilina-Eosina y las correspondientes a inmunohistoquímica fueron evaluadas por 2 patólogos expertos, inicialmente de forma individual en un microscopio óptico convencional marca Carl Zeiss, modelo Axioskop. Posteriormente se realizó revisión conjunta de todas las laminillas en un microscopio óptico multifocal. Previo a la evaluación de laminillas se determinó la variabilidad intra e inter observador con cortes histológicos ya diagnosticados por consenso en el servicio de anatomía patológica.

Se realizó un conteo de la positividad a la inmunorreacción de p53 y EGFR en la totalidad de la biopsia, de acuerdo a lo cual los pacientes fueron divididos en 4 grupos ⁽¹⁹⁾:

- Con sobreexpresión de p53: Más del 6% de núcleos con inmunorreacción positiva.
- Sin sobreexpresión de p53: Menos del 6% de núcleos con inmunorreacción positiva.
- Con sobreexpresión de EGFR: Más del 20% de inmunorreacción positiva en membrana celular.
- Sin sobreexpresión de EGFR: Menos del 20% de inmunorreacción positiva en membrana celular.

E) Se recolectaron los datos clínicos utilizando el Sistema de Información Hospitalaria (SIAH), del cual se tomó registro de las siguientes variables: edad, sexo y sobrevida.

F) Determinación del tamaño de la muestra:

Se desconoce la prevalencia en México, sin embargo de acuerdo a lo reportado por estudios internacionales, las mutaciones del receptor del factor de crecimiento epidérmico y de p53 ocurren en alrededor de 40 al 50% de los astrocitomas de alto grado.

Con base en lo anterior, asumiendo una prevalencia del 50% (valor arbitrario), utilizando la fórmula para prevalencias, para una confianza de 95% y una precisión de 5%:

$$n = \frac{N \cdot Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot (1-p)}{e^2 \cdot (N-1) + Z_{\alpha}^2 \cdot p \cdot (1-p)}$$

Donde:

n = tamaño de la muestra.

N = total de biopsias con astrocitomas de alto grado en el periodo estudiado.

Z α = 1.96

p = prevalencia esperada.

e = precisión (0.05)

El tamaño de la muestra calculado fue de 48 biopsias. Considerando que es posible la expresión de p53 y EGFR en tejido cerebral sin patología neoplásica existente, se realizará el análisis inmunohistoquímico a tejido cerebral de 10 pacientes sin patología neurológica conocida, haciendo una población total de estudio de 58 biopsias.

G) Definición de variables y unidades de medida.

VARIABLES INDEPENDIENTES

Astrocitoma Anaplásico:

Neoplasia astrocítica que afecta principalmente a los adultos, se localiza preferentemente en los hemisferios cerebrales y que se caracteriza histológicamente por atipia nuclear, aumento de celularidad y actividad proliferativa significativa.

Glioblastoma Multiforme:

Neoplasia maligna que se caracteriza histológicamente por presentar atipia nuclear, pleomorfismo celular marcado, actividad mitótica, trombosis vascular, microvascular proliferación y necrosis.

VARIABLES DEPENDIENTES

Sobreexpresión de p53:

Se evaluó de acuerdo a la inmunorreacción nuclear y se puntuó en una escala de 0 a 3 puntos de acuerdo a la tabla siguiente:

Puntos	Inmunorreacción
0	Negativa
1	5% de los núcleos con inmunorreacción positiva.
2	6 a 30% de los núcleos con inmunorreacción positiva.
3	Más de 30% de los núcleos con inmunorreacción positiva.

Para efectos de análisis estadísticos, todos las puntuaciones de 0 y 1 se consideraron como "negativo", mientras que las puntuaciones de 2 y 3 se consideraron como "sobrexpresión". ⁽¹⁹⁾

Sobreexpresión de EGFR:

Se evaluó de acuerdo a la inmunorreacción de la membrana celular en una escala de 0 a 3 puntos de acuerdo a la tabla siguiente:

Puntos	Inmunorreacción
0	Negativa
1	Menos del 20% de células con inmunorreacción positiva.
2	Del 21 al 50% de células con inmunorreacción positiva.
3	Más de 50% de células con inmunorreacción positiva.

Para el análisis estadístico, una puntuación de 0 y 1 se consideró como "negativo" y una puntuación de 3 o 4 se consideró como "sobrexpresión". ⁽¹⁹⁾

Sobrevida

La sobrevida se calculó como el intervalo medido en semanas, entre el diagnóstico histológico inicial y el día de muerte atribuible al tumor. En los pacientes cuyo día de la muerte fue incierto, este fue tomado como la última cita con vida. Los pacientes vivos al final del análisis fueron censurados el día 30 de diciembre de 2012.

VARIABLES DEMOGRÁFICAS

Sexo

Características fenotípicas y genotípicas que identifican al ser humano entre hombre y mujer.

Edad

Tiempo transcurrido desde el nacimiento.

Prevalencia

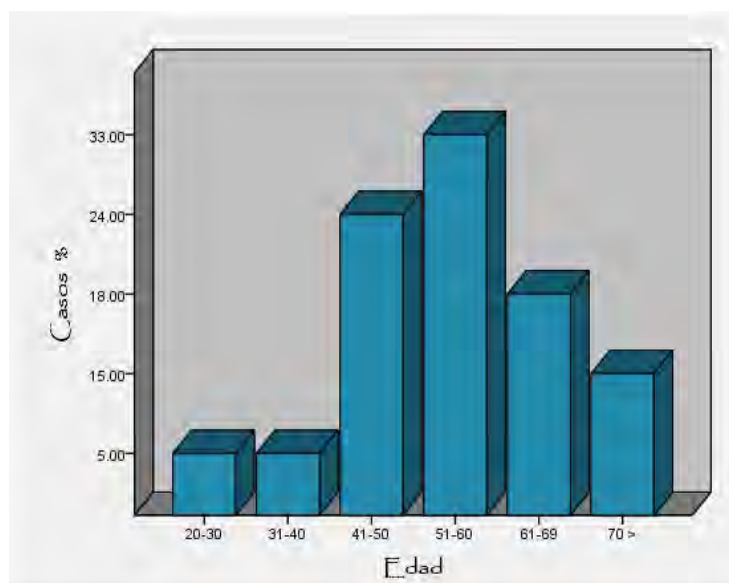
Proporción de individuos de un grupo o de una población que presenta una característica o evento determinado en un período determinado. En este caso, el número de pacientes con astrocitoma de alto grado que presenten sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 y EGFR, atendidos en el C.M.N. 20 de Noviembre en un periodo de 5 años.

H) Procesamiento y presentación de la información:

1. Captura electrónica de la información obtenida del expediente clínico en hojas de recolección de datos en formato Excel.
2. Calculo del tiempo de supervivencia.
3. Obtención de información a través del análisis simple de cada una de las variables mediante medidas de tendencia central.
4. Calculo de la prevalencia, realizada mediante la división de los pacientes positivos a sobreexpresión de p53 y EGFR entre el total de pacientes con astrocitoma de alto grado analizados.
5. Distribución de frecuencia de todas las variables bajo estudio.
6. Uso del paquete estadístico SPSS Statics 20.0 para Windows. Para identificar las variables relacionadas con la supervivencia se realizó análisis univariado y multivariado de Cox, así como curvas de supervivencia de Kaplan-Meier y coeficientes de correlación de Pearson.
7. Presentación de información obtenida a través de tablas y gráficos realizados con el software estadístico y el programa Microsoft Office.

RESULTADOS

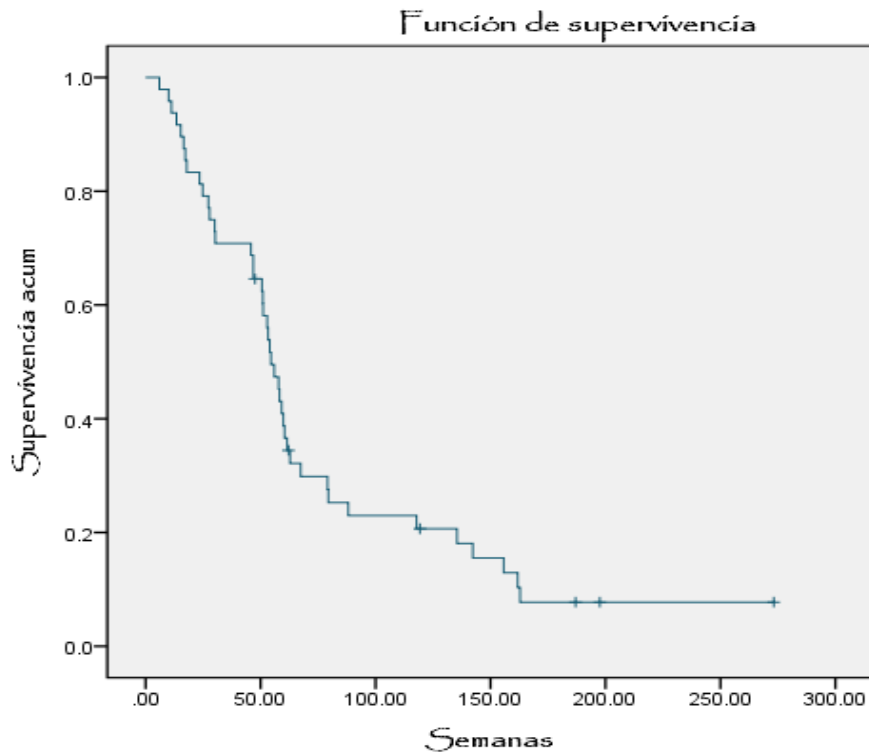
En el periodo comprendido entre enero de 2007 y diciembre de 2011, se analizaron en el Servicio de Anatomía Patológica un total de 81 biopsias de cerebro correspondientes a astrocitomas de alto grado, de los cuales el 28.4% (n=23) fueron diagnosticados como astrocitoma anaplásico y el 71.6% (n=58) como glioblastoma. El 47% (n=23) correspondieron a pacientes del sexo femenino y 53% (n=43) al sexo masculino. La edad promedio al diagnóstico fue de 55 años con una edad máxima de 80 años y mínima de 20 años. Al estratificar por grupos de edad, la mayor incidencia se encontró en el grupo de 51 a 60 años, sin embargo también se evidenció una incidencia relevante en el grupo de 41 a 50 años (Gráfico 1).



Gráfica 1: Porcentaje de casos de astrocitoma de alto grado diagnosticados por grupo de edad.

La sobrevivida promedio después del diagnóstico histopatológico inicial fue de 69.4 semanas, con un mínimo de 6 semanas y un máximo de 273 semanas.

La muerte se produjo en mayor cantidad de paciente entre las 50 y 60 semanas posteriores al diagnóstico inicial (Gráfica 2).

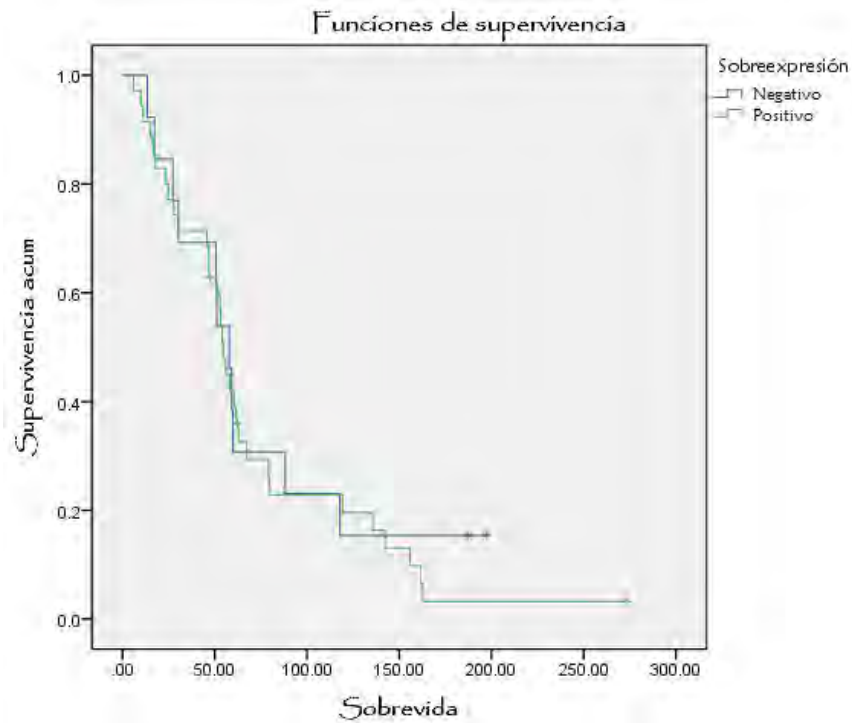


Gráfica 2: Supervivencia de los pacientes con astrocitoma de alto grado a partir del diagnóstico histopatológico inicial.

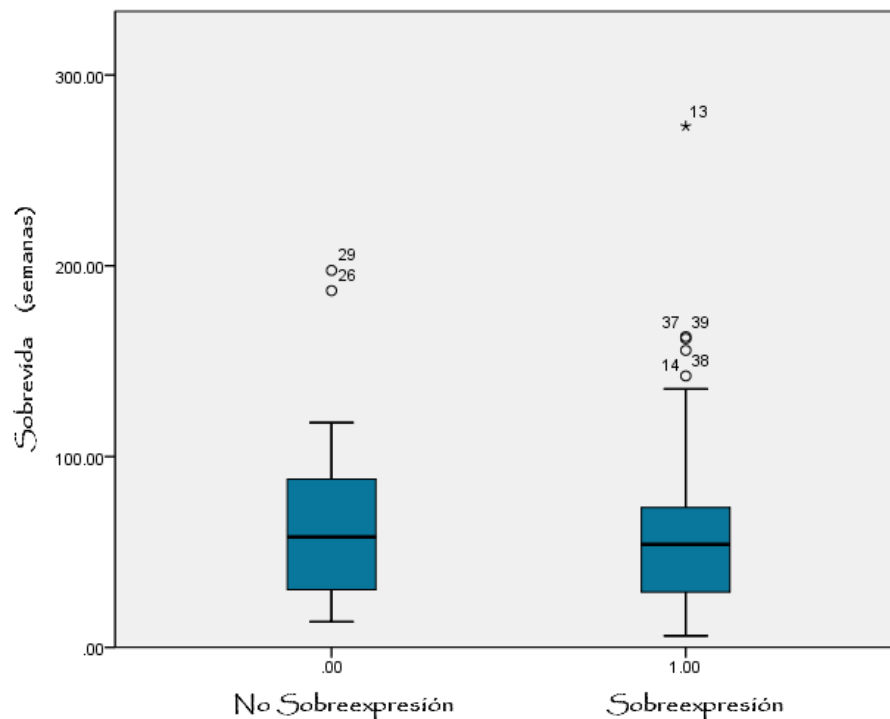
El 73% (n=35) de los casos analizados, presentaron sobreexpresión inmunohistoquímica de p53, el 2% (n=1) presentó inmunorreacción negativa, y el resto de casos 26% (n=12) presentó inmunorreacción positiva pero no suficiente para considerarse como sobreexpresión.

No se encontró asociación significativa al realizar el análisis de la relación entre sobrevida y expresión de p53 (Gráfica 3). Incluso se evidenció que el caso registrado con mayor sobrevida se encontró dentro del grupo de pacientes con sobreexpresión inmunohistoquímica de p53. Del mismo modo, se evidenció que algunos de los casos con menor sobrevida se encontraron dentro del grupo sin sobreexpresión del marcador inmunohistoquímico (Gráfica 4). El coeficiente de relación de Pearson fue de 0.126 por lo que no se estableció correlación entre ambas variables.

El análisis de la expresión inmunohistoquímica del EGFR no pudo ser realizado debido a la expresión aberrante del marcador, con inmunorreacción homogénea o granular en citoplasma y negatividad en membrana celular, en la totalidad de los casos.



Gráfica 3: Análisis de supervivencia. Curva de Kaplan-Meier que compara la supervivencia de los pacientes con y sin sobreexpresión inmunohistoquímica de p53.



Gráfica 4: Análisis de supervivencia. Diagrama de caja que permite visualizar con mayor claridad la similitud en el tiempo de supervivencia de los grupos estudiados. En ambos grupos se observan casos con supervivencia superior a la promedio.

DISCUSIÓN

Los astrocitomas de alto grado son tumores biológicamente agresivos, con una supervivencia media de un año después del diagnóstico inicial, sin embargo existe una gama importante de tiempos de supervivencia alrededor de este valor. Los esfuerzos por comprender por qué algunos pacientes viven más o menos de la media, han orientado los estudios a la búsqueda de heterogeneidad genética significativa. Las alteraciones genéticas más comúnmente identificadas incluyen mutaciones en el gen p53 y la amplificación y reordenamiento del gen del EGFR.

La literatura internacional reporta que la mutación del gen p53 y sobreexpresión de la proteína p53 se encuentra en 30-60% de los gliomas astrocíticos independientemente del grado tumoral. En nuestro estudio se encontró una prevalencia mayor a la señalada, con sobreexpresión en 73% de los casos estudiados. La sobreexpresión elevada de p53 se ha reportado en casos de glioblastomas de origen secundario, sin embargo no fue posible realizar esa asociación en nuestros casos, ya que en ninguno se tenía antecedentes de diagnóstico de lesión de menor grado previa, así como tampoco fueron identificadas en las biopsias zonas con astrocitoma de menor grado.

En cuanto al significado de la sobreexpresión de p53, no ha habido consenso respecto a su valor pronóstico. Los estudios dirigidos por Jaros, Korkolopoulou y Soine encontraron que los gliomas con sobreexpresión de p53 presentan menor supervivencia, mientras que los estudios dirigidos por Rasheed, Rainov y Baxendine-Jones no encontraron relación entre ambas variables. Además, un estudio reciente mostró que la sobreexpresión de p53 predice mayor supervivencia en pacientes con glioblastoma. En nuestro estudio no se encontró relación significativa entre la sobreexpresión de p53 y la sobrevida de los pacientes. El tiempo de sobrevida fue similar entre el grupo con sobreexpresión del marcador y el que no la presentaba, incluso varios de los paciente con mayor sobrevida presentaron sobreexpresión de p53, aunque tampoco se encontró significancia estadística de éste como factor pronóstico positivo.

Las discrepancias en los datos reportados puede reflejar la variación en los anticuerpos utilizados, las diferencias en la evaluación de la inmunorreacción a p53, la variabilidad en el número y los grados de los tumores investigados y la heterogeneidad en los datos clínicos, incluyendo los esquemas de tratamiento.

Por otra parte, de acuerdo a la literatura universal, el gen del EGFR se encuentra sobreexpresado en 40-50% de los astrocitomas de alto grado y similar a la situación con p53, no hay consenso establecido en cuanto a su valor pronóstico. Mientras algunos estudios no encuentran asociación alguna, otros afirman la sobreexpresión de p53 como un factor pronóstico negativo. En nuestro estudio no fue posible analizar la expresión de este marcador debido a la inmunorreacción negativa de la membrana celular y la positividad citoplasmática, difusa o granular, considerada como aberrante en la mayoría de los casos, por lo que no se estableció la prevalencia de la sobreexpresión del EGFR ni su asociación con la supervivencia.

El 100% (n=10) de los casos incluidos en el estudio como controles presentaron inmunorreacción negativa tanto para p53 como para el EGFR, demostrando la importancia de la alteración genética de ambos en el desarrollo de los astrocitomas. La heterogeneidad de resultados reportados a nivel internacional, así como la variabilidad de resultados observados a nivel individual en nuestro estudio, sugieren una relación compleja pero incuestionable entre la sobreexpresión de dichos marcadores y la supervivencia.

La información epidemiológica obtenida en este estudio, no difirió de la reportada a nivel internacional. La distribución según el sexo fue similar en ambos grupos, con un ligero predominio del sexo masculino con 53% de los casos, frente al 47% del sexo femenino. En nuestro estudio, la edad promedio al diagnóstico fue de 55 años, lo cual estuvo acorde con el pico de incidencia entre los 50 y 60 años reportado por la literatura. El tiempo de supervivencia promedio de nuestro estudio fue de 1.4 años, que no difirió de forma importante de los 12 meses reportados a nivel internacional.

En suma, con los hallazgos obtenidos en este estudio se acepta la hipótesis nula, con lo que rechazamos la asociación pronóstica negativa entre la sobreexpresión de p53 y la supervivencia de los pacientes con astrocitoma de alto grado.

CONCLUSIÓN

La prevalencia de la sobreexpresión de p53 en los pacientes con astrocitoma de alto grado atendidos en el CMN "20 de Noviembre" es del 73%.

La sobreexpresión inmunohistoquímica de p53 no tiene relación pronóstica con la sobrevida de los pacientes con astrocitoma de alto grado.

APÉNDICE

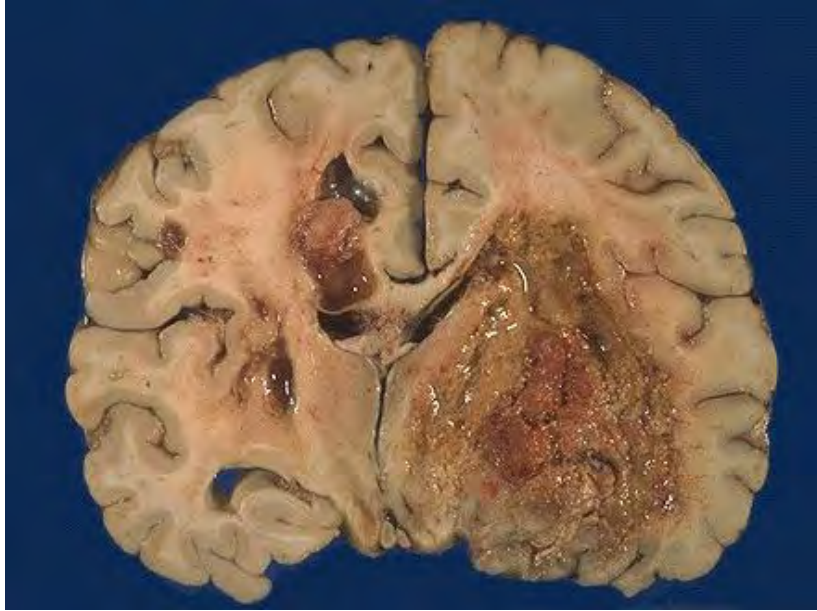


Figura 1: Astrocitoma de alto grado, vista macroscópica. Corte coronal en el que se observa lesión tumoral de gran tamaño, con extensas zonas de hemorragia y necrosis, efecto de masa y extensión al hemisferio opuesto.

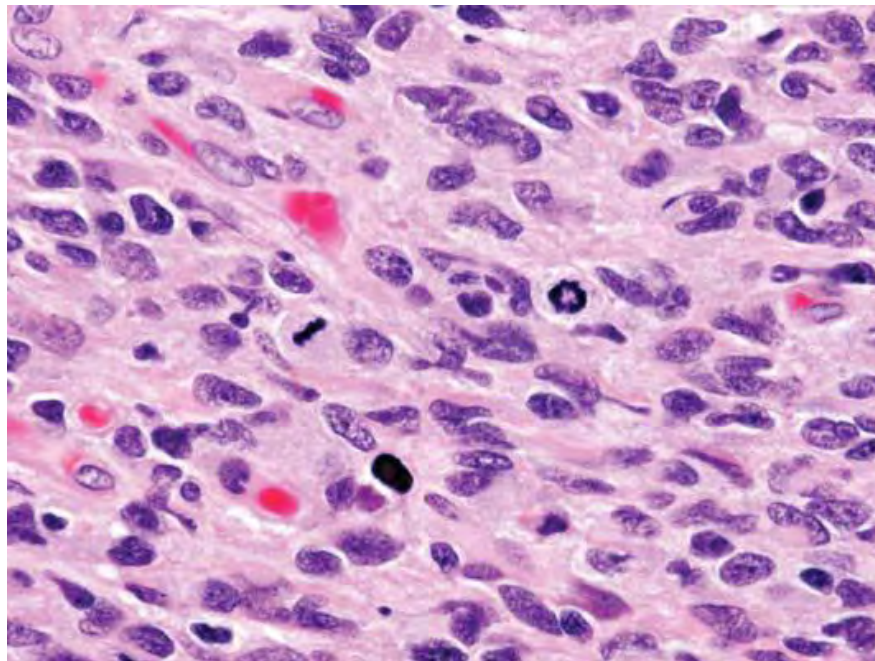


Figura 2: Astrocitoma anaplásico, vista microscópica. Caracterizado por aumento de la celularidad, núcleos pleomorfos e hiper cromáticos y mitosis.

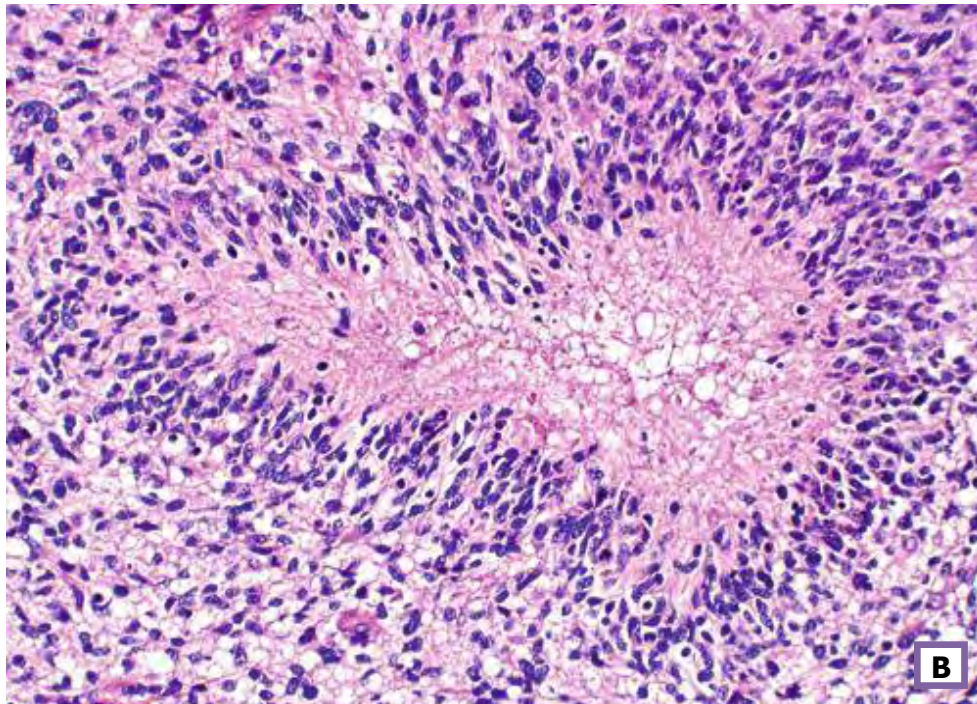
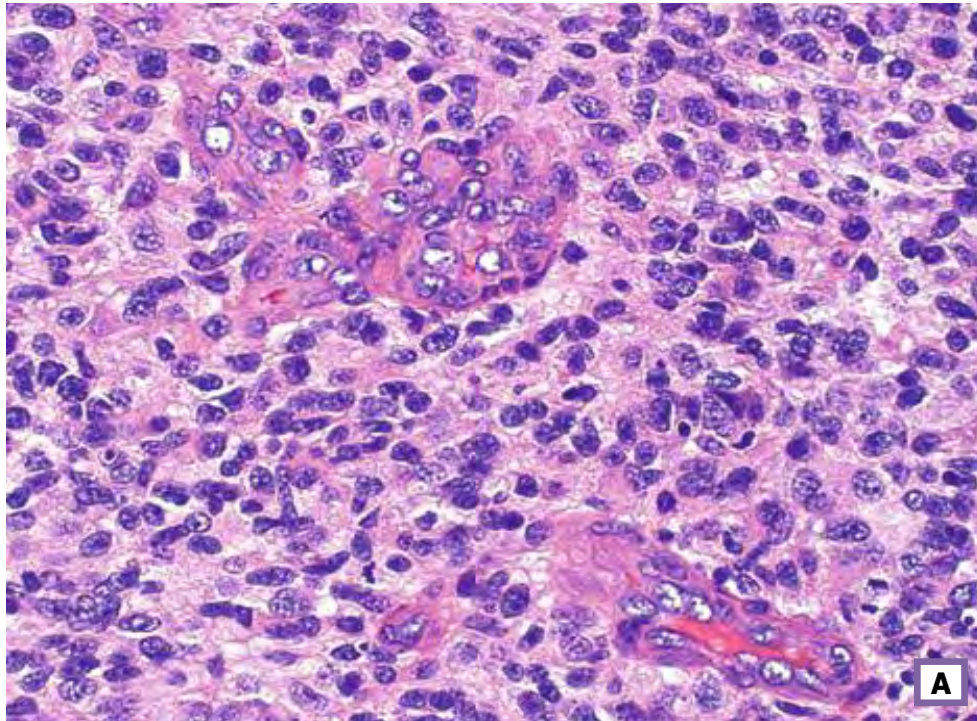


Figura 3. Glioblastoma, vista microscópica. Caracterizado por proliferación endotelial (a) y formación de pseudoempalizadas nucleares alrededor de áreas con necrosis coagulativa (b).

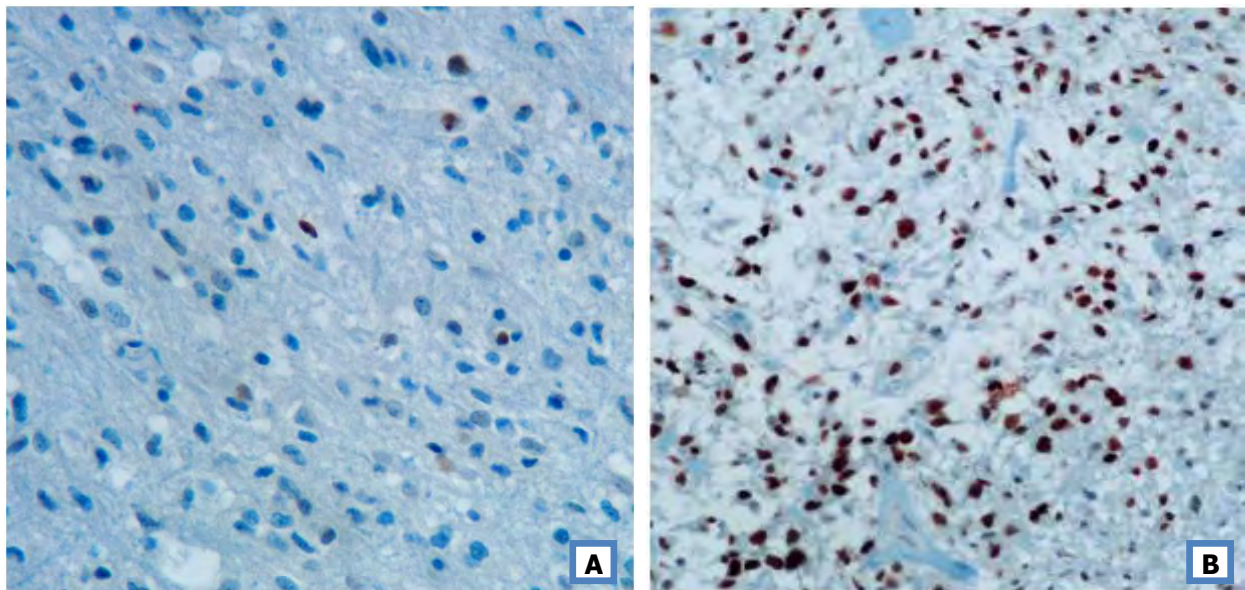


Figura 3. Inmunohistoquímica correspondiente a p53. (a) Caso considerado como negativo a sobreexpresión. (b) Caso positivo a sobreexpresión.

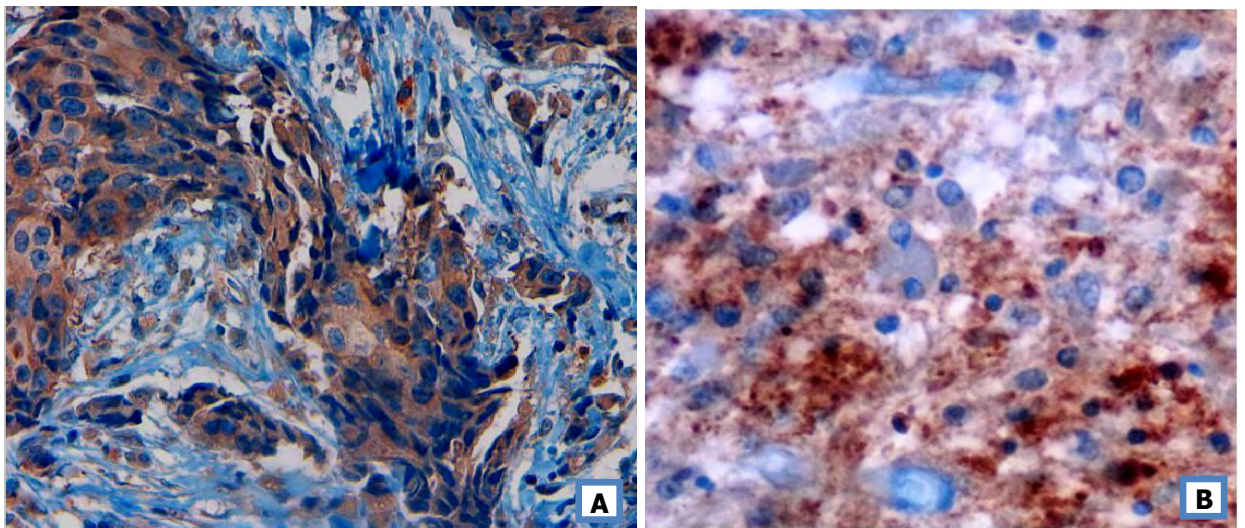


Figura 4. Inmunohistoquímica correspondiente a EGFR. La inmunorreacción observada fue selectiva a elementos neoplásicos, sin embargo esta fue positiva a nivel citoplasmático de forma homogénea (a) o con formación de agregados en grumos (b), consideradas como aberrantes. La inmunorreacción en membrana citoplasmática fue negativa en todos los casos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ohgaki H, Kleihues P. Epidemiology and etiology of gliomas. *Acta Neuropathol.* 2005;109:93-108.
2. Crocetti E, Trama a, Stiller C, et al. Epidemiology of glial and non-glial brain tumours in Europe. *Eur J Cancer* 2012;48(10):1532-1542.
3. Louis, D. N. , H. Ohgaki , O. D. Weistler , and W. K. Cavenee . WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. Lyon, France: IARC Press; 2007: 309.
4. Brat DJ, Parisi JE, Kleinschmidt-DeMasters BK. Surgical neuropathology update: A review of changes introduced by the WHO classification of tumours of the central nervous system, 4th edition. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132:993–1007.
5. Patrick Y. Wen, M.D., and Santosh Kesari, M.D., Ph.D. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* 2008; 359:492-507.
6. Centro Nacional de Vigilancia Epidemiológica y Control de Enfermedades. Registro histopatológico de neoplasias malignas en México, 2002. México: Secretaría de Salud; 2003.
7. Bondy ML, Scheurer ME, Malmer B, et al. Brain tumor epidemiology: consensus from the Brain Tumor Epidemiology Consortium. *Cancer.* 2008;113(Suppl 7):1953–1968.
8. Mineo JF, Quintin-Roue I, Lucas B, Buburusan V, Besson G. Glioblastomas: clinical study and search for prognostic factors. *Neurochirurgie* 2002;48(6):500-509.
9. Norden AD, Wen PY. Glioma therapy in adults. *Neurologist* 2006;12:279-292.
10. Christine E Fuller, Arie Perry. Molecular Diagnostics in Central Nervous System Tumors. *Advances in Anatomic Pathology.* 2005;12:4, 180-194.
11. Justin S. Smith, Issei Tachibana, Sandra M. Passe. PTEN Mutation, EGFR Amplification, and Outcome in Patients With Anaplastic Astrocytoma and Glioblastoma Multiforme. *JNCI J Natl Cancer Inst* (2001) 93(16): 1246-1256.
12. Shiraishi, S., Tada, K., Nakamura, H., Makino, K., Kochi, M., Saya, H., Kuratsu, J.-i. and Ushio, Y. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer,* 2002;95: 249–257.
13. Baxendine-Jones J, Campbell I, Ellison D. p53 status has no prognostic significance in glioblastomas treated with radiotherapy. *Clin Neuropathol.* 1997;16:332–336.

14. Barker FG, Simmons ML, Chang SM, Prados MD, Larson DA, Sneed PK. EGFR overexpression and radiation response in glioblastoma multiforme. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2001, 51:410-418.
15. Idbaih, A., Aimard, J., Boisselier, B., Marie, Y., Paris, S., Crinière, Epidermal growth factor receptor extracellular domain mutations in primary glioblastoma. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 2009;35: 208–213.
16. Naoki Shinojima, Kenji Tada, Shoji Shiraishi, et al. Prognostic Value of Epidermal Growth Factor Receptor in Patients with Glioblastoma Multiforme. *Cancer Res* 2003;63:6962-6970.
17. Joon H. Uhm, Karla V. Ballman, Wenting Wu, Caterina Giannini, J.C. Phase II Evaluation of Gefitinib in Patients With Newly Diagnosed Grade 4 Astrocytoma: Mayo/North Central Cancer Treatment Group Study N0074, *International Journal of Radiation Oncology*Biography*Physics*, Volume 80, Issue 2, 1 June 2011, Pages 347-353.
18. Lopez-Gines C, Gil-Benso R, Ferrer-Luna R, Benito R, Serna E, et al. (2010) New pattern of EGFR amplification in glioblastoma and the relationship of gene copy number with gene expression profile. *Mod Pathol* 23: 856–865.
19. Simmons ML, Lamborn KR, Takahashi M, et al. Analysis of complex relationships between age, p53, epidermal growth factor receptor, and survival in glioblastoma patients. *Cancer Res*. 2001;61:1122-1128.
20. Klatt, Edward C., Stanley L. Robbins, and Ramzi S. Cotran. *Robbins and Cotran Atlas of Pathology*. Philadelphia, PA: Saunders Elsevier, 2006. 485-486.